



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

Maria Regina Gomes Carneiro

**ESTUDO DOS EFEITOS DA CO-EXPOSIÇÃO AOS ANTINEOPLÁSICOS
HIDROXIUREIA E 6-MERCAPTOPURINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO
EMBRIOFETAL DE RATOS.**

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten

**RIO DE JANEIRO
2016**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

Maria Regina Gomes Carneiro

**ESTUDO DOS EFEITOS DA CO-EXPOSIÇÃO AOS ANTINEOPLÁSICOS
HIDROXIUREIA E 6-MERCAPTOPURINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO
EMBRIOFETAL DE RATOS.**

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como
parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor
em Oncologia

Orientador : Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten

**RIO DE JANEIRO
2016**

G633e Gomes-Carneiro, Maria Regina.

Estudo dos efeitos da co-exposição aos antineoplásicos hidroxiuréia e 6-mercaptopurina sobre o desenvolvimento embriofetal de ratos / Maria Regina Gomes-Carneiro. – Rio de Janeiro, 2016.

400 p.: il. color.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2016.

Orientador: Francisco José Roma Paumgarten.

1. Antineoplásicos. 2. Hidroxiureia. 3. 6-Mercaptopurina. 4. Administração e Dosagem. 5. Ratos. I. Paumgarten, Francisco José Roma (orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.994061



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

MARIA REGINA GOMES CARNEIRO

**ESTUDO DOS EFEITOS DA CO-EXPOSIÇÃO AOS ANTINEOPLÁSICOS
HIDROXIUREIA E 6-MERCAPTOPURINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO
EMBRIOFETAL DE RATOS.**

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten

Aprovada em: 29/02/2016

EXAMINADORES:

**Prof. Dr. João Paulo Machado Torres
Prof. Dr. José Mauro Granjeiro
Prof. Dr. Miguel Angelo Martins Moreira
Prof. Dr. Sheila Coelho Soares Lima
Prof. Dr. Mariana Emerenciano Cavalcanti de Sá
Prof. Dr. Thiago Estevam Parente Martins**

**RIO DE JANEIRO
2016**

À Lycia

AGRADECIMENTOS

A Rosangela Ribeiro de Carvalho, pela inestimável parceria neste trabalho, coleguismo e amizade, devotadas ao longo da execução deste trabalho, e pela efetiva participação em todas as suas fases, incluindo a magnífica performance na leitura dos esqueletos de todos os fetos. Agradeço ainda, pelo legado de conhecimento que me transmitiu.

A Hellen da Silva Leal, Deise Riba Coelho, Lorena Carvalho da Rosa, Lúcio Kuriyama e Patrícia Ribeiro de Carvalho, por terem participado das inúmeras seções de cesariana envolvidas nesses estudos – com carinho.

Ao Sr. Ivã de Souza Chaves, pela valorosa contribuição, durante a etapa de cruzamento dos animais.

A Ana Cecilia Amado Xavier de Oliveira, pela amizade e cooperação de sempre.

A Daniel Andrade Moreira, pela condução dos testes estatísticos de normalidade dos dados obtidos neste trabalho.

Ao ilustre orientador, Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten, pelo conhecimento transmitido nesta longa jornada de trabalho juntos.

Ao INCA que, através das disciplinas ministradas, me ofereceu a oportunidade de atualizar e de ampliar os meus conhecimentos na área da Biologia do Câncer, o que me permitiu ler e compreender, de uma maneira mais profunda, os textos utilizados neste trabalho.

**ESTUDO DOS EFEITOS DA CO-EXPOSIÇÃO AOS ANTINEOPLÁSICOS
HIDROXIUREIA E 6-MERCAPTOPURINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO
EMBRIOFETAL DE RATOS.**

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Maria Regina Gomes Carneiro

Os antineoplásicos hidroxureia (HU) e 6-mercaptopurina (6MP) inibem a síntese do *DNA*. A HU inibe a enzima ribonucleotídeo redutase (RR) que converte ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos, resultando em bloqueio da síntese de *DNA*. A 6MP é ativada pela via *HGPRT* que origina nucleotídeos de 6-tioguanina, incorporados erroneamente ao *DNA*. HU e 6MP são teratogênicos potentes em roedores e afetam o desenvolvimento da prole das mães expostas. Estudos indicam que os efeitos da co-administração desses fármacos não são explicados pela mera adição dos efeitos isolados, entretanto, o modo pelo qual eles interagem não está claro.

Na primeira parte deste trabalho investigamos as relações dose-efeito embriotóxico da HU e 6-MP; na segunda, analisamos os efeitos das exposições sequenciais ou concomitantes aos dois fármacos sobre o desenvolvimento pré-natal. Avaliamos embriofetalidade, retardo do crescimento e indução de anomalias externas e esqueléticas fetais. Os experimentos envolveram: cruzamento dos animais; tratamento das ratas grávidas (DG11) com HU ou 6-MP; cesariana e retirada do útero (DG21); fixação dos fetos, diafanização e coloração do esqueleto; avaliação dos esqueletos. Na segunda parte deste estudo, selecionamos a dose máxima não teratogênica de HU (250 mg/kg ip) e uma dose embriotóxica de 6MP (24 mg/kg sc) e testamos os efeitos combinados desses fármacos, injetados concomitantemente, ou com intervalos de 2 ou 4 horas, em quatro grupos de ratas grávidas: Não tratadas; Tratadas com HU e veículo; Tratadas com veículo e 6MP; Tratadas com HU e 6MP.

Os resultados mostraram que a administração concomitante de HU atenuou vários efeitos da 6MP, como as proporções de fetos mortos e malformados, a redução dos pesos fetal e placentário, e o aumento da incidência de anomalias externas e ósseas. Com a administração sequencial, grupos tratados com HU, 2 ou 4 horas antes, ou 4 horas depois da 6MP, não diferiram dos que receberam apenas 6MP para a maioria dos parâmetros de toxicidade materna e embrionária, incluindo malformações externas. A HU administrada 2 horas depois antagonizou a redução do peso fetal.

A avaliação esquelética evidenciou que, quando HU foi injetada 2 horas antes de 6-MP, não alterou as frequências de defeitos do esqueleto, exceto um aumento de duas anormalidades da coluna vertebral; quando foi administrada 2 horas depois, as frequências de algumas anomalias causadas pela 6-MP permaneceram inalteradas, enquanto outras diminuíram (coluna, crânio, patas dianteiras e traseiras).

Com a administração de HU 4 horas antes de 6-MP, houve aumento da incidência de algumas anomalias (coluna e patas traseiras), e redução de outras (crânio, coluna, patas dianteiras e traseiras); a injeção de HU 4 horas depois não alterou a incidência de anomalias de crânio associadas a 6-MP, aumentou a frequência de anormalidades da coluna e patas, e diminuiu algumas observadas na pata dianteira.

As interações notadas com os tratamentos combinados são consistentes com a interpretação de que a HU é eliminada em até 2 horas, e a 6MP, mais lentamente, e com a hipótese de que a interação pode ser explicada farmacocineticamente. A HU inibiria RR, impedindo a formação do metabólito embriotóxico trifosfato de 6-desoxitioanosina, atenuando seus efeitos.

**EFFECTS OF CO-EXPOSURE TO THE ANTINEOPLASTIC DRUGS
HYDROXYUREA AND 6-MERCPTOPURINE ON RAT EMBRYOFETAL
DEVELOPMENT.**

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Maria Regina Gomes Carneiro

The cytotoxic chemotherapeutics hydroxyurea (HU) and 6-mercaptopurine (6MP) inhibit DNA synthesis. HU inhibits the enzyme ribonucleotide reductase (RR) which converts ribonucleotides into deoxyribonucleotide leading to blockage of DNA synthesis. 6MP is activated by HGPRT and undergoes kinase reactions forming 6-thioguanine nucleotides which are erroneously incorporated into DNA. HU and 6MP are potent teratogens in rodents and affect the development of the offspring of exposed mothers. Some studies suggest that responses resulting from the combined administration of these drugs cannot be explained by the sum of individual effects however the way they interact is unclear.

In the first part of this work we investigated the dose-embryotoxic response of HU and 6MP; in the second, we analyzed the effects of sequential and concurrent exposure to both drugs on prenatal development. Embryoletality, growth retardation and induction of fetal external and skeletal abnormalities were evaluated. All the experiments included: mating of males and females; treatment of pregnant females (GD11) with HU or 6MP; cesarean section and removal of gravid uterus (GD21); clearing and staining fetuses for skeleton evaluation. In the second part of this study, the maximum non teratogenic dose of HU (250 mg/kg ip) and a clear embryotoxic dose of 6MP (24 mg/kg sc) were selected to be injected in the dams at intervals of 2 or 4 hours, or concurrently. Four experimental groups of pregnant females were constituted: Untreated; Treated with HU and vehicle; Treated with vehicle and 6MP; Treated with HU and 6MP.

Concomitant administration of HU attenuated various effects of 6MP, such as the proportion of dead and malformed fetuses, the reduction of fetal and placental weights and the increase in incidence of external/skeletal abnormalities. With sequential administration, groups treated with HU, 2 or 4 hours before, or 4 hours after 6MP didn't differ from those receiving only 6MP for most parameters assessed maternal and embryonic toxicity. HU administered 2 hours after 6MP antagonized the reduction in fetal weight. HU did not alter the frequency of external defects induced by 6MP.

Skeletal evaluation showed that when HU was injected 2 hours before 6MP there was no change of skeletal defects frequencies, except an increase of two vertebral column abnormalities; with HU being injected 2 hours after 6-MP the frequencies of some 6MP-induced anomalies remained unchanged while others decreased (in column, skull, forepaws and hind paws). There was an increased incidence of some column and hind paws anomalies and reducing of other (skull, column, forepaws and hind paws), when HU was given 4 hours before 6MP; the incidence of 6MP-induced skull anomalies has not changed, while there was an increment in the frequency of column and paws abnormalities and a reduction of forepaws malformations, when HU was administered 4 hours later.

The interactions observed in combined treatments are consistent with the interpretation that HU is eliminated in less than 2 hours and 6MP more slowly, and also with the hypothesis that interactions can occur at pharmacokinetical level. HU inhibit RR preventing the formation of 6-deoxythioguanosine triphosphate and mitigating its embryotoxic effects.

ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 - CICLO CELULAR	1
1.2 - APOPTOSE	4
1.3 - EMBRIOGÊNESE	7
1.3.1 – Período pré-implantação	7
1.3.1.1 – Expressão gênica no período pré-implantação	11
1.3.2 - Implantação	13
1.3.2.1 – Aposição	15
1.3.2.2 – Adesão	16
1.3.2.2.1 – Diferenciação do blastocisto	17
1.3.2.2.2 – Moléculas de adesão de superfície celular	19
1.3.2.2.3 – Apoptose das células do epitélio luminal uterino	21
1.3.2.2.4 - Decidualização	21
1.3.2.2.4.1 – Angiogênese e aumento da permeabilidade vascular durante a decidualização	24
1.3.2.3 – Invasão	25
1.3.2.4 - Sinalizações moleculares implicadas no processo de implantação	26
1.3.2.4.1 - Sinalização por hormônios esteroides	26
1.3.2.4.2 - Sinalização por prostaglandinas	27
1.3.2.4.3 – Sinalização por fatores de crescimento	27
1.3.2.4.4 – Sinalização por citocinas	27
1.3.2.4.5 - Sinalização por fatores de transcrição homeobox	28
1.3.2.4.6 – Sinalização por genes do desenvolvimento	29
1.3.2.4.7 - Sinalização canabinoide	30
1.3.3 - Período pós-implantação em roedores	31
1.3.3.1 – Período pré-gastrulação	31
1.3.3.2 – Processo de gastrulação	32
1.3.3.2.1 – Gastrulação em roedores	34
1.3.3.3 – Somitogênese	36
1.3.3.3.1 – Modelo “<i>clock and wavefront</i>”	38
1.3.3.3.2 – Linha primitiva e broto caudal	40
1.3.3.3.3 – Número de somitos	41

1.4 - PLACENTA	42
1.4.1 – Placenta coriovitelina e saco vitelino visceral	43
1.4.2 – Placenta corioalantóica (Hemocorial)	44
1.4.3 - Desenvolvimento da placenta corioalantoica em ratos	45
1.4.4 – Placenta: Alvo Toxocológico	48
1.5 – O PROCESSO DE OSSIFICAÇÃO	51
1.6 – MALFORMAÇÕES E VARIAÇÕES ESQUELÉTICAS	52
1.7 - DROGAS ANTITUMORAIS	55
1.7.1 – Hidroxiureia (HU)	56
1.7.1.1 – Exposição Humana	56
1.7.1.2 – Efeitos do tratamento com HU sobre a gestação humana	58
1.7.1.3 - Efeitos da HU sobre o desenvolvimento embriofetal de animais	60
1.7.1.4 – Mecanismos de ação embriotóxica da HU	60
1.7.1.5 – Farmacocinética da HU em animais	64
1.7.1.6 – Efeitos da HU sobre a placenta	65
1.7.2 – 6-Mercaptopurina (6-MP)	66
1.7.2.1 – Exposição Humana	66
1.7.1.2 – Efeitos do tratamento com 6-MP e azatioprina sobre a gestação humana	69
1.7.2.3 – Efeitos da 6-MP sobre o desenvolvimento embriofetal de animais	72
1.7.2.4 – Mecanismos de ação embriotóxica da 6-MP	72
1.7.2.5 – Efeitos da 6-MP sobre a placenta	74
1.7.3 – Administração combinada de hidroxiureia (HU) e 6-mercaptopurina (6-MP)	77
2- OBJETIVOS	81
2.1 – OBJETIVO GERAL	81
2.2 – OJETIVOS ESPECÍFICOS	82
2.2.1 – Análise das relações entre as doses de HU e 6-MP administradas a ratas no dia 11 de gravidez e as manifestações de embriotoxicidade observadas em fetos a termo. (Primeira parte do trabalho).	82
2.2.1.1 - Determinação da relação entre a dose de HU dada no DG11 e o efeito embriotóxico em ratos (DG21).	82
2.2.1.2 - Determinação da relação entre a dose de 6-MP dada no DG11 e o efeito embriotóxico em ratos (DG21).	82

2.2.2 - Investigação da hipótese de que haveria interação entre os efeitos da hidroxiuréia (HU) e da 6-mercaptopurina (6-MP) sobre o embrião de rato após tratamentos sequenciais ou concomitantes (DG11). (Segunda parte do Trabalho).	83
2.2.2.1 - Elucidação das interações entre HU (máxima dose não teratogênica) e 6-MP (dose teratogênica sub máxima), administradas concomitantemente (DG11) que são observáveis em fetos de rato a termo (DG21).	83
2.2.2.2 - Elucidação das interações da HU (máxima dose não teratogênica) administrada 2 e 4 horas depois (DG11) da 6-MP (dose teratogênica sub máxima), que são observáveis em fetos de rato a termo (DG21).	83
3 – MATERIAL E MÉTODO	84
3.1 – FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS	84
3.2 - SOLVENTES E OUTRAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS	84
3.3 – ANIMAIS	85
3.4 – PRIMEIRA FASE DO ESTUDO: ESTUDOS DOSE-EFEITO DE EMBRIOTOXICIDADE DA HU E DA 6-MP.	85
3.4.1 - Cruzamento dos Animais	85
3.4.2 – Tratamento das Ratas Grávidas	85
3.4.3 – Cesariana	86
3.4.4 - Diafanização e coloração dos fetos	86
3.4.5 – Avaliação dos esqueletos	87
3.4.6 – Análises Estatísticas	88
3.4.7 – Estabelecimento do NOAEL e NOEL	88
3.5 - SEGUNDA FASE DO ESTUDO: ESTUDO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO SEQUENCIAL DA HU E 6-MP SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE RATOS.	89
4 – RESULTADOS	91
4.1 - PRIMEIRA FASE	91
4.1.1 – Determinação da relação entre doses de HU administradas a ratas no DG11 e os efeitos embriotóxicos em ratos (DG21).	91
4.1.1.1 – Toxicidade materna, perdas gestacionais, peso do feto e da placenta, e anormalidades morfológicas detectadas no exame externo.	91
4.1.1.1.1 – Anomalias detectadas no exame externo	93
4.1.1.2 – Anormalidades do esqueleto fetal	97
4.1.1.2.1 - Esqueleto Axial	97
4.1.1.2.2 – Esqueleto Apendicular	113
4.1.1.2.2.1 – Membros anteriores	113
4.1.1.2.2.2 – Membros posteriores	117

4.1.2 – Determinação da relação entre doses de 6-MP administradas a ratas no DG11 e os efeitos embriotóxicos em ratos (DG21).	122
4.1.2.1 – Toxicidade materna, perdas gestacionais, peso do feto e da placenta, e anormalidades morfológicas detectadas no exame externo.	122
4.1.2.1.1 – Anomalias detectadas no exame externo	126
4.1.2.2 – Anormalidades do esqueleto fetal	128
4.1.2.2.1 – Esqueleto Axial	129
4.1.2.2.2 - Esqueleto Apendicular	145
4.1.2.2.2.1 – Membros anteriores	145
4.1.2.2.2.2 – Membros posteriores	150
4.2 - SEGUNDA FASE	156
4.2.1 – Estudo do efeito da administração concomitante de HU e 6-MP sobre o desenvolvimento embriofetal de ratos.	156
4.2.1.1 – Toxicidade materna, perdas gestacionais, peso do feto e da placenta, e anormalidades morfológicas detectadas no exame externo.	157
4.2.1.1.1 – Anomalias detectadas no exame externo	159
4.2.1.2 - Anormalidades do esqueleto fetal	164
4.2.1.2.1 – Esqueleto Axial	164
4.2.1.2.2 – Esqueleto Apendicular	176
4.2.1.2.2.1 – Membros anteriores	176
4.2.1.2.2.2 – Membros posteriores	180
4.2.2 - Efeito do tratamento sequencial com os fármacos antineoplásicos HU e 6-MP no DG11 sobre o desenvolvimento embrionário de ratos.	185
4.2.2.1 - Efeito da administração sequencial de fármacos antineoplásicos sobre o desenvolvimento do embrião: intervalo de 2 horas entre as injeções (HU→6-MP) no DG11.	187
4.2.2.1.1 - Toxicidade materna, perdas gestacionais, peso do feto e da placenta, e anormalidades morfológicas detectadas no exame externo.	187
4.2.2.1.1.1 - Anomalias detectadas no exame externo	188
4.2.2.1.2 - Anormalidades do esqueleto fetal	193
4.2.2.2 – Efeito da administração sequencial de fármacos antineoplásicos sobre o desenvolvimento do embrião: intervalo de 2 horas entre as injeções (6-MP→HU) no DG11.	196
4.2.2.2.1 - Toxicidade materna, perdas gestacionais, peso do feto e da placenta, e anormalidades morfológicas detectadas no exame externo.	196
4.2.2.2.1.1 - Anomalias detectadas no exame externo	197
4.2.2.2.2 - Anormalidades do esqueleto fetal	201

4.2.2.3 - Efeito da administração sequencial de fármacos antineoplásicos sobre o desenvolvimento do embrião: intervalo de 4 horas entre as injeções (HU→ 6-MP) no DG11.	204
4.2.2.3.1 - Toxicidade materna, perdas gestacionais, peso do feto e da placenta, e anormalidades morfológicas detectadas no exame externo.	204
4.2.2.3.1.1 - Anomalias detectadas no exame externo	205
4.2.2.3.2 - Anormalidades do esqueleto fetal	209
4.2.2.4 - Efeito da administração sequencial de fármacos antineoplásicos sobre o desenvolvimento do embrião: intervalo de 4 horas entre as injeções (6-MP→ HU) no DG11.	214
4.2.2.4.1 - Toxicidade materna, perdas gestacionais, peso do feto e da placenta, e anormalidades morfológicas detectadas no exame externo.	214
4.2.2.4.1.1 - Anomalias detectadas no exame externo	215
4.2.2.4.2 - Anormalidades do esqueleto fetal	219
4.2.3 - Síntese dos efeitos embriotóxicos resultantes das administrações concomitante e sequencial de HU E 6-MP em ratos	224
5 - DISCUSSÃO	237
5.1- PRIMEIRA FASE	237
5.1.1 - Determinação da relação entre doses da HU e 6-MP administradas a ratas no DG11 e os efeitos embriotóxicos em fetos (DG21).	237
5.1.1.1 - Desenho experimental e desenvolvimento embrionário	237
5.1.1.2 - Toxicidade materna, perdas gestacionais, peso do feto e da placenta, e anormalidades morfológicas detectadas no exame externo.	238
5.1.1.2.1 - Hidroxiureia (HU)	238
5.1.1.2.2 - 6 - mercaptopurina (6-MP)	239
5.1.1.3 – Curvas dose-efeito teratogênico da HU e 6-MP: Anormalidades do esqueleto fetal	240
5.2 – SEGUNDA FASE	244
5.2.1 – Rediscutindo os estudos utilizando administração combinada de hidroxiureia (HU) e 6-mercaptopurina (6-MP)	244
5.2.3 – Discussão dos achados dos estudos dos efeitos da administração concomitante e sequencial de HU e 6-MP sobre o desenvolvimento embriofetal de ratos.	246
6 - CONCLUSÃO	250
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	252
ANEXOS	268

LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.1.1:** Ganho de peso durante a gravidez de ratas tratadas (DG11) com HU.
- Tabela 4.1.2:** Efeito embriotóxico do tratamento concomitante de ratas grávidas com HU (DG11). Análise dos parâmetros obtidos por ocasião da cesária (DG21).
- Tabela 4.1.3:** Tipos e frequências de anomalias detectadas pelo exame externo na prole (DG21) de ratas que receberam tratamento HU durante a gravidez (DG11).
- Tabela 4.1.4:** Tipos e frequências de anomalias dos ossos do crânio induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.
- Tabela 4.1.5:** Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos do crânio induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.
- Tabela 4.1.6:** Tipos e frequências de anomalias dos ossos da coluna vertebral, induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.
- Tabela 4.1.7:** Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos da coluna vertebral, induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.
- Tabela 4.1.8:** Tipos e frequências de anomalias da costela induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.
- Tabela 4.1.9:** Tipos e frequências de alterações da ossificação da costela induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, DG11.
- Tabela 4.1.10:** Tipos e frequências de anomalias dos ossos do esterno induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.
- Tabela 4.1.11:** Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos do esterno induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.
- Tabela 4.1.12:** Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros anteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no dia DG11.
- Tabela 4.1.13:** Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos dos membros anteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, DG 11.
- Tabela 4.1.14:** Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros posteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.
- Tabela 4.1.15:** Tipos e frequências de alterações na ossificação dos ossos dos membros posteriores, induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.
- Tabela 4.1.16:** Ganho de peso durante a gravidez de ratas tratadas (DG11) 6-MP.
- Tabela 4.1.17:** Efeito embriotóxico do tratamento de ratas grávidas com 6-MP (DG11). Análise dos parâmetros obtidos por ocasião da cesária (DG21).

Tabela 4.1.18: Tipos e frequências de anomalias detectadas pelo exame externo na prole (DG21) de ratas que receberam tratamento 6-MP durante a gravidez (DG11).

Tabela 4.1.19: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do crânio induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

Tabela 4.1.20: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos do crânio induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

Tabela 4.1.21: Tipos e frequências de anomalias dos ossos da coluna vertebral induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com a 6-MP, no DG11.

Tabela 4.1.22: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos da coluna vertebral induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

Tabela 4.1.23: Tipos e frequências de anomalias das costelas induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

Tabela 4.1.24: Tipos e frequências de alterações da ossificação das costelas induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no dia DG11.

Tabela 4.1.25: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do esterno induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

Tabela 4.1.26: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos do esterno induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

Tabela 4.1.27: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros anteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

Tabela 4.1.28: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos dos membros anteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

Tabela 4.1.29: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros posteriores, induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

Tabela 4.1.30: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos dos membros posteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

Tabela 4.2.1: Ganho de peso corporal durante a gravidez de ratas tratadas concomitantemente (DG11) com HU+NaOH, Salina+6-MP ou HU+6MP. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.2: Efeito embriotóxico do tratamento concomitante de ratas grávidas com HU+NaOH, Salina+6-MP e HU+6MP (DG11). Análise dos parâmetros obtidos por ocasião da cesária (DG21). HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.3: Tipos e frequências de anomalias detectadas pelo exame externo na prole (DG21) de ratas que receberam tratamento concomitante com HU+NaOH, Salina+6-MP e HU+6MP durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.4: Tipos e frequências de anormalidades (malformações) de ossos do crânio induzidas na prole (DG21) de ratas que receberam tratamento concomitante com HU+NaOH, Salina+6-MP e HU+6MP, durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.5: Tipos e frequências de anormalidades (variações) de ossos do crânio induzidas na prole (DG21) de ratas que receberam tratamento concomitante com HU+NaOH, Salina+6-MP e HU+6MP, durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.6: Tipos e frequências de anormalidades (malformações) de ossos da coluna vertebral induzidas na prole (DG21) de ratas que receberam tratamento concomitante com HU+NaOH, Salina+6-MP e HU+6MP, durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.7: Tipos e frequências de anormalidades (variações) de ossos da coluna vertebral induzidas na prole (DG21) de ratas que receberam tratamento concomitante com HU+NaOH, Salina+6-MP e HU+6MP, durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.8: Tipos e frequências de anormalidades (malformações) de ossos da costela induzidas na prole (DG21) de ratas que receberam tratamento concomitante com HU+NaOH, Salina+6-MP e HU+6MP, durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.9: Tipos e frequências de anormalidades (variações) de ossos da costela induzidas na prole (DG21) de ratas que receberam tratamento concomitante com HU+NaOH, Salina+6-MP e HU+6MP, durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.10: Tipos e frequências de anormalidades (malformações) de ossos do esterno induzidas na prole (DG21) de ratas que receberam tratamento concomitante com HU+NaOH, Salina+6-MP e HU+6MP, durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.11: Tipos e frequências de anormalidades (variações) de ossos do esterno induzidas na prole (DG21) de ratas que receberam tratamento concomitante com HU+NaOH, Salina+6-MP e HU+6MP, durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.12: Tipos e frequências de anormalidades (malformações) dos ossos dos membros anteriores registradas na prole (DG21) de ratas tratadas concomitantemente com HU+NaOH, Salina+6MP e HU+6-MP, durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.13: Tipos e frequências de anormalidades (variações) dos ossos dos membros anteriores registradas na prole (DG21) de ratas tratadas concomitantemente com HU+NaOH, Salina+6MP e HU+6-MP, durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.14: Tipos e frequências de anormalidades (malformações) dos ossos dos membros posteriores registradas na prole (DG21) de ratas tratadas concomitantemente com HU+NaOH, Salina+6MP e HU+6-MP, durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.15: Tipos e frequências de anormalidades (variações) dos ossos dos membros posteriores registradas na prole (DG21) de ratas tratadas concomitantemente com HU+NaOH, Salina+6MP e HU+6-MP, durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.16: Ganho de peso corporal durante a gravidez de ratas tratadas sequencialmente (DG11) com HU→NaOH, Salina→6-MP e HU→6MP, com um intervalo de 2 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.17: Efeito embriotóxico do tratamento sequencial de ratas grávidas com HU→NaOH, Salina→6-MP e HU→6MP (DG11), com um intervalo de 2 horas entre as injeções: Análise dos parâmetros obtidos por ocasião da cesária (DG21). HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.18: Tipos e frequências de anomalias detectadas pelo exame externo na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com HU→NaOH, Salina→6-MP e HU→6MP durante a gravidez (DG11), com um intervalo de 2 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.19: Tipos e frequências de anormalidades do esqueleto axial do feto induzidas na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com HU→NaOH, Salina→6-MP e HU→6MP durante a gravidez (DG11), com um intervalo de 2 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.20: Tipos e frequências de anormalidades de ossos dos membros anteriores e posteriores induzidas na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com HU→NaOH, Salina→6-MP e HU→6MP durante a gravidez (DG11), com um intervalo de 2 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.21: Ganho de peso corporal durante a gravidez de ratas tratadas sequencialmente (DG11) com NaOH→HU, 6-MP→Salina e 6-MP→HU, com um intervalo de 2 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.22: Efeito embriotóxico do tratamento sequencial de ratas grávidas com NaOH→HU, 6-MP→Salina e 6-MP→HU (DG11), com um intervalo de 2 horas entre as injeções: Análise dos parâmetros obtidos por ocasião da cesária (DG21). HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.23: Tipos e frequências de anomalias detectadas pelo exame externo na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com NaOH→HU, 6-MP→Salina e 6-MP→HU durante a gravidez (DG11), com um intervalo de 2 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.24: Tipos e frequências de anormalidades do esqueleto axial do feto induzidas na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com NaOH→HU, 6-MP→Salina e 6-MP→HU durante a gravidez (DG11), com um intervalo de 2 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.25: Tipos e frequências de anormalidades de ossos dos membros anteriores e posteriores induzidas na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com NaOH→HU, 6-MP→Salina e 6-MP→HU durante a gravidez (DG11), com um intervalo de 2 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.26: Ganho de peso corporal durante a gravidez de ratas tratadas sequencialmente (DG11) com HU→NaOH, Salina→6-MP e HU→6MP, com um intervalo de 4 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.27: Efeito embriotóxico do tratamento sequencial de ratas grávidas com HU→NaOH, Salina→6-MP e HU→6MP (DG11), com um intervalo de 4 horas entre as injeções: Análise dos parâmetros obtidos por ocasião da cesária (DG21). HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.28: Tipos e frequências de anomalias detectadas pelo exame externo na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com HU→NaOH, Salina→6-MP e HU→6MP durante a gravidez (DG11), com um intervalo de 4 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.29: Tipos e frequências de anormalidades do esqueleto axial do feto induzidas na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com HU→NaOH, Salina→6-MP e HU→6MP durante a gravidez (DG11), com um intervalo de 4 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.30: Tipos e frequências de anormalidades de ossos dos membros anteriores induzidas na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com HU→NaOH, Salina→6-MP e HU→6MP durante a gravidez (DG11), com um intervalo de 4 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.31: Tipos e frequências de anormalidades de ossos dos membros posteriores induzidas na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com HU→NaOH, Salina→6-MP e HU→6MP durante a gravidez (DG11), com um intervalo de 4 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.32: Ganho de peso corporal durante a gravidez de ratas tratadas sequencialmente (DG11) com NaOH→HU, 6-MP→Salina e 6-MP→HU, com um intervalo de 4 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.33: Efeito embriotóxico do tratamento sequencial de ratas grávidas com NaOH→HU, 6-MP→Salina e 6-MP→HU (DG11), com um intervalo de 2 horas entre as injeções: Análise dos parâmetros obtidos por ocasião da cesária (DG21). HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.34: Tipos e frequências de anomalias detectadas pelo exame externo na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com NaOH→HU, 6-MP→Salina e 6-MP→HU durante a gravidez (DG11), com um intervalo de 4 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.35: Tipos e frequências de anormalidades do esqueleto axial do feto induzidas na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com NaOH→HU, 6-MP→Salina e 6-MP→HU durante a gravidez (DG11), com um intervalo de 4 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.36: Tipos e frequências de anormalidades de ossos dos membros anteriores induzidas na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com NaOH→HU, 6-MP→Salina e 6-MP→HU durante a gravidez (DG11), com um intervalo de 4 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Tabela 4.2.37: Tipos e frequências de anormalidades de ossos dos membros posteriores induzidas na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com NaOH→HU, 6-MP→Salina e 6-MP→HU durante a gravidez (DG11), com um intervalo de 4 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1.1: Esquema do ciclo celular de mamíferos.

Figura 1.2: Blastocisto recém-formado.

Figura 1.3: Estágios do desenvolvimento pré-implantação e principais eventos.

Figura 1.4: Alterações morfológicas e especificação das linhagens celulares durante o desenvolvimento de camundongos, da mórula ao ovo cilíndrico.

Figura 1.5: Movimentos morfogenéticos da gastrulação

QUADRO I: Resultados de estudos relatando o acompanhamento da gestação de mulheres com doenças falciformes, tratadas com HU.

Figura 1.6: Esquema do metabolismo da 6-mercaptopurina (6-MP) e sítio de ação da hidroxiureia (HU).

QUADRO II: Anomalias congênitas observadas entre filhos de mulheres tratadas com AZA e 6-MP durante a gravidez, listadas por POLIFKA & FRIEDMAN, 2002.

Figura 3.1: Desenho Experimental empregado nos estudos de embriotoxicidade.

Figura 3.2: Representação esquemática do esqueleto do rato adulto.

QUADRO III: Desenho experimental empregado nos estudos dos efeitos das exposições combinadas (concomitantes e sequenciais) a HU e 6-MP – Segunda fase.

Figura 4.1: Malformações externas induzidas pela 6-MP (24 mg/kg).

Figura 4.2.3.1: Malformações do esqueleto axial induzidas pela 6-MP, cujas incidências foram modificadas pela administração concomitante ou sequencial de HU.

Figura 4.2.3.2: Malformações dos membros anteriores e posteriores induzidas pela 6-MP, cujas incidências foram modificadas pela administração concomitante ou sequencial de HU.

Figura 4.2.3.3: Efeitos resultantes da exposição concomitante à HU e 6-MP sobre as incidências de malformações do esqueleto axial fetal. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

Figura 4.2.3.4: Efeitos resultantes da exposição concomitante à HU e 6-MP sobre as incidências de malformações dos ossos dos membros anteriores e posteriores.

Figura 4.2.3.5: Efeitos resultantes da exposição sequencial à HU e 6-MP sobre as incidências de malformações do esqueleto axial fetal, utilizando um intervalo de 2 horas entre os tratamentos.

Figura 4.2.3.6: Efeitos resultantes da exposição sequencial à 6-MP e HU, sobre as incidências de malformações do esqueleto axial fetal, utilizando um intervalo de 2 horas entre os tratamentos.

Figura 4.2.3.7: Efeitos resultantes da exposição sequencial à 6-MP e HU sobre as incidências de malformações dos ossos dos membros anteriores e posteriores, utilizando um intervalo de 2 horas entre os tratamentos.

Figura 4.2.3.8: Efeitos resultantes da exposição sequencial à HU e 6-MP sobre as incidências de malformações do esqueleto axial fetal, utilizando um intervalo de 4 horas entre os tratamentos.

Figura 4.2.3.9: Efeitos resultantes da exposição sequencial à HU e 6-MP sobre as incidências de malformações do esqueleto apendicular anterior e posterior fetal, utilizando um intervalo de 4 horas entre os tratamentos.

Figura 4.2.3.10: Efeito resultante da exposição sequencial à 6-MP e HU sobre as incidências de malformações do esqueleto axial fetal, utilizando um intervalo de 4 horas entre os tratamentos.

Figura 4.2.3.11: Efeitos resultantes da exposição sequencial à 6-MP e HU sobre as incidências de malformações do esqueleto apendicular anterior e posterior fetal, utilizando um intervalo de 4 horas entre os tratamentos.

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

- CDK:** ciclina dependente de cinase
- DNA:** ácido desoxirribonucleico
- e.g.:** por exemplo (*exempli gratia*)
- et al.:** e colaboradores (*et alii*)
- HU:** hidroxiureia
- i.e.:** isto é (*id est*)
- i.p.:** intraperitoneal
- 6-MP:** 6-mercaptopurina
- Mdm2:** *mouse double minutes*
- dAMP:** monofosfato de desoxiadenosina
- dCMP:** monofosfato de desoxicitidina
- dTMP:** monofosfato de desoxitimidina
- dUMP:** monofosfato de desoxiuridina
- NOAEL:** *no observed adverse effect level*
- NOEL:** *no observed effect level*
- PG:** propil-galato
- pool:** conjunto; população
- s.c.:** subcutânea
- ³H-Tdr:** timidina tritiada
- ATP:** trifosfato de adenosina
- CTP:** trifosfato de citidina
- GTP:** trifosfato de guanosina
- dATP:** trifosfato de desoxiadenosina
- dCTP:** trifosfato de desoxicitidina
- dGTP:** trifosfato de desoxiguanosina
- dNTP:** trifosfato de desoxirribonucleotídeo
- dTTP:** trifosfato de desoxitimidina
- dUTP:** trifosfato de desoxiuridina
- TGN(s):** tioguanina nucleotídeo(s)
- TPNH:** *reduced triphospho-pyridine-nucleotide* (NADPH)
- turnover:** reciclagem; reaproveitamento
- MCI:** massa celular interna

TE: trofoectoderma

RNA: ácido ribonucleico

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

gap junctions: junções de hiato; nexos; junções comunicantes

Cdx2: fator de transcrição “*caudal*”

Oct4: proteína *octamer 4*

TGPs: células trofoblásticas gigantes primárias

DG: dia de gestação

MEC: matriz extracelular

MMPs: metaloproteinases da matriz extra celular

TIMPs: inibidores de metaloproteinases da matriz extra celular

TNF α : fator de necrose tumoral α

TNF α R: receptor de TNF α

ZDP: zona de decidualização primária

TGSs: células trofoblásticas gigantes secundárias

Vegf: gene codificados de VEGF

ER: receptor nuclear estrogênio

PR: receptor nuclear progesterona

VEGF: fator de permeabilidade vascular

uNK: células *natural killer* uterinas

ERES: elementos estrogênio-responsivos

COX2: ciclo-oxigenase-2

PPAR (*Peroxisome proliferator-activated receptor*): receptor de proliferadores de peroxissomos

HB-EGF (*Heparin-binding EGF-like growth factor*):

EGF (*epidermal growth factor*): fator de crescimento epidérmico

LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*): fator inibidor de leucemia

IL: interleucina

LIFR: receptor de LIF

IL-R: receptor de interleucina

Hoxa: proteína codificada por gene *homeobox*

Msx: proteína codificada por gene homólogo ao gene “*muscle-segment homeobox*” de *Drosophila*.

IHH: proteína *hedgehog* indiana

Ihh: gene codificador de IHH

BMPs (*bone morphogenic proteins*): proteínas morfogenéticas ósseas

MPS: mesoderma pré-somático

Her/Hes: fatores de transcrição da família “*hairy and enhancer of split*”

Lfng: gene que codifica proteína Lunatic fringe

feedback negativo: alça de retroalimentação negativa

downstream: à jusante; rio abaixo

Wnt: proteína homóloga à proteína *Wingless* de *Drosophila*

Dll: gene conservado homólogo do gene “*distal less*” de *Drosophila*

FGF (fibroblast growth factor): fator de crescimento do fibroblasto

MAP-quinase: proteíno-quinases ativadas por mitógenos

PI-3-quinase: fosfoinositídeo 3-quinase

Akt (PKB): proteína quinase B

Gsk3 β (*glycogen synthase kinase 3 β*): quinase glicogênio sintase

A-P: eixo anteroposterior

Hox: genes *homeobox*

Cdx: gene conservado homólogo ao gene “*caudal*” ou “*cad*” de *Drosophila*

SVV: saco vitelino visceral

TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina

PTH : hormônio da paratireoide

dumb-bell: haltere

6-MPr: 6-mercaptopurina ribosídeo

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - CICLO CELULAR

O ciclo de crescimento e divisão celular de células de mamíferos é um processo de cinco etapas cuja função básica é duplicar, acuradamente, a enorme quantidade de *DNA* presente nos cromossomas, e segregar, precisamente, as suas cópias em duas células filhas geneticamente idênticas (Fig. 1.1). Esses processos definem as duas principais fases do ciclo celular: a fase S (fase de síntese) e a fase M (mitose). (ALBERTS *et al.*, 2002).

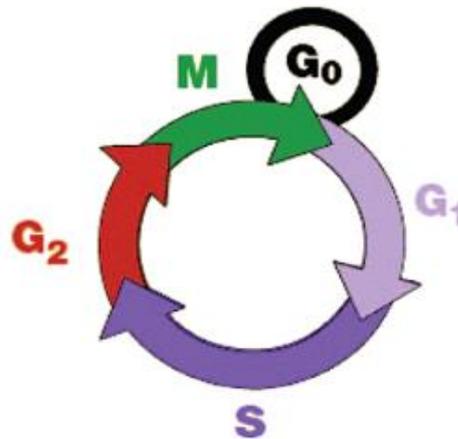


Fig. 1.1: Esquema do ciclo celular de mamíferos.

G₀ – Fase de Repouso: nesta fase as células se encontram em estado de quiescência, *i.e.*, não estão ciclando. A duração desta fase pode variar de poucas horas a vários anos. Quando as células recebem sinalização para se reproduzirem, progridem para fase G₁; **G₁ – Fase Pós-Mitótica:** esta é uma fase preparatória para duplicação do *DNA*, durante a qual a célula sintetiza todas as proteínas (incluindo enzimas), nucleotídeos, e demais constituintes necessários para que a síntese de *DNA* ocorra. A duração da G₁ pode variar de horas a dias; **S - Fase de Síntese:** nesta fase ocorre, exclusivamente, a síntese de *DNA*, e das proteínas (histonas) que se associam à molécula, o que pode levar de 10 a 20 horas; **G₂ – Fase Pré-Mitótica:** nesta fase, proteínas e *RNAs* adicionais são sintetizados; pode durar de 2 a 10 horas; **M – Mitose:** fase em que as células se dividem, gerando duas células filhas idênticas. A fase M dura de 30 a 60 minutos.

A célula cresce continuamente durante a intérfase, que abrange as fases G₁, S e G₂, enquanto a duplicação do *DNA* restringe-se à fase S (fase de síntese), que é muito longa e corresponde à aproximadamente metade do tempo total do ciclo celular. Depois da fase S, ocorre a segregação cromossômica e a divisão celular, durante a fase M (mitose). (ALBERTS *et al.*, 2002; WEIMBERG, 2008). A mitose, ou divisão nuclear, envolve uma série de eventos encadeados, mas é descrita em quatro subfases: prófase, metáfase, anáfase e telófase. Durante a prófase, ocorre a condensação dos cromossomos e a montagem dos centrossomos nos dois polos celulares. Na metáfase, os cromossomos alinham-se ao longo de um plano (equatorial imaginário) que divide a célula, e ligam-se às fibras dos microtúbulos do fuso mitótico, enquanto a membrana nuclear desaparece. Durante a anáfase, as duas metades de cada cromossomo (cromátides) são separadas pelo fuso mitótico, e migram em direção aos polos opostos. Durante a telófase, pouco depois da formação de dois conjuntos cromatídicos, um em cada polo, as cromátides se descondensam, e uma nova membrana nuclear é formada em torno de cada um dos conjuntos (agora denominados cromossomos). (WEIMBERG, 2008).

A progressão do ciclo celular é dirigida por uma família proteica, as CDKs (cinases dependentes de ciclinas), que são positivamente e negativamente reguladas por ciclinas e CDKIs (inibidores de CDKs), respectivamente. O perfil da expressão de ciclinas varia de acordo com a progressão do ciclo celular, e define a posição relativa do ciclo celular em que a célula se encontra. As CDKs são inativas até se associarem às suas respectivas ciclinas, formando complexos ciclina/CDK, que são ativados por fosforilação em sítios específicos das CDKs. As CDKs complexadas passam a ativar (fosforilar) as proteínas necessárias para cada uma das etapas do ciclo celular, especificamente em seus resíduos de serina e treonina. A proteína retinoblastoma (pRb), que é produto de um gene supressor de tumor, está intimamente envolvida na regulação da transição da fase G₁-S. (SHAH & SCHWARTZ, 2001).

Em mamíferos, os principais reguladores da proliferação celular são as ciclinas D (ciclinas D1, D2 e D3), também conhecidas como ciclinas G₁. Essas ciclinas são acumuladas durante a fase G₁, e suas associações com cdk4 e cdk6 fazem com que a célula entre na fase S. A pRb e seus membros familiares p107 e p130 regulam negativamente as ciclinas D, e a inativação desses reguladores (por fosforilação), permite que a célula progrida no ciclo celular. A super-expressão de ciclinas D encurtam a fase G₁, permitindo que a célula entre rapidamente na fase S. Já as ciclinas A e B estão envolvidas na progressão da fase S para fase G₂-M. A ligação das ciclinas A ou B à cdk1 induz a fosforilação e a ativação do complexo, que é essencial para transição para fase G₂-M, enquanto o complexo ciclina A/cdk2 participa da progressão na fase S. De um modo geral, a ação das cdk é reprimida por, pelo menos, duas famílias de inibidores, p16 e p21. A família p16 (incluindo p15, p16, p18 e p19) inibe os

parceiros catalíticos das ciclinas D, que são cdk4 e cdk6, enquanto a família p21 (p21, p27 e p57) inibem outras cdk. Esses inibidores são acumulados nas células quiescentes, mas estão regulados negativamente durante a proliferação. O balanço entre reguladores positivos e negativos do ciclo celular é a chave para decisão da célula entrar ou não em divisão. (DEY *et al.*, 2004).

A célula dispõe de uma série de mecanismos de vigilância que monitoram cada etapa da progressão do ciclo celular, e só permitem que a célula prossiga para a etapa seguinte, se todos os pré-requisitos tiverem sido satisfeitos. Estes mecanismos de monitoramento são chamados de pontos de verificação (*checkpoints*). Por exemplo, um ponto de verificação assegura que a célula não avançará de G₁ para S, se o genoma necessitar de reparo. Outro ponto de verificação, operando em S, desacelerará ou introduzirá uma pausa no processo de replicação, em resposta a algum dano ao *DNA*. Um terceiro ponto de verificação só permitirá que a célula prossiga de G₂ para M, se a duplicação do *DNA* ocorrida em S tiver sido completa. O dano ao *DNA* desencadeia outro tipo de controle de ponto de verificação, que bloqueia a entrada na fase M. (WEIMBERG, 2008).

1.2 – APOPTOSE

Apoptose, ou “morte celular programada”, refere-se a um tipo de morte não acidental, que constitui um processo ativo e dependente de energia, no qual as células participam da sua própria destruição (SHAH *et al.*, 2001). Apoptose ocorre nas mais diversas situações, tais como, na organogênese, na hematopoiese, na reposição fisiológica de diversos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após terem sofrido algum dano celular irreparável. Durante o desenvolvimento embrionário, por exemplo, muitas células produzidas em excesso são levadas à morte apoptótica que, neste caso, participa da formação de órgãos e tecidos. (GRIVICICH *et al.*, 2007).

Os processos de progressão do ciclo celular e apoptose envolvem interações sistemáticas e coordenadas entre várias famílias proteicas, e, apesar de serem processos distintos, estão intimamente relacionados e são absolutamente essenciais para o desenvolvimento e manutenção da estabilidade (equilíbrio entre proliferação e morte celular) de inúmeros tecidos. O gene supressor de tumor *p53*, que codifica a fosfoproteína nuclear p53, desempenha um papel central, tanto na regulação da progressão do ciclo celular, como na indução da apoptose. (SHAH *et al.*, 2001).

A célula, em condições normais, sintetiza altas taxas de p53, que prontamente se associam às proteínas Mdm2, sendo então direcionadas para ubiquitilação e degradação proteossômica. Entretanto, em resposta a determinados estímulos (agentes ambientais ou sinais fisiológicos), a degradação da p53 é bloqueada, resultando em um rápido aumento dos seus níveis intracelulares. Em seguida a proteína é ativada, por meio de modificações pós-traducionais, atuando como um fator de transcrição. Assim sendo, o fator de transcrição p53 pode:

- Forçar a célula a interromper o seu avanço pelo ciclo celular (função citostática), por meio da indução da expressão da proteína p21 (inibidora de complexos ciclina-CDKs de várias fases), e, simultaneamente, mobilizar componentes da maquinaria de reparo de dano ao *DNA*. Neste caso, se a parada da progressão do ciclo celular ocorrer em G1, p53 impedirá a passagem da célula que sofreu dano ao *DNA*, para fase S, até que o mesmo seja reparado. Caso a célula danificada já tenha avançado para fase S, nesta ficará aprisionada até que o reparo seja concluído. No momento em que o *DNA* é reparado com sucesso, a p53 induz a transcrição da proteína Mdm2, agente de sua própria destruição, com a qual se associa novamente, promovendo o avanço do ciclo celular.

- Desencadear a ativação do programa apoptótico, por meio da indução da expressão de várias proteínas pró-apoptóticas e da inibição concomitante de genes que especificam proteínas antiapoptóticas, quando os danos ao *DNA* não forem passíveis de reparo.

Vários agentes, ou estímulos, são capazes de induzir um rápido aumento dos níveis de p53, incluindo raios X, radiação UV, drogas quimioterápicas que danificam o *DNA*, inibidores da síntese de *DNA* e RNA, depleção do *pool* intracelular de nucleotídeos precursores de *DNA*, agentes que atuam sobre componentes do citoesqueleto, hipóxia, sinalização de oncogenes, etc. A escolha de um ou outro modo de ação da p53, parece depender do tipo e da gravidade do estresse fisiológico ou do dano genético ocorrido, do tipo celular, bem como da presença de outros sinais pró e antiapoptóticos celulares operantes. (WEINBERG, 2008).

O programa apoptótico pode ser realizado através de duas vias distintas, a via extrínseca e a via intrínseca (mitocondrial), ambas culminando com a ativação de cisteína-proteases conhecidas como caspases. O processo de apoptose compreende uma etapa de ativação, na qual as caspases tornam-se cataliticamente ativas, e uma etapa de execução, conduzida por caspases efetoras que irão degradar vários substratos de morte, tais como, cinases, proteínas do citoesqueleto (laminina, actina, vimentina), proteínas relacionadas com o reparo do *DNA*, e inibidores de endonucleases. Estes eventos levam à destruição das funções vitais, e, conseqüentemente ao aparecimento de modificações morfológicas celulares características, a saber: contração do citoplasma, condensação da cromatina, fragmentação do *DNA* e formação dos corpos apoptóticos. (SHAH *et al.*, 2001; PARISOTO, 2011)

A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana, os receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF) - "receptores de morte celular". Quando os receptores de morte são ativados por seus respectivos ligantes, os seus domínios de morte interagem com uma proteína adaptadora, conhecida como FADD (*Fas-associated death domain*). O complexo resultante recruta formas pró-enzimáticas inativas da caspase8, ou caspase 10 (procaspases 8, ou 10), promovendo a sua autoclivagem e a sua conversão em proteínas ativas (caspases 8, ou 10). A caspase8/10 iniciadora desencadeia uma cascata de ativação de outras caspases (caspases efetoras), incluindo as caspases 3, 6 e 7, resultando na clivagem de substratos de morte.

A via intrínseca (mitocondrial) é ativada por estresse fisiológico, pela ocorrência de danos ao *DNA*, hipóxia, etc. Neste processo o citocromo c é o ator central. O citocromo c normalmente reside no espaço entre as membranas mitocondriais, interna e externa, e atua na transferência de elétrons (fosforilação oxidativa). Quando determinados sinais atingem esta organela, ocorre a despolarização (permeabilização) da sua membrana externa, fazendo com

que o citocromo c seja liberado para o citoplasma. Uma vez no citosol, o citocromo c associa-se a proteína Apaf-1 (*apoptosis activating factor-1*), formando um complexo (apoptossomo), que ativa a procaspase 9. A caspase 9 cliva a procaspase 3, e assim, sucessivamente. (WEINBERG, 2008; PARISOTO, 2011).

1.3 - EMBRIOGÊNESE

1.3.1 - PERÍODO PRÉ-IMPLANTAÇÃO:

O período pré-implantação tem início com a fertilização e prossegue, a partir de um zigoto formado por uma célula, até o blastocisto. Trata-se de um período marcado por eventos únicos e críticos, incluindo o início da transcrição zigótica, a primeira diferenciação celular e a iniciação de adesão específica célula-célula. (KO *et al.*, 2000; HAMATANI *et al.*, 2004; GUO *et al.*, 2010).

O desenvolvimento e a diferenciação do embrião são processos que requerem a ativação do genoma zigótico (DEY *et al.*, 2004). Em camundongos, o crescimento do ovócito é interrompido na prófase da primeira meiose. Este ovócito é transcricionalmente ativo, mas um grande número de mRNAs não são traduzidos imediatamente, e sim estocados e utilizados para sua própria maturação meiótica. A fertilização leva ao término da meiose, e é seguida pela formação de um embrião de 1 célula contendo dois pronúcleos haploides, um materno e um paterno. Cada pronúcleo replica o seu DNA e entra na primeira mitose, produzindo um embrião de 2 células diploides (HAMATANI *et al.*, 2004). A maturação meiótica leva à degradação maciça dos transcritos maternos, e um evento imprescindível ocorre: Ativação do Genoma Zigótico, isto é, a transcrição a partir do genoma do embrião. (KO *et al.*, 2000; DEY *et al.*, 2004; HAMATANI *et al.*, 2004).

Em ratos e camundongos, o desenvolvimento normal dos embriões pré-implantação, isto é, a proliferação e da diferenciação celular, dependem da presença de hormônios esteroides ovarianos (estrogênio e progesterona), que atuam indiretamente, controlando a expressão de fatores promotores do crescimento embrionário oriundos do trato reprodutivo, bem como de vários outros fatores expressos pelo próprio embrião (DEY *et al.*, 2004).

O ovo ou zigoto formado, a partir da união dos pronúcleos masculino e feminino, geralmente é assimétrico, apresentando um polo animal (futuro ectoderma e mesoderma) e um polo vegetal (futuro endoderma), e coberto por camadas protetoras. O envoltório glicoproteico mais interno, que está em contato direto com o zigoto, nos mamíferos, é denominado de zona pelúcida. O desenvolvimento do embrião ocorre dentro da zona pelúcida, cuja natureza não adesiva permite o seu deslocamento em direção ao útero (DEY *et al.*, 2004).

Durante o seu transporte para o útero através da tuba uterina, o zigoto sofre sucessivas clivagens (divisões mitóticas sem aumento do volume citoplasmático), originando células progressivamente menores, denominadas blastômeros. A clivagem resulta em embriões com

dois blastômeros, quatro blastômeros, e assim por diante, até a formação da mórula e, posteriormente, da blástula. (MONTANARI, 2013).

No estágio de 8-16 células, os embriões sofrem o processo de compactação, durante o qual, as células que até então se encontravam frouxamente associadas, começam a formar, graças ao surgimento de adesões celulares, uma massa celular organizada – a mórula, resultante da formação de um epitélio polarizado e comunicante. Então, após a compactação e a polarização dos blastômeros, promovidas por junções celulares comunicantes (*gap junctions*), junções de oclusão (*tight junctions*), e de adesão, tem-se um embrião constituído por células totipotentes (capazes de originar todos os tecidos), apresentando uma superfície apical voltada para o exterior e uma basal voltada para o interior. (KO *et al.*, 2000; HAMATANI *et al.*, 2004; ARMANT, 2005; MONTANARI, 2013).

A mórula, então representada por um pequeno grupo de células basais, rodeadas por um número maior de células apicais, será o ponto de partida para a diferenciação em massa celular interna e trofoectoderma, que originarão, respectivamente, embrião e placenta. (KO *et al.*, 2000; HAMATANI *et al.*, 2004; ARMANT, 2005).

A partir deste estágio, começará a ocorrer uma expressão gênica diferencial¹, que vai conferir destinos celulares distintos aos blastômeros, dependendo das suas posições na mórula, ou seja, de suas informações posicionais². Isso significa dizer, por exemplo, que os blastômeros de superfície e os blastômeros mais internos receberão estímulos diferentes e originarão tipos celulares diferentes, dependendo, tanto das interações célula-célula, como das

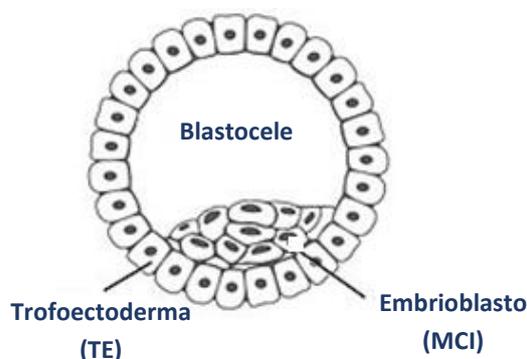
¹ Na embriogênese, as células que derivam do mesmo ovo, apesar de terem um genoma idêntico, estabelecem diferentes programas de expressão gênica, isto é, exibem uma expressão gênica diferencial, e produzem os diversos tipos celulares. A expressão gênica diferencial pode ser definida como a síntese de uma proteína (ou RNA, no caso de genes não codificadores) em um subconjunto de células que formam um embrião. Em geral, a expressão gênica diferencial é regulada, principalmente, ao nível da iniciação da transcrição (transcrição *de novo*), mas existem mecanismos pós-transcricionais que, em menor grau, também são capazes de promovê-la. (WATSON *et al.*, 2015).

² A influência da localização no desenvolvimento é chamada informação posicional. O modo mais comum de estabelecer uma informação posicional envolve moléculas de sinalização, sintetizadas e secretadas por um pequeno grupo de células. Essas moléculas podem ser distribuídas no meio extracelular de tal maneira, que células localizadas próximas às suas origens recebam altas concentrações da proteína secretada e se desenvolvam num determinado tipo celular, enquanto que as progressivamente mais distantes sigam outros caminhos de desenvolvimento. (WATSON *et al.*, 2015).

interações das células com fatores externos, tais como fatores de transcrição. (GUO *et al.*, 2010; WATSON *et al.*, 2015).

A compactação dos blastômeros provoca o surgimento de uma cavidade denominada blastocele, que recebe fluidos do meio externo, interiorizados por meio de canais de água e de sódio. O embrião, nesse momento, torna-se uma vesícula blastocélica que, nos mamíferos, vem a ser o blastocisto.

No blastocisto inicial (32-64 células), dois tipos celulares recém-formados são claramente distinguíveis: uma massa celular interna (MCI) ou embrioblasto, constituída por células pluripotentes; uma camada superficial composta por células diferenciadas, denominada trofoectoderme (TE); uma blastocele repleta de líquido. (Figura 1.2).



(Adaptado de <https://pt.wikipedia.org/wiki/Blastula>)

Fig. 1.2: Blastocisto recém-formado.

O blastocisto inicial apresenta dois tipos celulares distintos, epitélio polarizado trofoectoderma (TE) e embrioblasto (MCI), além de uma cavidade, a blastocele.

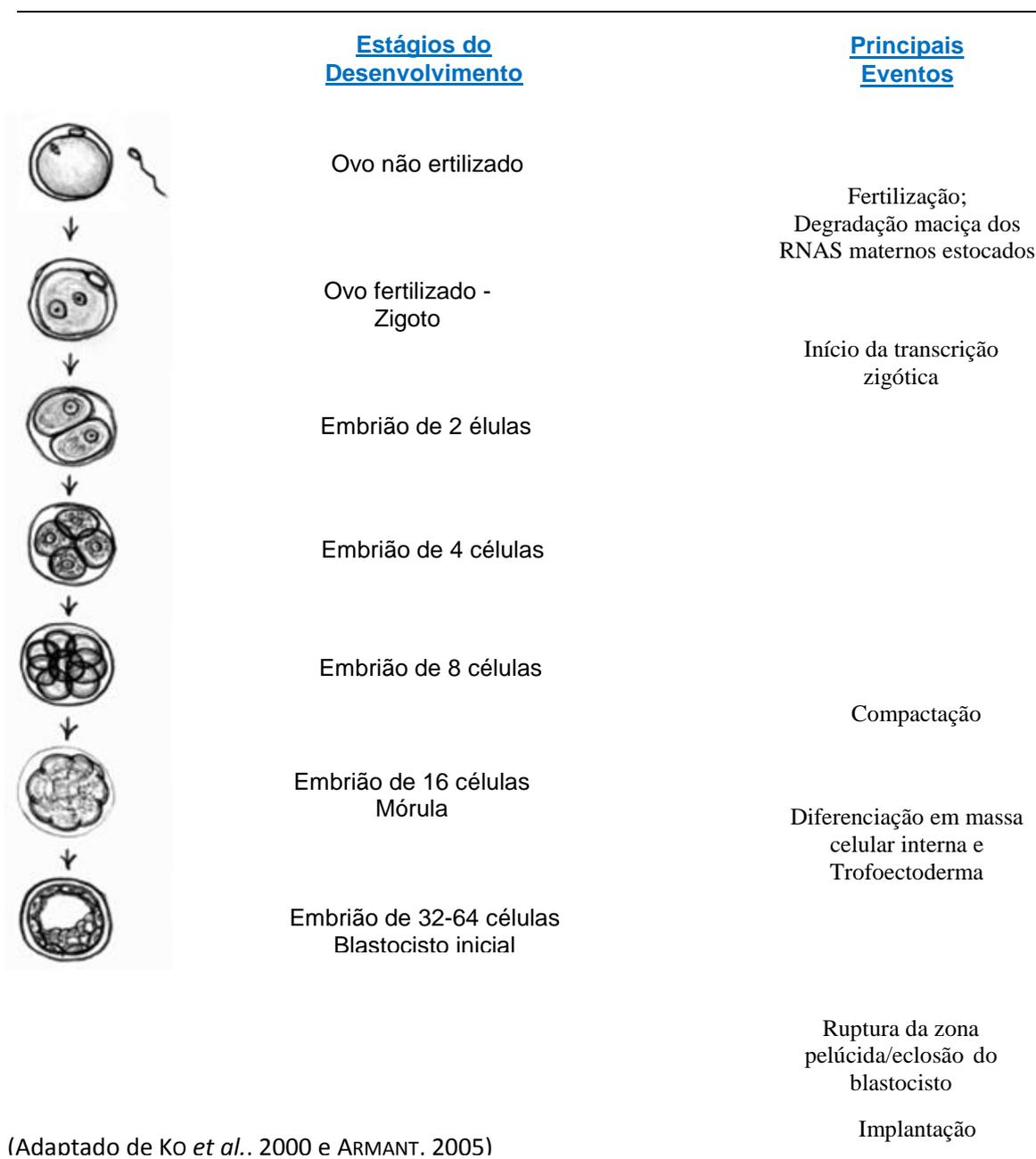
Pouco antes da implantação, o blastocisto evolui: as células da MCI originam um núcleo celular interno (ectoderma primitivo ou epiblasto), e uma camada mais externa de células (endoderma primitivo ou hipoblasto) que separa o epiblasto da blastocele. Em ratos e camundongos, além dessa diferenciação, as células trofoectodérmicas adjacentes à MCI formam o trofoectoderma polar, enquanto as que circundam a blastocele originam o trofoectoderma mural. (PAMPFER AND DONNAY, 1999; PAMPFER, 2000; DEY *et al.*, 2004).

O endoderma primitivo formado é um tipo extraembrionário, cujos descendentes formarão estruturas do saco vitelino (endodermas extraembrionários parietal e visceral), enquanto o epiblasto originará o embrião propriamente dito, ou seja, todos os tecidos do organismo em desenvolvimento (ectoderma, mesoderma e endoderma), bem como o mesoderma extraembrionário. (PAMPFER AND DONNAY, 1999; PAMPFER, 2000; DEY *et al.*,

2004). Já o trofoectoderma estabelecerá o primeiro contato do blastocisto com o epitélio luminal uterino, e o seu desenvolvimento subsequente em tecido trofoblástico será fundamental para iniciação da implantação e estabelecimento da gestação, bem como para formação da placenta e de outras estruturas extraembrionárias. (DEY *et al.*, 2004; HAMATANI *et al.*, 2004; ARMANT, 2005; GUO *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2013).

O término do período pré-implantação ocorre com a ruptura da zona pelúcida, e liberação (eclosão) do blastocisto a ser implantado.

A Figura 1.3 mostra os eventos mais marcantes registrados no período pré-implantação.



(Adaptado de Ko *et al.*, 2000 e ARMANT, 2005)

Fig. 1.3: Estágios do desenvolvimento pré-implantação e principais eventos.

Os eventos registrados nos embriões pré-implantação refletem um padrão de expressão gênica diferencial. HAMATANI e colaboradores (2004) observaram um padrão de expressão periódico, envolvendo ondas programadas de ativação gênica, relacionadas aos requerimentos proteicos específicos do embrião, em dado momento do desenvolvimento. Muitos genes só são expressos uma única vez e são estágio-específicos, enquanto outros apresentam graus de expressão variados, de acordo com o momento do desenvolvimento. Nestes casos, genes que completaram as suas funções durante os estágios iniciais, são silenciados definitivamente ou temporariamente nos estágios subsequentes, podendo ser reativados em estágios mais avançados. As atividades de proteínas sintetizadas em momentos específicos parecem ser requeridas apenas naqueles momentos, nem antes, nem depois. Muitos desses genes geram RNAs que requerem muitas horas para serem transcritos, e só irão desempenhar suas respectivas funções algum tempo depois. (HAMATANI *et al.*, 2004).

O momento da primeira onda de ativação gênica zigótica é determinado pelo “Relógio Zigótico”. Como já dito anteriormente, antes da fertilização, somente RNAs e proteínas maternas estão presentes nos ovócitos, e a maioria das proteínas traduzidas durante a fase inicial da ativação do genoma zigótico são produtos dos RNAs estocados, e não dos RNAs nascentes. As proteínas traduzidas a partir dos RNAs maternos armazenados são absolutamente necessárias para desencadear o início da transcrição zigótica, enquanto os transcritos zigóticos e seus produtos proteicos são requeridos para a progressão dos embriões. E assim, o programa genético governado pelos mRNAs e proteínas maternas é substituído pelos mRNAs e proteínas originárias do genoma formado. O momento da ativação da primeira transcrição zigótica é espécie-específico - nos roedores acontece no final do estágio de 1 célula, ao passo que em humanos, no estágio de 4-8 células. (KO *et al.*, 2000; BLOOR *et al.*, 2002; DEY *et al.*, 2004; HAMATANI *et al.*, 2004).

O conjunto gênico zigótico ativado no período pré-implantação engloba: i) genes que resultam na formação de estruturas associadas à diversas funções, incluindo: junções intercelulares, canais de água, bombas de sódio-potássio, etc; ii) genes que regulam a diferenciação das células em massa celular interna e trofoectoderma; iii) genes relacionados à metilação do DNA; iv) genes relacionados à troca da dependência ao piruvato para dependência à glicose. As expressões desses genes são consistentes com os eventos biológicos subsequentes.

A formação das *gap junctions*, por exemplo, é absolutamente necessária para que a compactação e a cavitação (formação de cavidade) do embrião ocorram. A formação de canais de água e de bombas de sódio e potássio possibilitam, não só a formação do gradiente iônico trans-trofoectoderma, como também o acúmulo do fluido que enche a blastocela.

(HAMATANI *et al.*, 2004; MARIKAWA & ALARCÓN, 2009). Já a diferenciação celular em embrioblasto ou trofoblasto, que depende das posições das células na mórula e tem início após a compactação e a polarização, é governada por fatores de transcrição diferentes. O fator de transcrição Cdx2 é essencial para a diferenciação do trofoblasto, enquanto as proteínas Oct4, nanog e Sox-2, relacionadas à pluripotência e renovação celular, são expressas fundamentalmente na massa celular interna (MYISUI *et al.*, 2003; HAMATANI *et al.*, 2004; KURODA *et al.*, 2005; RALSTON & ROSSANT, 2008; FAUNES *et al.*, 2010; GUO *et al.*, 2010; SANTOSTEFANO *et al.*, 2012). Além disso, a metilação *de novo* do DNA, contribui para diferenciação da massa celular interna e do trofoectoderma, durante no estágio mais avançado do blastocisto. No estágio entre a mórula e o blastocisto, há uma modificação do metabolismo energético do embrião, em virtude da expressão de determinados genes, em um momento anterior. Neste estágio, o embrião que até então obtinha energia a partir da oxidação do piruvato e lactato, passa a dispor de um metabolismo anaeróbico de glicose, via glicólise.

1.3.2 - IMPLANTAÇÃO:

O processo de implantação marca o início da interação física e fisiológica do blastocisto com o organismo materno, relação esta que se tornará cada vez mais estreita e mais complexa, culminando com a formação de um ambiente adequado (decídua) para promover e garantir a continuidade das trocas metabólicas, bem como da nutrição do embrião em desenvolvimento, até a formação da placenta. (ZHANG *et al.*, 2013).

A implantação do blastocisto depende do programa molecular de crescimento e diferenciação do próprio embrião, operando em conjunto com sinais extrínsecos provenientes do trato reprodutivo materno, de uma maneira regulada no tempo e no espaço (DEY *et al.*, 2004; ARMANT, 2005). A ação conjunta dos hormônios esteroides e de moléculas de sinalização produzidas localmente é que vai dirigir o processo de implantação, através de interações parácrinas, autócrinas e justácrinas, que abrangem também, interações célula-célula e célula-matriz extracelular. A comunicação bidirecional entre o trofoectoderma do blastocisto e diversos tipos celulares endometriais (epitélios luminal e glandular e células do estroma) produzirá respostas mútuas em ambas as entidades. Se de um lado, sinais oriundos do útero servirão de guia para diferenciação do blastocisto, este, uma vez em contato com o epitélio uterino, provocará uma série de respostas endometriais, levando à formação da decídua e, em última instância, à placentação. (DEY *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2013).

Uma implantação bem sucedida requer tanto um útero apresentando um endométrio em estado receptivo, quanto um blastocisto competente para implantação, que são eventos sincronizados e regulados, particularmente, pelo estrogênio e pela progesterona (TRANGUCH *et al.*, 2006). Vários sinais moleculares que regulam a receptividade uterina e a aquisição de competência pelo blastocisto foram descritos, a partir de estudos realizados, principalmente em camundongos, e incluem: fatores de crescimento específicos, citocinas, mediadores lipídicos, moléculas de adesão celular, fatores de transcrição e de crescimento, prostaglandinas, etc. (DEY *et al.*, 2004; ARMANT, 2005; SONG, *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2013).

Em mamíferos placentários, o útero é receptivo ao embrião durante um período fixo e restrito - janela de implantação - que ocorre depois da formação do corpo lúteo. Em humanos, as modificações estruturais e funcionais características do um útero em estado receptivo, são observadas durante a fase lútea (fase secretória) inerente ao ciclo menstrual normal, quando o útero apresenta um epitélio contendo glândulas secretoras ativas e pinopodos de superfície (projeções da membrana epitelial), moléculas nutrientes, aumento da permeabilidade vascular

e estroma edemaciado, sendo capaz de receber o embrião e supri-lo com nutrientes. (ACHACHE & REVEL, 2006; TRANGUCH *et al.*, 2006; KOOT *et al.*, 2012).

Em roedores, a janela de implantação ocorre durante o diestro, e depende também, da ativação do blastocisto, que é sincronizada com o período da receptividade uterina, isto é, depende de um diálogo blastocisto-endométrio. (ARMANT, 2005; SONG, *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2013). Por exemplo, em camundongos, o CYP1B1 que está presente no útero receptivo, é responsável pela hidroxilação do estradiol (estrógeno primário) a 4-hidroxi-estradiol (catecolestrogênio), que medeia a ativação parácrina de blastocistos dormentes, induzindo uma rápida resposta, traduzida pela aquisição de competência para implantação blastocística (DEY *et al.*, 2004). Por outro lado, moléculas de sinalização específicas derivadas do blastocisto também influenciam funcionalmente o útero, determinando a janela de implantação (ZHANG *et al.*, 2013).

Em camundongos e ratos, a janela de implantação corresponde, respectivamente, ao 4º e 5º dia após a concepção, enquanto na mulher ocorre no período entre 6 a 10 dias após a ovulação. (ACHACHE & REVEL, 2006; SONG, *et al.*, 2007; KOOT *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013).

A aquisição de competência para implantação pelo blastocisto ocorre com a sua eclosão, ou ruptura da zona pelúcida. Uma vez eclodido, o blastocisto passa a ter acesso à várias moléculas sinalizadoras produzidas no trato reprodutivo, após o que é ativado, transformando-se num embrião capacitado para interagir diretamente com o epitélio luminal uterino, via trofoectoderma (APLIN, 2004; DEY *et al.*, 2004; GUO *et al.*, 2004; ARMANT, 2005). Em camundongos, aquisição de competência envolve diferenciação celular, em decorrência da ativação da expressão diferencial de cerca de 230 genes, incluindo, genes envolvidos no controle do ciclo celular, bem como de inúmeras vias de sinalização, vias metabólicas energéticas, etc, que até então estavam silenciados (ZHANG *et al.*, 2013). Diferente do que se observa nos blastocistos metabolicamente dormentes e incompetentes para estabelecer o contato inicial com o útero, nos blastocistos competentes as células trofoectodérmicas são diferenciadas e apresentam microvilos e glicogênio citoplasmático. (DEY *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2013).

Em seres humanos e roedores, o blastocisto competente é sequencialmente implantado, através das células trofoblásticas, que estão particularmente implicadas neste processo. Inicialmente, o blastocisto se adere superficialmente ao epitélio uterino, através das células do trofoblasto, que em seguida se diferenciam, adquirindo propriedades invasivas que as possibilita penetrar nos tecidos maternos locais, e gradativamente se estenderem e invadirem camadas endometriais mais profundas, causando ruptura dos vasos sanguíneos

maternos, e estabelecendo uma comunicação direta com o sangue materno. (PAMPFER & DONNAY, 1999; ARMANT, 2005)

De um modo geral, a diferenciação do trofoectoderma ocorre, inicialmente, no ponto de adesão (sítio de implantação) do embrião, embora varie de espécie para espécie. Nos blastocistos humanos, o trofoblasto se diferencia em citotrofoblasto (células individualizadas uninucleadas, mais internas) e sinciciotrofoblasto (protoplasma celular multinucleado, mais externo), este último representando o tecido invasivo. Em ratos e camundongos, as células do trofoectoderma mural iniciam sua diferenciação em células trofoblásticas gigantes primárias, que formam um tecido poliploide – estas células, é que irão ancorar o embrião na parede uterina, e depois penetrá-la (PAMPFER & DONNAY, 1999; ARMANT, 2005; MONTANARI, 2013).

Enquanto no homem a implantação é intrusiva (o trofoblasto penetra o epitélio luminal, atingindo e se estendendo através da lâmina basal) e intersticial (o blastocisto é inteiramente embebido dentro do estroma), em ratos e camundongos, que apresentam blastocistos pequenos com expansão moderada, ela ocorre por deslocamento (o epitélio é libertado da lâmina basal subjacente, facilitando o espalhamento do trofoblasto através do mesmo) e é excêntrica (a câmara de implantação é formada por invaginação do epitélio uterino). Em ambos os casos, as células do estroma uterino que circundam o blastocisto em processo de implantação sofrem decidualização. (DEY *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2013).

Apesar da diferenciação do trofoectoderme no período da implantação variar entre as diferentes espécies, podemos dividir a implantação em 3 etapas, comuns a roedores (ratos e camundongos) e humanos: aposição, adesão e penetração ou invasão (DEY *et al.*, 2004; ARMANT, 2005).

1.3.2.1 - APOSIÇÃO:

É a fase inicial do processo de implantação. Nesta fase, as células do trofoectoderma se aproximam fisicamente do epitélio uterino receptivo, através da interdigitação dos microvilos do trofoectoderma do blastocisto e do epitélio luminal uterino, no sítio de implantação. (MURPHY, 1998; DEY *et al.*, 2004; ARMANT, 2005; ACHACHE & REVEL, 2006).

Em ratos e camundongos, um edemaciamento generalizado do estroma, leva ao fechamento do lume uterino, favorecendo a aposição do blastocisto, que ocorre no lado antimesometrial³ do útero.

A aposição do blastocisto desencadeia a decidualização dos fibroblastos do estroma que circundam o blastocisto em implantação. (DEY *et al.*, 2004; ARMANT, 2005; TRANGUCH *et al.*, 2006).

1.3.2.2 - ADESÃO:

Nesta etapa ocorre o estreitamento do contato entre o trofoectoderma e o epitélio uterino materno, através de moléculas de adesão celular. Muitas glicoproteínas e ligantes carboidratos, expressos no epitélio uterino e nas células superficiais do blastocisto, estão primariamente implicadas na adesão do blastocisto, como integrinas, selectinas, caderinas, trofininas e tastinas, e caderinas (BLOOR *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2002; GENBACEV *et al.*, 2003; DEY *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2013). O estreitamento dessa associação também é marcado pela ocorrência de eventos, decorrentes de ações reguladas pelos hormônios esteroides (estrogênio e progesterona), e vias de sinalização cruzada. O início da adesão (reação de adesão) do blastocisto coincide com o momento em que ocorre um aumento localizado da permeabilidade vascular do estroma, exatamente no sítio de implantação (DEY *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2013). Dentre os eventos chaves que ocorrem nesta etapa, podemos destacar:

- Diferenciação do trofoectoderma do blastocisto em tecido trofoblástico
- Participação de moléculas de adesão celular, tanto pela superfície das células endometriais, como pela das células trofoblásticas do blastocisto, que darão início à reação de adesão embrião-epitélio luminal uterino. Estas moléculas além de promoverem interações célula-célula e célula-matriz extracelular, funcionam também como ligantes glicoproteicos de superfície, sendo capazes de mediar vias de sinalização importantes. As moléculas de adesão

³ Os cornos uterinos podem ser divididos em duas regiões, mesometrial e antimesometrial, tomando o mesométrio (ligamento vascularizado que prende os cornos à parede abdominal) como referência espacial. (CISTERNA, 2013).

primariamente implicadas na implantação são: integrinas, selectinas, caderinas, trofininas e tastinas, e caderinas.

- Ativação de vias de sinalização mediadas por citocinas, prostaglandinas, fatores de crescimento e fatores homeobox.
- Degeneração apoptótica das células epiteliais uterinas
- Decidualização

1.3.2.2.1 – DIFERENCIAÇÃO DO BLASTOCISTO

Durante a adesão, ocorre a diferenciação do trofoectoderma embrionário em tecido trofoblástico, no sítio de aposição do blastocisto.

Nos blastocistos humanos o trofoblasto (trofoectoderma) se diferencia em citotrofoblasto, constituído por células uninucleadas individualizadas e mais internas, e sinciotrofoblasto (multinucleado). Em ratos e camundongos o trofoectoderma mural origina as células trofoblásticas gigantes primárias (TGPs), *i.e.*, células poliploides, fagocitárias e invasivas (SIMMONS & CROSS, 2005; WOODING & BURTON, 2008). O sinciotrofoblasto e as células trofoblásticas gigantes primárias participam diretamente da reação de adesão, em humanos e roedores, respectivamente, uma vez que estes tecidos, ao terminarem suas diferenciações, adquirem fenótipos invasivos (PAMPFER & DONNAY, 1999; ARMANT, 2005, etc).

Em ratos e camundongos, as TGPs ancoram o embrião na parede uterina da região antimesometrial, invadem o estroma decidualizado subjacente, além de originarem a porção mais externa do saco vitelino (ARMANT, 2005).

Ao mesmo tempo em que as TGPs estão sendo produzidas e exercendo sua função invasiva, o epiblasto e o endoderma primitivo movem-se para dentro da blastocele, sofrem diferenciação, e formam o ovo cilíndrico embrionário. O endoderma primitivo, por sua vez, se diferencia no endoderma extraembrionário parietal e endoderma extraembrionário visceral, que irão formar elementos estruturais do saco vitelino (PAMPFER & DONNAY, 1999; LI & DING, 2010). O embrião então passa a ser se parecer com uma coluna, constituída por três tecidos: ectoderma extraembrionário, derivado do trofoectoderma; epiblasto, derivado da MCI; endoderme visceral, descendente do endoderma primitivo (LI & DING, 2010). Em ratos,

no final do dia DG6, e início do DG7, o endoderma distal e as células trofoblásticas tornam-se separados por uma membrana, membrana de Reichert. (HEBEL & STROMBERG, 1986).

As células do TE polar (adjacentes à MCI), originam o ectoderma extraembrionário e o cone ectoplacentário (SIMMONS & CROSS, 2005). O cone ectoplacentário vem a ser uma excrescência cuja extremidade dá origem às células trofoblásticas gigantes secundárias (TGSs), semelhantes às primárias. Estas células são cruciais, tanto no processo de implantação, decidualização e invasão, no lado mesometrial, como no desenvolvimento da placenta (MEHROTRA, 1988; PAMPFER & DONNAY, 1999; WOODING & BURTON, 2008; ROSSANT & TAM, 2009).

A Figura 1.4 ilustra a evolução do embrião de camundongos, desde a mórula (16 células), até a formação do ovo cilíndrico.

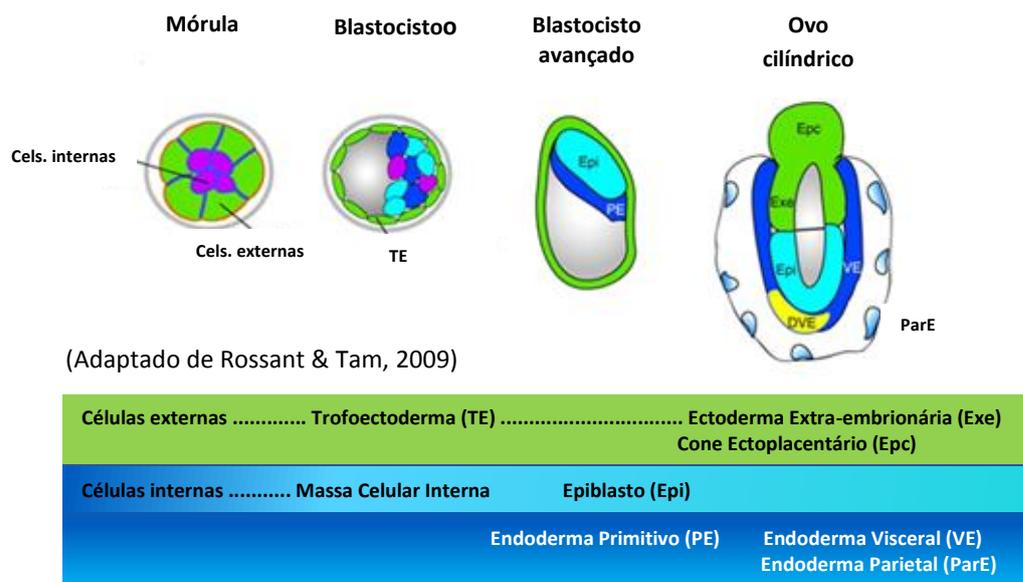


Fig. 1.4 – Alterações morfológicas e especificação das linhagens celulares durante o desenvolvimento de camundongos, da mórula ao ovo cilíndrico.

As barras coloridas mostram as localizações das células internas e externas, bem como dos tecidos descendentes do trofoectoderma e da massa celular interna.

As células trofoblásticas gigantes, primárias e secundárias são geradas durante, e depois da implantação, e além de intermediarem a invasão trofoblástica intrauterina, também desempenham função endócrina, através da síntese de hormônios esteroides e peptídicos (AIN *et al.*, 2003; ARMANT, 2005). Depois da implantação, as células trofoblásticas gigantes

tornam-se componentes ativos da interface materno-fetal (AIN *et al.*, 2003; FERREIRA, 2007; WOODING & BURTON, 2008; SOARES *et al.*, 2012). As células primárias formam uma bainha solta ao redor do conceito, que, do lado antimesometrial, formam a camada mais externa do saco vitelino (bilaminar). Já as células gigantes secundárias, que ocupam a região mesometrial, contribuirão para formação da placenta cório-alantoideana definitiva (WOODING & BURTON, 2008).

1.3.2.2.2 – MOLÉCULAS DE ADESÃO DE SUPERFÍCIE CELULAR

Integrinas:

Membros da família das integrinas servem como receptores para vários ligantes da matriz extracelular (MEC), além de modularem a adesão célula-célula e de participarem da transdução de sinais.

Cada integrina apresenta 2 subunidades α e β , e cada combinação $\alpha\beta$ tem uma especificidade de ligação e uma propriedade de sinalização particular. A interação via integrinas requer a presença de um ligante bifuncional que forma uma ponte entre os receptores das superfícies das células embrionárias e uterinas. A sinalização por integrinas é mediada pela associação com proteínas adaptadoras, cinases citoplasmáticas, e receptores transmembrana de fatores de transcrição. (DEY *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2013).

Muitas integrinas são capazes de interagir com a seqüência peptídica Arg-Gli-Asp, presente em muitas proteínas da MEC (fibronectina, laminina, entactina, tropontina, osteopontina, vitronectina, etc). A invasão do trofoectoderma dentro do epitélio luminal através da matriz extracelular é mediada, principalmente, por essas integrinas. (DEY *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2013).

A ligação de integrinas à fibronectinas da MEC é muito importante na implantação de camundongos. As fibronectinas, quando se associam com integrinas $\alpha5\beta1$ presentes na superfície das células trofoblásticas gigantes primárias, induzem diferenciação da superfície dessas células, tornando-as mais aderentes e mais invasivas. O trofoblasto invasivo se adere, se espalha, e migra sobre os substratos da matriz extracelular, penetrando-a tridimensionalmente através de suas estruturas. Além disso, a fibronectina é abundante na membrana basal endometrial e na MEC do estroma, nos dias 4,5-5,5 de gestação, quando o trofoblasto viola o epitélio luminal e inicia sua invasão. (WANG *et al.*, 2002; DEY *et al.*, 2004; ARMANT, 2005).

Em humanos, a subunidade $\beta 3$ é expressa nos epitélios luminal e glandular uterino durante a fase secretória, e exerce função na preparação da receptividade endometrial, enquanto as integrinas $\alpha \nu \beta 3$, $\alpha \nu \beta 1$, $\alpha \nu \beta 5$, $\alpha \nu \beta 6$, $\alpha 1 \beta 1$, $\alpha 3 \beta 1$, $\alpha 6 \beta 1$ e $\alpha 9 \beta 1$ participam da implantação do blastocisto (APLIN & KIMBER, 2004; ZHANG *et al.*, 2013).

Trofininas e tastinas:

Trofininas são proteínas intrínsecas de membrana celular, expressas tanto no embrião, quanto no epitélio uterino de camundongos, no período pré-implantação, e medeiam interações homofílicas entre as membranas das células apicais trofoblásticas e as das células apicais do epitélio endometrial. Entretanto, para que sejam funcionais, as trofininas requerem a presença de uma proteína citoplasmática, a tastina, bem como de uma proteína de ligação, a bistina. Juntas estas proteínas formam o complexo de adesão trofinina-bistina-tastina. As trofininas, através de suas ligações e dissociações dinâmicas com bistina e tastina, promovem a adesão do blastocisto às células do epitélio uterino durante a implantação, e induzem modificações fisiológicas em ambas as partes. Essas moléculas também induzem degeneração apoptótica do tecido epitelial uterino, conduzindo a invasão trofoblástica.

Em humanos, o hormônio gonadotrofina coriônica (hCG) secretado pelo blastocisto induz a expressão de trofinina na superfície do epitélio endometrial, durante a fase secretória. Em camundongos, a trofinina é expressa pelo epitélio luminal e glandular, independentemente da presença do blastocisto, e o seu papel na implantação ainda não foi elucidado. (BLOOR *et al.*, 2002; APLIN & KIMBER, 2004; DEY *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2013)

E-caderinas:

E-caderinas são moléculas transmembrana Ca^{+2} -dependentes, que estabelecem a adesão célula-célula bem como mudanças dinâmicas do citoesqueleto através das suas interações com α e β -cateninas citoplasmáticas. Essas moléculas formam junções de adesão intercelulares, tanto no blastocisto, sendo fundamentais para sua própria formação e desenvolvimento, como nas células do epitélio uterino materno, participando da formação e da manutenção de uma arquitetura celular que permite a adesão e a invasão do blastocisto. (STEMIER *et al.*, 2003; JHA *et al.*, 2006).

No momento da adesão, as E-caderinas são expressas no trofoectoderma, enquanto os outros componentes do complexo juncional são expressos no epitélio luminal. Após apoptose das células epiteliais, estas moléculas são encontradas no estroma subepitelial que circunda o blastocisto. As E-caderinas atuam como guias para a adesão e subsequente invasão do blastocisto. (DEY *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2013).

Selectinas:

Em humanos, as L-selectinas, proteínas que se ligam a carboidratos, são moléculas operantes durante a adesão inicial dos blastocistos ao epitélio uterino. São expressas no trofoblasto, enquanto seus ligantes oligossacarídicos humanos são detectados no epitélio do útero receptivo, principalmente nos pinopodos, que são protusões das células apicais. Selectinas trofoblásticas aderem-se aos seus ligantes uterinos. Entretanto, em camundongos, essas moléculas não são requeridas para iniciarem a adesão do blastocisto. (GENBACEV *et al.*, 2003; APLIN & KIMBER, 2004; DEY *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2013).

1.3.2.2.3 - APOPTOSE DAS CÉLULAS DO EPITÉLIO LUMINAL UTERINO

Estudos realizados em ratos e camundongos demonstraram que, em resposta à presença do blastocisto, ocorre uma degeneração apoptótica das células do epitélio luminal adjacentes ao trofoectoderma mural, o que possibilita o acesso do blastocisto à membrana basal subjacente, facilitando o seu contato com o estroma endometrial.

Em camundongos, a apoptose das células epiteliais, é mediada pela associação da proteína TNF α (fator de necrose tumoral) com o seu receptor (TNF α R), e envolve a proteína efetora caspase 3 (JOSWIG *et al.*, 2003). As células que sofrem apoptose são posteriormente fagocitadas pelas células trofoblásticas. A perda epitelial começa na região antimesometrial, e estende-se, progressivamente, para a região mesometrial. (PARR *et al.*, 1987; PAMPFER & DONNAY, 1999; ARMANT, 2005).

1.3.2.2.4 - DECIDUALIZAÇÃO

O processo de decidualização consiste na formação da decídua, ou seja, de uma estrutura, originada a partir da proliferação dos fibroblastos (tecido conjuntivo) presentes no estroma endometrial, seguida pela sua transdiferenciação em células especializadas, fenotipicamente epitelóides (poliédricas, poliploides, justapostas e volumosas) - células deciduais. (DEY *et al.*, 2004; CISTERNA, 2013). Em roedores, a formação da decídua é regulada, primariamente, pelos hormônios esteroides, principalmente pela progesterona (OGLE *et al.*, 1997; TESSIER *et al.*, 2000; TESSIER *et al.*, 2001), e envolve, remodelamento da

matriz extracelular (modificações na estrutura e na composição da MEC), angiogênese⁴ e aumento da permeabilidade vascular do estroma, eventos fundamentais para que a etapa subsequente (invasão) ocorra satisfatoriamente. (DEY *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2013).

Em camundongos, metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs), e inibidores das metaloproteinases da matriz extracelular de tecidos (TIMPs), são as moléculas que controlam a degradação da matriz (remodelamento) durante a decidualização, bem como da invasão blastocística (DEY *et al.*, 2004).

Em humanos, a formação da decídua tem início no final da fase secretória do ciclo menstrual, e independente da implantação do embrião. A decidualização prossegue, regulando a invasão trofoblástica. No momento em que o blastocisto se interioriza totalmente no endométrio, o desenvolvimento da decídua é interrompido. (ZHANG *et al.*, 2013).

Em ratos e camundongos, a decidualização é induzida pelo primeiro contato do embrião com o epitélio luminal uterino, que atua como um transmissor de sinais para o endométrio. As células (subepiteliais) do estroma, adjacentes ao blastocisto em processo de adesão, proliferam-se intensamente, e, subsequentemente, sofrem diferenciação em células deciduais. Nesses animais, a decidualização do estroma uterino ocorre em duas fases. (OGLE *et al.*, 1997; PAMPFER & DONNAY, 1999; DEY *et al.*, 2004; ARMANT, 2005).

A fase inicial da decidualização ocorre no lado antimesometrial do útero, subjacente ao sítio de implantação do blastocisto. As células do estroma se multiplicam, cessam sua proliferação, e se diferenciam em células deciduais (grandes e poliploides), formando a decídua primária (decídua antimesometrial), um tecido avascularizado. Pouco tempo depois, as células do estroma adjacente à zona de decidualização primária (ZDP), que permaneceram em processo de proliferação, se diferenciam, originando a decídua secundária, neste caso, um tecido vascularizado, representado por células menores e menos diferenciadas, ocupando a região mesometrial uterina (decídua mesometrial). (GU *et al.*, 1994; OGLE *et al.*, 1997; PAMPFER & DONNAY, 1999; DEY *et al.*, 2004;). O bem orquestrado processo de decidualização, que progride do polo antimesometrial para o polo mesometrialmente, cria duas regiões morfológicamente distintas (FONSECA *et al.*, 2012).

O blastocisto em processo de implantação, ou já implantado, se diferencia, cresce, e se expande, graças às modificações dinâmicas (morfológicas e fisiológicas) que ocorrem no útero, e que tornam possível sua acomodação. Tais modificações incluem, por exemplo, regressão e reorganização do tecido decidual. A decidualização do estroma envolve um

⁴ Angiogênese, que é a produção de novos vasos celulares, a partir de vasos pré-existentes.

equilíbrio entre proliferação e morte celular, (PARR *et al.*, 1987; GU *et al.*, 1994; PAMPFER & DONNAY, 1999; JOSWIG *et al.*, 2003; ARMANT, 2005;).

Em ratos, em meados da gestação (dia 10), a decídua primária (antimesometrial), que é a primeira a ser formada, a partir do DG6, é transitória, atinge o auge do seu desenvolvimento, e, em seguida, é a primeira a se degenerar, gradativamente, até se transformar numa camada tecidual fina, denominada decídua capsular, por volta do dia 12. Após o estabelecimento da decídua primária, células do estroma que a circundam se diferenciam e formam a zona decidual secundária (ZDS). (GU *et al.*, 1994; OGLI *et al.*, 1997; FONSECA *et al.*, 2012).

A decídua antimesometrial dá suporte ao embrião durante os estágios iniciais da gestação, e origina a decídua capsular, que é associada ao saco vitelino parietal (originando a placenta cório-vitelina), e assim permanece, até a ruptura da membrana de Reichert e de tecidos associados (em torno do DG16). Na ausência de um epitélio luminal contínuo no sítio de implantação, a zona decidual primária (ZDP) constitui a única barreira entre o embrião e o sangue materno.

No DG9, a decídua primária começa a involuir, mas, nesse momento, o embrião já está totalmente envolto pelo saco vitelino visceral, que é contínuo e bem desenvolvido, e protege o embrião contra a entrada de moléculas indesejáveis. A barreira ZDP, antes de involuir, permite a passagem de pequenas macromoléculas entre o embrião e o tecido materno circundante. (CISTERNA, 2013).

A decídua mesometrial, que começa a ser formada na região central do endométrio, no 7º dia de gestação, no dia 12, encontra-se totalmente diferenciada. Neste momento, ocorre um alargamento dos vasos sanguíneos, e a zona central da decídua mesometrial é então, gradativamente invadida por células trofoblásticas gigantes secundárias (TGSs), oriundas do cone ectoplacentário, resultando no início da formação da placenta definitiva (cório-alantóica), em torno do dia 14 de gestação. Entre os dias 14 e 16, a decídua mesometrial regride, e por volta do dia 19, ela é reduzida a um tecido localizado na região marginal do útero (decídua basal), que representa o componente materno da placenta, persistindo por toda a gestação. (OGLE *et al.*, 1997; PAMPFER AND DONNAY, 1999; FONSECA *et al.*, 2012). A decídua basal inclui vasos sanguíneos recém-formados, que desempenham papel essencial no desenvolvimento da interface vascularizada decídua-placentária. (FURUKAWA *et al.*, 2011).

O padrão espacial e temporal da regressão da decídua mesometrial está intimamente relacionado ao padrão de invasão trofoblástica, que resulta em remodelamento vascular. A decídua mesometrial fornece um ambiente favorável para o crescimento da placenta, e degenera concomitantemente com a invasão de células trofoblásticas. (FONSECA *et al.*, 2012).

A involução das decíduas é decorrente, primariamente, de degeneração apoptótica, que, em ratos e camundongos, envolve a participação das caspases 3 e 9, respectivamente, bem como da proteína pró-apoptótica Bax (DAI *et al.*, 2000; TESSIER *et al.*, 2001; JOSWIG *et al.*, 2003; CORREIA-DA-SILVA, *et al.*, 2004).

O desenvolvimento completo da decídua é, do ponto de vista funcional, da maior importância, pois antes da formação da placenta, caberá à decídua: i) agir como barreira à invasão descontrolada do trofoblasto; ii) fornecer nutrientes ao embrião; iii) proteger o embrião da rejeição materna (ZHANG *et al.*, 2013).

1.3.2.2.4.1 - ANGIOGÊNESE E AUMENTO DA PERMEABILIDADE VASCULAR DURANTE A DECIDUALIZAÇÃO:

A angiogênese e o aumento da permeabilidade vascular são fundamentais, tanto na decidualização, como na placentação, que são processos regulados pelos hormônios esteroides. O estrogênio e a progesterona regulam positivamente a expressão do gene *Vegf*, através de seus respectivos receptores ER e PR, induzindo rapidamente a permeabilidade vascular uterina. O fator de permeabilidade vascular (VEGF) transcrito é também um mitógeno potente para as células endoteliais, e um fator de crescimento regulatório chave para angiogênese. (DEY *et al.*, 2004).

No momento da decidualização, há aumento da produção de citocinas, que promovem a migração de células imunológicas para o endométrio, principalmente monócitos e células *natural killer* uterinas (uNK). Estes leucócitos especializados deciduais conferem tolerância imune materna e também estão implicados na diferenciação das células do estroma e remodelamento da decídua. As células uNK são capazes de modificar as artérias espirais, que são críticas para a nutrição do embrião. (ZHANG *et al.*, 2013). Em ratos e camundongos, além dessas funções, as células uNK também controlam a invasão trofoblástica no compartimento mesometrial uterino (AIN *et al.*, 2003).

Depois da implantação, os leucócitos maternos são excluídos dos sítios de implantação, com exceção das células uNK, que, dentro do compartimento mesometrial vascularizado do útero de ratos e camundongos, aumentam numericamente. Esta região morfológicamente distinta, é referida como glândula metrial (ou triângulo mesometrial), e compreende o ponto de entrada dos vasos sanguíneos, que suprem a placenta e o feto. As células uNK presentes nesta região modificam as artérias espirais, que são críticas para a nutrição do embrião. (FONSECA *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013).

1.3.2.3 - INVASÃO

Em ratos e camundongos, durante a invasão, as células trofoblásticas gigantes primárias e secundárias rompem a lâmina basal, migram através do estroma subjacente decidualizado, penetram o tecido uterino, e finalmente invadem os vasos sanguíneos maternos, criando um sistema primitivo de irrigação nas redondezas do embrião. A invasão ocorre, inicialmente, no compartimento antimesometrial do útero, e depois, no mesometrial. (PAMPFER & DONNAY, 1999; ARMANT, 2005).

Como mencionado anteriormente, durante a decidualização, ocorre o remodelamento da matriz extracelular, envolvendo a participação de fatores produzidos, tanto pelas células trofoblásticas, quanto pelas células deciduais. Do lado embrionário, nas células trofoblásticas, ocorre a tráfego de integrinas para a superfície, como a $\alpha\text{IIb}\beta_3$, que, ao interagirem com componentes específicos da MEC das células deciduais, promovem a sua migração intersticial. Além disso, as células trofoblásticas produzem metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs), que degradam vários componentes da matriz extracelular das células deciduais, como colágeno, fibronectinas, lamininas, etc (DEY *et al.*, 2004; NAVARROEY *et al.*, 2006). Em contrapartida, do lado uterino, as células endometriais expressam componentes específicos da matriz extracelular, e secretam inibidores das metaloproteinases (TIMPs). MMPs e TIMPs são as moléculas chaves do controle da degradação da matriz (remodelamento) durante a decidualização, bem como da invasão trofoblástica. (DEY *et al.*, 2004).

A intrusão das células trofoblásticas na parede dos vasos sanguíneos uterinos estabelece uma superfície de trocas com o organismo materno. Vasos maternos interagem com o trofoblasto, e o sangue materno percola a os espaços intercelulares. As células trofoblásticas que estão em contato com sangue materno são fagocitárias, portanto capazes de internalizar células sanguíneas (hemácias, para aquisição de ferro para hematopoiese fetal), células epiteliais, deciduais e endoteliais, o que permite a aquisição gradativa de espaço para a continuação do desenvolvimento embrionário. (FERREIRA, 2007).

O processo de implantação varia entre as espécies de mamíferos. Em roedores e em seres humanos, por exemplo, a invasão trofoblástica intrauterina é, tanto intersticial, como endovascular. Levando em consideração o grau de profundidade dessa invasão, seres humanos e ratos se assemelham, por apresentarem invasões trofoblásticas igualmente profundas. Entretanto, em camundongos, a invasão das células trofoblásticas é mais superficial, sendo a endovascular limitada à decídua, e a intersticial menos abrangente (não atinge o triângulo mesometrial). (AIN *et al.*, 2003; FONSECA *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2012).

1.3.2.4 – SINALIZAÇÕES MOLECULARES IMPLICADAS NO PROCESSO DE IMPLANTAÇÃO:

Dentre os sinais moleculares que regulam a implantação, desde a preparação do útero (receptividade uterina) e a aquisição de competência pelo blastocisto, até a sua interiorização no estroma uterino, podemos destacar:

1.3.2.4.1 - SINALIZAÇÃO POR HORMÔNIOS ESTEROIDES:

Em roedores os hormônios esteroides ovarianos (progesterona e estrogênio) são requeridos para preparação do útero receptivo, e medeiam inúmeras alterações estruturais e funcionais uterinas, que permitem a adesão do blastocisto e a iniciação do processo de implantação.

O estrogênio participa, tanto da ativação do blastocisto, quanto do processo de implantação. A ação do estrógeno ovariano primário envolve interação com receptores nucleares ER α e ER β , que são fatores de transcrição dependentes de ligante. O complexo estrogênio-ER forma um dímero capaz de se associar com ERES (elementos estrogênio-responsivos), presentes em regiões *cis*-regulatórias de inúmeros genes alvos (*eg.* fatores de crescimento e seus receptores), ativando as suas expressões. ER α é o mediador mais importante da sinalização pelo estrogênio durante o início da gestação, enquanto o ER β , expresso no endotélio endometrial, regula a angiogênese e mudanças vaso motoras, durante a implantação. O útero receptivo é capaz de transformar o estrogênio nativo em catecolestrogênio (4-hidroxiestradiol), que por sua vez, participa da ativação do blastocisto, através da estimulação da síntese de prostaglandina, e não requer a participação de ERs (via genética clássica). (APLIN & KIMBER, 2004; DEY *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2013).

A progesterona é mais importante na decidualização. A função deste esteroide é mediada por seu receptor PR, representado por duas isoformas (PRA e PRB), que são expressas no útero. As sinalizações induzidas pela progesterona e seus receptores (PRA e PRB) e coativadores transcricionais, em conjunto com outras moléculas sinalizadoras provenientes do epitélio uterino, diversos fatores de transcrição e reguladores do ciclo celular, promovem os eventos coordenados envolvidos no processo de decidualização. (ZHANG *et al.*, 2013).

1.3.2.4.2 - SINALIZAÇÃO POR PROSTAGLANDINAS:

As prostaglandinas exercem suas funções através da interação com receptores de superfície celular acoplados à proteína G, ou através da interação com receptores nucleares PPARs (receptores ativados por proliferadores de peroxissomos). Prostaglandinas derivadas da enzima COX2, quando atuam via ativação do PPAR, desempenham papel na adesão do blastocisto. A COX2 é expressa no epitélio luminal e em células estromais subjacentes durante a implantação, no momento da adesão e apenas no sítio de implantação do blastocisto. Estas moléculas estão envolvidas no aumento da permeabilidade vascular, durante a implantação e decidualização. (APLIN & KIMBER, 2004; DEY *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2013).

1.3.2.4.3 – SINALIZAÇÃO POR FATORES DE CRESCIMENTO:

Vários fatores de crescimento e seus receptores são expressos no útero, de maneira temporal e célula-específica. Dentre os fatores de crescimento envolvidos na implantação, destaca-se, o HB-EGF (*Heparin-binding EGF-like growth factor*), da família EGF (*epidermal growth factor*).

Em camundongos, o HB-EGF é detectado exclusivamente no epitélio luminal dos sítios de aposição do blastocisto, antes do início da implantação. Antes da adesão, o HB-EGF é produzido no útero na forma solúvel e transmembrana, e interage com os receptores tirosina quinase (ErbB1 e/ou ErbB4) presentes no blastocisto competente, ativando o programa de diferenciação do trofoblasto, que então adquire propriedades adesivas. (PARIA *et al.*, 1999). Em humanos, o pico de expressão do HB-EGF ocorre no final da fase secretória, quando o endométrio se torna receptivo. Neste caso, as células uterinas expressando o fator se aderem aos blastocistos apresentando receptores ErbB4. (APLIN & KIMBER, 2004; DEY *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2013).

1.3.2.4.4 – SINALIZAÇÃO POR CITOCINAS:

Muitas citocinas da família IL-6, secretadas pelas glândulas uterinas, participam da implantação do blastocisto, dentre as quais, LIF (fator inibidor de leucemia), IL-6 (interleucina 6) e IL-11 (interleucina 11) são as mais pertinentes. Tanto o embrião como o útero são sítios de ação de LIF, IL-6 e IL-11, uma vez que expressam seus receptores específicos associados à membrana, LIFR, IL-6R e IL-11R. As cascatas de sinalização

desencadeadas por estes ligantes requerem a proteína gp130 (cinase associada ao receptor) para intermediar a transdução do sinal. (APLIN & KIMBER, 2004; DEY *et al.*, 2004; APLIN & KIMBER, 2004; ZHANG *et al.*, 2013).

A expressão máxima de LIF ocorre durante o período de implantação, e é regulada por hormônios esteroides (estrogênio ou progesterona, dependendo da espécie), e está implicada na preparação do útero. Em camundongos, LIF também é detectado nas células do estroma que circundam o blastocisto, no momento da adesão. Em humanos, LIF é expresso no epitélio glandular endometrial secretório, e sua deficiência está associada à recorrência de abortos e à infertilidade. (DEY *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2013).

A ativação da sinalização por LIF, através da gp130, provoca a fosforilação da proteína STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*), que forma homo- ou heterodímeros capazes de migrar para o núcleo celular ativando a transcrição de vários genes. Embriões de camundongos STAT3-deficientes não se desenvolvem além do dia 7 de gestação (início da gastrulação) (HIRANO *et al.*, 2000).

A IL-6, secretada pelas células epiteliais e estromais uterinas, também é importante durante a preparação do útero para implantação, tanto em camundongos, quanto em humanos. A ausência ou níveis inadequados de IL-6 em camundongos estão associados à problemas de implantação e comprometimento na gestação, enquanto nas mulheres, à ocorrência de abortos, pré-eclâmpsia e partos prematuros. (ZHANG *et al.*, 2013).

A IL-11 é uma molécula sinalizadora que, quando associada ao seu receptor, desempenha papel na decidualização e na placentação.. No momento em que o blastocisto é embestado no endométrio, o trofoblasto extraviloso invade as artérias espirais maternas que irão transferir os elementos essenciais para o desenvolvimento do embrião, via sistemas circulatórios, materno e fetal. IL11 está presente na decídua e no vilo coriônico e regula a extensão da placentação, assegurando uma gestação normal e a sobrevivência fetal. (DEY *et al.*, 2004).

1.3.2.4.5 - SINALIZAÇÃO POR FATORES DE TRANSCRIÇÃO HOMEBOX:

Os fatores de transcrição homeobox são reguladores transcricionais conservados, que controlam a morfogênese e a diferenciação embrionária.

Em camundongos, alguns fatores de transcrição estão envolvidos na implantação, como proteínas das famílias Hoxa (Hoxa10 e Hoxa11) e Msx (Msx1 e Msx2).

Os genes *Msx1* e *Msx2* são expressos no útero, e são críticos para o estabelecimento da sua receptividade, uma vez que promovem a integridade do epitélio luminal uterino,

permitindo o posicionamento, o alojamento e adesão adequada do blastocisto. (ZHANG *et al.*, 2013).

Os genes *Hoxa10* e *Hoxa11* são expressos nas células do estroma uterino, tanto durante a fase receptiva, quanto durante a decidualização, de maneira esteroide-responsiva (DEY *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2013).

Em camundongos, a expressão do gene *Hoxa10* no estroma uterino é progesterona-dependente. A deficiência ou a ausência deste fator de transcrição no útero de fêmeas adultas levam à diminuição da proliferação das células do estroma, levando à falhas na decidualização, e conseqüentemente, na implantação do blastocisto. Já a deficiência de *Hoxa11* provoca diminuição ou ausência de glândulas uterinas. Em camundongos, a ausência de ambos os fatores leva à infertilidade, em decorrência de implantações defectivas. (APLIN & KIMBER, 2004; DEY *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2013).

1.3.2.4.6 – SINALIZAÇÃO POR GENES DO DESENVOLVIMENTO:

Durante a embriogênese, a comunicação entre o útero e o blastocisto também envolve outras vias de sinalização conservadas, mediadas pelas proteínas hedgehog indiana (IHH), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), proteínas Wnt, e seus respectivos receptores.

A expressão do gene *Ihh* é progesterona-dependente e restrita ao epitélio uterino, enquanto os efetores e outros fatores de transcrição envolvidos nesta via são expressos no estroma subjacente. Em camundongos, a ausência de IHH implica na supressão da proliferação das células do estroma, da angiogênese e da decidualização, levando à falha na implantação do blastocisto. Em humanos, a regulação da sinalização hedgehog pela progesterona é fundamental para diferenciação do endométrio e implantação. (ZHANG *et al.*, 2013).

Em camundongos, a transcrição do morfógeno BMP2, nas células do estroma que rodeiam o blastocisto implantado, é induzida pela progesterona, e está relacionada ao controle da decidualização (DEY *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2013).

Algumas proteínas Wnt (*Wnt4*, *Wnt5a*, *Wnt7a*) estão comprometidas com a preparação do útero, com a aquisição de competência para implantação pelo blastocisto, e com o processo de implantação. A proteína *Wnt5a* atua sobre o epitélio uterino, e dirige a diferenciação do trofoectoderma do blastocisto. A *Wnt7a*, que é expressa no epitélio luminal uterino, é crucial para formação de glândulas endometriais e para manutenção da arquitetura celular uterina. A expressão do gene *Wnt4*, inicialmente observada no epitélio luminal uterino (período pré-implantação), e em seguida nas células do estroma que circundam o embrião,

está envolvida no processo de decidualização, e portanto, no sucesso da implantação. (DEY *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2013).

1.3.2.4.7 - SINALIZAÇÃO CANABINOIDE:

O endocanabinoide anandamida, produzido no útero humano e murino, quando presente em níveis baixos, liga-se a receptores canabinoides expressos no blastocisto pré-implantação, sincronizando a sua chegada ao útero (LIU *et al.*, 2002; DEY *et al.*, 2004; KESSLER *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2013). Além disso, essa substância está associada à estimulação da diferenciação trofoblástica no sítio de aposição do blastocisto, bem como à acomodação (espaçamento) do embrião dentro do útero. (ARMANT, 2005; KESSLER *et al.*, 2005). Anandamida, portanto, atua tanto na ativação do blastocisto, quanto no processo de adesão.

1.3.3 - PERÍODO PÓS-IMPLANTAÇÃO EM ROEDORES:

1.3.3.1 – PERÍODO PRÉ-GASTRULAÇÃO:

Antes da gastrulação, os embriões de camundongos e ratos formam uma estrutura cilíndrica (ovo cilíndrico), apresentando o epiblasto posicionado internamente, e o endoderma mais externo (ROSSANT & TAM, 2009). Entipia é o nome do processo de inversão das camadas germinativas, característico desses embriões (HEBEL & STROMBERG, 1986; BROWN, 1994; TAM & BEHRINGER, 1997).

Nesta fase do desenvolvimento, os embriões de roedores (ratos e camundongos) crescem consideravelmente e sofrem diferenciação interna, mudando drasticamente de forma e de tamanho, devido à proliferação do tecido que origina o ectoderma extraembrionário, e ao bloqueio físico imposto pelo sítio de adesão do blastocisto à parede uterina, que fazem com que a MCI e o ectoderma a ela associado cresçam e ocupem um espaço disponível dentro da blastocele. O cone ectoplacentário e o ovo cilíndrico se alongam. O ovo cilíndrico transforma a cavidade blastocística numa abertura, agora denominada cavidade do saco vitelino. Dentro do ectoderma aparecem espaços que crescem e coalescem, formando a cavidade pró-aminiótica. Em ratos, do lado mesometrial, 2/3 desta cavidade é alinhada com ectoderma extraembrionário, enquanto na porção antimesometrial, a cavidade está alinhada com o ectoderma primitivo. (HEBEL & STROMBERG, 1986; TAM & BEHRINGER, 1997).

Como nos ovos cilíndricos, o ectoderma é fechado pelo endoderma, os embriões passam a adquirir a forma de uma taça, composta por duas camadas celulares: epiblasto (interno) e endoderma visceral (externa). Há uma divisão entre ectoderma embrionário e extraembrionário. Agora, o ectoderma embrionário, ou epiblasto, consiste numa única camada epitelial, em forma de taça (BROWN, 1994; HEBEL & STROMBERG, 1986; TAM & BEHRINGER, 1997). Nesse estágio, o embrião apresenta as regiões extraembrionária e embrionária bem definidas - mais tarde essas regiões definirão o eixo proximal-distal. Além disso, o eixo dorso-ventral prospectivo já se torna aparente, com o lado dorsal embrionário correspondendo ao epiblasto da superfície da cavidade pró-aminiótica, e o ventral correspondendo à superfície do endoderma visceral (TAM & BEHRINGER, 1997).

No ovo cilíndrico de rato, a epitelização da MCI em uma camada de células epiblasticas, bem como a formação da cavidade pró-aminiótica, ocorrem no DG8, em paralelo com o início do desenvolvimento da placenta e das membranas fetais (HEBEL & STROMBERG, 1986; TAM & BEHRINGER, 1997).

Logo após a formação da cavidade pró-amniótica dentro do epiblasto, a gastrulação tem início, com o aparecimento da linha primitiva, na região do epiblasto adjacente à junção embrionária/extraembrionária (PAMPFER & DONNAY, 1999).

Ao contrário dos embriões de ratos e camundongos, cujas camadas germinativas são invertidas e o disco germinativo em forma de taça, os embriões humanos se desenvolvem em uma estrutura planar, com o epiblasto externo, e o endoderma interno. Todavia, todas as espécies utilizarão a linha primitiva para conduzir a formação das três camadas germinativas definitivas, durante a gastrulação. No caso dos embriões de roedores, após a gastrulação, ocorrerá uma inversão das camadas germinativas, e estas serão reorganizadas: um feto em forma de C típico será formado, apresentando o ectoderma mais externo, o mesoderma intermediário, e o endoderma mais interno. (TAM & BEHRINGER, 1997).

1.3.3.2 – PROCESSO DA GASTRULAÇÃO:

Gastrulação é um processo altamente integrado, durante o qual as células e os tecidos se movimentam, reorganizando drasticamente o embrião. O propósito deste processo é gerar um plano corporal que servirá como um anteprojeto para a morfogênese embrionária subsequente. Novas posições são ocupadas pelas células, e o plano corporal é estabelecido, a partir da formação das três camadas germinativas. Os movimentos celulares e as migrações envolvem todo o conceito, e ocorrem coordenadamente. Geralmente os movimentos celulares implicados no processo são: delaminação, epibolia, intercalação, extensão convergente, invaginação, involução e ingressão. Ao conjunto desses movimentos dá-se o nome de movimentos morfogenéticos. Os movimentos morfogenéticos ocorrem juntamente com a proliferação e a diferenciação celular, e convertem um embrião de duas camadas em um embrião de três camadas germinativas: ectoderma, mesoderma e endoderma. (BROWN,1994; TAM & BEHRINGER, 1997).

Na delaminação, as células de uma camada, ao se dividirem, originam uma outra, resultando em duas camadas.

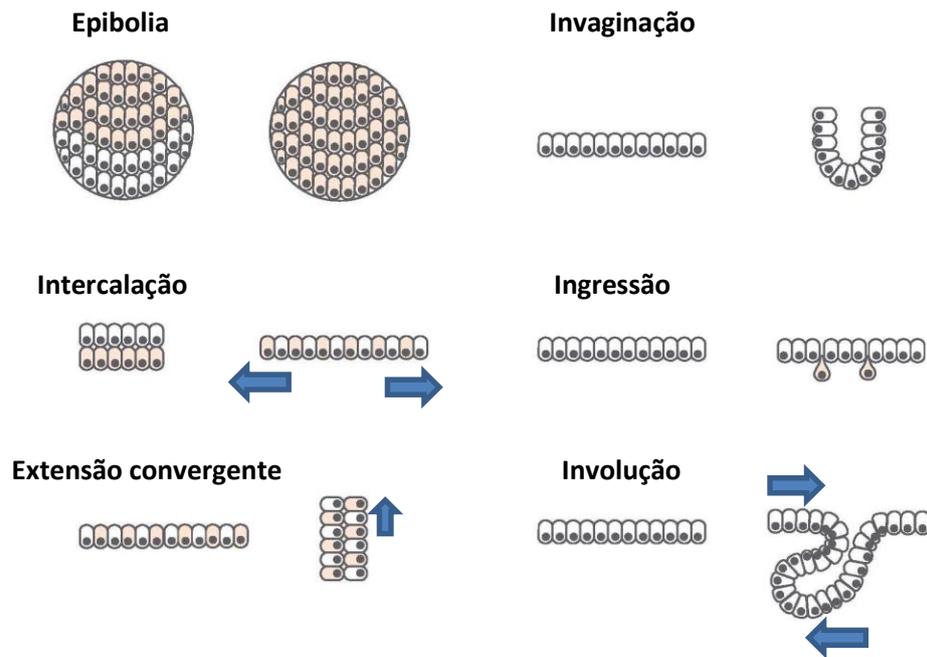
A expansão das camadas celulares pode ocorrer, através de três movimentos: epibolia, intercalação e extensão convergente. Na epibolia, as células de uma lâmina se proliferam, tornam-se mais finas e achatadas, e migram unidas, recobrando outras células: a camada celular afina, porém a sua área de superfície aumenta nas outras duas direções. Na intercalação, as células provenientes de duas ou mais camadas diferentes perdem o contato com as células vizinhas, e movem-se entre si intercalando-se, e resultando em uma nova

camada expandida (em uma ou mais dimensões). Durante a extensão convergente, as células de duas ou mais camadas intercalam-se tornam-se alongadas na direção médio-lateral (perpendicular ao eixo anteroposterior), resultando na expansão unidirecional do tecido como um todo.

Dentre os movimentos capazes de internalizar células, podemos mencionar: invaginação, ingressão e involução. A invaginação provoca a formação de uma bainha, através da penetração de uma estrutura em outra, o que faz com que uma superfície interna torne-se externa. Durante a invaginação, a lâmina epitelial curva-se para dentro formando uma bolsa interna, podendo resultar na formação de um tubo apresentando um lume central. Este movimento ocorre em células que estão aderidas entre si (via moléculas de adesão), atingindo a camada como um todo, no momento em que a morfologia dessas células passa de colunar para piramidal, em decorrência da contração de filamentos de actina. A ingressão envolve a migração de células individuais dentro do embrião, através de pseudópodos. Durante a ingressão, algumas células abandonam a lâmina epitelial e migram para o interior do embrião, tornando-se células mesenquimais livres. A aquisição da capacidade migratória implica que essas células tenham sofrido alterações em sua arquitetura, no seu programa de motilidade e na sua adesão com as células circundantes. Neste caso, as células perdem glicoproteínas de adesão (E-caderinas), adquirem uma nova forma, e migram individualmente. Já na involução, uma camada de células proliferativas dobra-se sobre si mesma, e se espalha na direção oposta; a outra lâmina de células gira para dentro, formando uma camada subjacente, através de um movimento em massa do tecido. (UW-MADISON, 2002; MONTANARI, 2013). Alguns dos movimentos morfogenéticos estão representados na Figura 1.5.

Através do processo de gastrulação, células do epiblasto são alocadas em três camadas germinativas definitivas: ectoderma, mesoderma e endoderma. A formação dos dois últimos folhetos ocorre através de movimentos celulares, da seguinte maneira: a) ingressão de células do epiblasto no sítio de transição epitélio-mesenquimal (linha primitiva); b) organização das células progenitoras do mesoderma em uma camada mesenquimal; c) incorporação das células progenitoras do endoderma em uma camada de endoderma visceral pré-existente. (LI & DING, 2010).

Todos os animais gastrulam. Embora a arquitetura da gastrulação varie enormemente entre as diferentes espécies, o processo é bastante conservado. A gastrulação é melhor compreendida em *Drosophila*, rã e galinha, do que em mamíferos. (BROWN, 1994).



(Adaptado de MONTANARI, 2013)

Fig. 1.5: Movimentos morfogenéticos da gastrulação

Epibolia: uma lâmina de células cresce sobre outras células. **Ingressão:** migração de células individuais dentro do embrião (movem-se através de pseudópodos). **Invaginação:** formação de uma bainha; penetração de uma estrutura em outra, o que faz com que uma superfície interna torne-se externa. **Involução:** uma lâmina de células gira para dentro, formando uma camada subjacente, através de um movimento em massa do tecido. À medida que a lâmina se move no local de rotação ativo (mostrado em azul), torna-se livre para se mover mais para cima sob o tecido exterior. **Extensão convergente:** células de uma camada tornam-se alongadas em uma direção mediolateral, que é perpendicular ao eixo anteroposterior, e intercalam-se, tornando a camada estreita e longa.

1.3.3.2.1 – GASTRULAÇÃO EM ROEDORES:

No início da gastrulação de ratos e camundongos (estágio de ovo cilíndrico), o ectoderma da MCI está alongado, a cavidade pró-amniótica já existe, e o ectoderma embrionário (epiblasto) é uma única camada epitelial, em forma de taça. Um tempo depois, o epiblasto será convertido em um embrião trilaminar e o plano corporal básico estará totalmente especificado, apresentando um cérebro inicial, coração e intestino. (BROWN, 1994).

A gastrulação começa com a formação de uma estrutura embrionária transitória, a linha primitiva, a partir do recrutamento de células do ectoderma embrionário (epiblasto). No caso de ratos e camundongos, os movimentos em massa que ocorrem durante este estágio são de difícil visualização, por que o epiblasto tem forma de taça e é invertido, isto é, o interior do

animal (intestino) está do lado de fora da taça. Então, a gastrulação torna-se aparente, somente com o aparecimento de um espessamento, localizado limite existente entre o ectoderma embrionário e extraembrionário, devido à emergência do mesoderma – e isto é o que irá definir a extremidade posterior do embrião, e também a linha primitiva. Com a formação da linha primitiva, o eixo anteroposterior torna-se morfológicamente evidente, com a linha primitiva localizada no lado posterior do embrião. Depois da definição do eixo A-P, o eixo esquerdo-direito (E-D) também fica evidente.

Com o progresso da gastrulação, a linha primitiva se alonga até a extremidade distal do ovo cilíndrico (ponta distal da taça), e o mesoderma continua a surgir anteriormente, e lateralmente, a partir de ambos os lados da linha primitiva (asas mesodérmicas). Em camundongos, a extremidade anterior da linha torna-se visível, como uma depressão (HEBEL & STROMBERG, 1986; ZHOU *et al.*, 1993; BROWN, 1994; TAM & BEHRINGER, 1997).

Na linha primitiva, células do epiblasto sofrem uma transição epitelial-mesenquimal, ingressam entre o epiblasto e o endoderma, e são incorporadas nas camadas germinativas de mesoderma e de endoderma definitivo. O mesoderma é formado como uma nova lâmina tecidual. O endoderma definitivo emerge do epiblasto através do nó, despreendendo o endoderma extraembrionário. O resultado de todo este processo é a entrada no estágio de placa neural. (BROWN, 1994).

Ao final da gastrulação, a partir da linha primitiva, surgem: o mesoderma axial (a partir da região nodal), mesoderma paraxial (oriundo do segmento anterior da linha), mesoderma lateral (derivado do segmento médio da linha), e mesoderma posterior (segmento posterior). As populações celulares são então distribuídas pelas três camadas germinativas definitivas justapostas, que são requeridas para formação de órgãos ou partes do corpo específicas. A justaposição desses tecidos facilita a ocorrência de interações indutivas, críticas para a especificação celular e padronização de cada tecido. (HEBEL & STROMBERG, 1986; TAM & BEHRINGER, 1997).

Em mamíferos, o desenvolvimento embrionário depende de uma série de interações célula-célula que levam à uma expressão gênica diferencial, que por sua vez determina destinos celulares diferentes (especificação condicional). E isso se repete sempre e sempre, de uma maneira hierárquica, uma vez que as células tomam decisões de maneira sequenciada, conforme ilustrado no Anexo 1.

1.3.3.3 – SOMITOGÊNESE:

A somitogênese é o processo pelo qual embriões de vertebrados adquirem uma estrutura segmentada, os somitos.

Os somitos são formados por brotamento, e derivam das extremidades anteriores de duas bandas paralelas de mesoderma pré-somítico (MPS), situado de cada lado da notocorda. Os somitos surgem em pares, ao longo do eixo anteroposterior, a intervalos de tempo regulares. Em ratos e camundongos, este intervalo corresponde a aproximadamente 2 horas, enquanto em galinhas e peixe-zebra, a 90 e 30 minutos, respectivamente. (VICKERS, 1983; AULEHLA & HERRMANN, 2004).

Um grupo de células aparentemente uniformes da extremidade anterior do MPS sofre alterações nas suas propriedades adesivas e migratórias, e se organizam formando um bloco epitelial de células, o somito. Os somitos são formados, obedecendo a uma sequência anterior-posterior (A-P) estrita, brotando da parte anterior do MPS, e a adição de células à parte posterior do MPS, ocorre a medida que o eixo corporal se alonga. Desse modo, o MPS trafega para baixo, ao longo do eixo (A-P). (BAKER *et al.*, 2006; CINQUIN, 2007). A diferenciação subsequente das células do interior dos segmentos somíticos leva à formação de vértebras, costelas, cartilagens, tendões, e de outras estruturas associadas à musculatura de vertebrados (BROWN, 1994; AULEHLA & HERRMANN, 2004).

Os somitos possuem células em seu interior, denominadas células do coração. Essas células e as células da parede ventromedial do somito nascente tornam-se o esclerótomo mesenquimal. A parede dorsolateral estratificada dos somitos nascentes formam uma estrutura epitelial, o dermomiótomo que mais tarde irá originar o dermátomo e o miótomo. O dermomiótomo se diferencia em músculos do esqueleto axial e derme, enquanto o esclerótomo formará a costelas, vértebras e discos intervertebrais (MATSUDA, 2000). A metade posterior de um somito e a metade anterior do somito subsequente formam uma vértebra, com exceção dos primeiros quatro somitos, que se unem, formando o osso occipital do crânio. (HEBEL & STROMBERG, 1986; BROWN, 1994).

Em ratos, no final do dia 9, ou durante o dia 10, ocorre o início da formação dos somitos, sendo que os primeiros pares são formados mais ou menos ao mesmo tempo. Com o desenrolar do desenvolvimento, cada novo somito formado é um pouco maior e apresenta um maior grau de diferenciação que o somito anterior. Da região lombar para a região caudal, os somitos tornam-se progressivamente menores. Em ratos, 65 somitos são formados, na seguinte ordem: 4 pares de somitos na região occipital; 8 pares de somitos na região cervical;

13 pares de somitos na região torácica; 6 pares de somitos na região lombar; 4 pares de somitos na região sacral; 30 pares de somitos na região caudal. (HEBEL & STROMBERG, 1986).

A formação dos somitos resulta de processos complexos que ocorrem no embrião de vertebrados, através de mecanismos estreitamente regulados no espaço e no tempo, de maneira que os segmentos são formados no tempo certo e no lugar certo. (AULEHLA & HERRMANN, 2004; BAKER *et al.*, 2006; CINQUIN, 2007).

O mecanismo que regula o tempo da segmentação de um novo somito, e o tamanho do somito já foi objeto de muita atenção. Embora muitos modelos teóricos, descrevendo aspectos parciais da somitogênese, tenham sido propostos, o entendimento completo da cadeia de expressões gênicas e de suas interações está longe de ser atingido. Porém, a compreensão sobre o controle molecular da somitogênese evoluiu, após a identificação de osciladores moleculares (relógio de segmentação) e de gradientes de moléculas de sinalização. Um relógio somitogênico foi identificado em galinha, peixe-zebra, camundongo e rã, o qual consiste na expressão de genes no MPS em tempos cíclicos (expressão oscilatória), correspondentes ao tempo necessário para a formação de um somito. Para muitos desses genes oscilatórios, são geradas ondas de expressão na extremidade posterior, que são espalhadas anteriormente, e um novo somito é formado quando a onda de expressão atinge a extremidade anterior do MPS. (BAKER *et al.*, 2006; CINQUIN, 2007).

Alguns modelos teóricos foram propostos para explicar a natureza dos mecanismos subjacentes à somitogênese, dentre os quais, o modelo “*clock and wavefront*” que é o mais discutido atualmente. De acordo com este modelo, a segmentação é regulada pela interação entre um relógio e uma *wavefront* de maturidade celular, com o relógio determinando o tempo de segmentação, e o *wavefront* determinando a extensão espacial do somito. Sendo assim, o oscilador (relógio) funcionaria como um marca-passo, ditando a periodicidade intrínseca da somitogênese, e o segundo componente, seria constituído por um gradiente morfogênico, isto é, um gradiente de mudança no desenvolvimento celular, ou de maturidade celular (*wavefront*), que forneceria as informações posicionais às células. A *wavefront* corresponde ao limite entre o MPS anterior e posterior, que pode ser definido em termos do tempo em que a segmentação é determinada, e em termos de expressão gênica; a velocidade da progressão da *wavefront* determina o tamanho do somito. (AULEHLA & HERMANN, 2004; BAKER *et al.*, 2006; CINQUIN, 2007).

1.3.3.3.1 - MODELO “*CLOCK AND WAVEFRONT*”

O modelo teórico “*clock and wavefront*” foi proposto pela primeira vez em 1976. Entretanto as identidades moleculares do relógio e do *wavefront* tornaram-se conhecidas algum tempo depois, a partir de algumas evidências experimentais que sugeriram que os genes oscilatórios que poderiam se ajustar ou estar implicados neste modelo pertenciam às vias de sinalização Notch, Wnt e FGF.

Foram propostos três mecanismos para geração das oscilações do relógio somitogênico: 1) Modulação da sinalização Notch pela proteína Lunatic fringe; 2) Auto-repressão de do gene *Her/Hes*; 3) *Feedback* negativo da proteína Axina2, sobre a sinalização Wnt. Teoricamente, cada um dos três mecanismos propostos, isoladamente, seria capaz de explicar as oscilações. Entretanto, no relógio de camundongos, esses mecanismos interagem, e o entendimento dessas inter-relações está longe de ser elucidado.

Sinalização Notch – Relógio

A via Notch produz oscilações, através da formação de uma alça de *feedback* negativo com o seu modulador, a proteína Lunatic fringe. Os genes *Her/Hes*, que são alvos *downstream* da sinalização Notch, também são capazes de gerar oscilações através de alça de *feedback* negativo.

Os genes *Noch1* e *Dll1* (codifica o ligante de Noch) são altamente expressos no MPS de embriões de camundongos e desempenham papéis importantes na formação dos limites inter- e intra-somáticos. A identificação de um oscilador molecular aconteceu em 1997, através da observação de que a expressão de *c-hairy1*-mRNA no MPS de embriões de galinha oscilava com a mesma periodicidade da formação dos somitos. O gene *c-hairy1* é um alvo da cascata de sinalização Notch. Subsequentemente, outros genes cíclicos, tais como *Lunatic fringe* (*Lfng*), *Hes7* e *Hes1* foram identificados em diferentes espécies, todos ligados à sinalização Notch. Os genes *Lfng* e *Hes7* são diretamente ativados pela sinalização Notch, indicando que a atividade da sinalização Notch no MPS é oscilatória. Foi proposto que uma alça de *feedback* negativo na cascata de sinalização Notch, estabelecida pela proteína *Lfng*, poderia operar o relógio da segmentação. (POURQUIÉ, 2001; CINQUIN, 2007).

A outra possibilidade para geração da periodicidade, envolve a transcrição do gene *Hes7*, um alvo direto da sinalização Notch. Este gene é transcrito de maneira oscilatória, e seu produto proteico (*Hes7*) aparece e desaparece periodicamente, durante o ciclo de segmentação. A proteína *Hes7* reprime a transcrição do gene *Hes7* e de outros alvos cíclicos de Notch. Então, a proteína *Hes7* poderia controlar a transcrição periódica dos alvos de Notch,

através de uma alça de *feedback* negativo, sendo a base molecular do relógio de segmentação. (CINQUIN, 2007).

Gradiente FGF8 (wavefront):

O segundo componente central do mecanismo que controla o ajuste gradual da posição dos limites dos segmentos, envolve um gradiente morfogênico, cujo pico (maiores concentrações) ocorre na extremidade caudal do embrião.

Altos níveis de transcrição do gene *Fgf8* foram detectados na parte mais posterior do MPS (caudal), implicando em níveis elevados de sinalização FGF8 nesta região, que diminuía, gradativamente, em direção à região mais anterior, formando um gradiente de FGF8, por um mecanismo de decaimento. O gradiente de sinalização FGF8 está envolvido no controle do tamanho do somito, bem como na determinação da posição na qual o limite do segmento será formado. Neste caso, o aumento local da concentração da proteína FGF8 no MPS provoca a diminuição do tamanho dos somitos, ao passo que a inibição da sinalização FGF8 resulta em aumento.

Sinalização Wnt:

A sinalização Wnt é essencial para o alongamento do corpo do embrião e para formação do MPS.

A expressão do gene *Axin2* no MPS é oscilatória, e depende diretamente da sinalização canônica de Wnt, e seu produto proteico, Axina2, regula negativamente a cascata de sinalização Wnt. Essas observações levaram à proposição de que um mecanismo de *feedback* negativo entre Wnt3a e seu inibidor Axina2, no MPS poderia constituir um segundo relógio somitogênico. A transcrição do gene *Actin2* é oscilatória devido à instabilidade da proteína Axina2 (causada por fosforilação), o que permite uma troca periódica da sinalização Wnt, entre os estados ativo e inativo. No MPS, Wnt3a produz oscilações regulares na ativação da sinalização Wnt dentro das células, através de uma alça de *feedback* negativo envolvendo o seu gene alvo *Axin2*, e a desestabilização subsequente da proteína Axina2. (AULEHLA & HERMANN, 2004).

Algumas evidências experimentais sugerem a existência de um gradiente da proteína Wnt3a ao longo do MPS, que desempenha papel decisivo na determinação da posição dos limites dos segmentos somíticos (POURQUIÉ, 2001). Neste caso, o aumento da concentração local da proteína Wnt3a no MPS provoca o aparecimento de somitos pequenos e, ocasionalmente, trocas nos limites de segmentos, nesses sítios. A regulação negativa da

sinalização Wnt, (através da expressão contínua de *Axin2* no MPS de embriões transgênicos construídos), resulta no aumento do tamanho dos somitos. (AULEHLA & HERMANN, 2004)

A sinalização FGF pode aumentar a sinalização Wnt. O FGF atua por meio de duas cascatas de sinalização, via MAP-quinase e via PI-3-quinase. Esta última tem a possibilidade de regular positivamente a atividade de Akt (PKB), que sabidamente inibe Gsk3 β . Gsk3 β é um inibidor da cascata de sinalização Wnt, que se liga a Axina/Axina2 e fosforila a β -catenina, tornando-a acessível para degradação proteossômica. A inibição da proteína Gsk3 β leva ao bloqueio da fosforilação da β -catenina e ao acúmulo subsequente β -catenina hipofosforilada no citoplasma, e em seguida, a sua translocação para o núcleo celular, onde regula diretamente a expressão dos genes alvos de Wnt. Então, há uma ligação entre as vias FGF e Wnt, através de Akt e Gsk3 β , que precisam ser melhor esclarecidas.

A análise da expressão *in situ* revelou que os genes *Lfn3* e *Axin2* são alternativamente regulados positiva e negativamente, no MPS de embriões de camundongos de 9,5 dias, demonstrando que as cascatas de sinalização Notch e Wnt são alternativamente ativadas no MPS, e apresentam algum grau de sobreposição. Alguns dados mostram uma ligação estreita (cruzada) entre as cascatas de sinalização Notch e Wnt, na parte oscilatória do MPS, sugerindo que as oscilações da atividade da sinalização Notch são dependentes de Wnt3a.

Todos os genes que atuam na somitogênese são ligados, ou ao relógio, ou ao gradiente, mas não aos dois. *Axin2* foi o primeiro gene a ser associado aos dois componentes centrais que controlam a segmentação, o oscilador e o gradiente. Este gene é um alvo direto do gradiente Wnt3a, e ao mesmo tempo apresenta um padrão de transcrição oscilatório, com a mesma periodicidade que ocorre no processo de segmentação. Além disso, Wnt3a controla a atividade oscilatória de Notch no MPS, bem como a expressão de *Fgf8* no broto da cauda. (POURQUIÉ, 2001; CINQUIN, 2007).

A via de sinalização Notch está ligada ao oscilador, e desempenha papel decisivo na formação do limite inter e intrassomático. O gradiente de sinalização FGF8 está envolvido no controle do tamanho do somito. E a via de sinalização canônica de Wnt3a, integra relógio e gradiente em um mecanismo global de controle do processo de segmentação. (POURQUIÉ, 2001; AULEHLA & HERMANN, 2004).

1.3.3.3.2 - LINHA PRIMITIVA E BROTO CAUDAL

A linha primitiva e o broto caudal são fontes de células para o MPS. Nessas estruturas, células mesenquimais com diferentes destinos de desenvolvimento são geradas, o

gradiente e o relógio são originados, e as células são dotadas com informação sobre seus posicionamentos ao longo do eixo A-P. A sinalização Wnt está envolvida em todos esses eventos. (POURQUIÉ, 2001).

As células do MPS são dotadas de informação posicional muito antes da formação dos segmentos. A formação de vértebras com diferentes formatos (cervical, torácica, lombar ou sacral), são manifestações morfológicas visíveis desta padronização. A especificação axial é diretamente controlada pela ação dos genes *Hox*. Mutações nesses genes produzem transformações homeóticas, isto é, segmentos (vértebras) adquirem uma identidade mais anterior ou mais posterior. (POURQUIÉ, 2001; AULEHLA & HERMANN, 2004).

A ativação dos genes *Hox* é, pelo menos em parte, controlada pela sinalização Notch e ligada ao relógio de segmentação, assegurando a regulação positiva de *Hox* no segmento apropriado. Entretanto, existem boas evidências que ligam a cascata de sinalização Wnt à expressão dos genes *Hox*. Camundongos carreando mutações no gene *Wnt3a* apresentam transformações vertebrais homeóticas, reminiscentes de mutações nos genes *Hox*. Além disso, *Cdx1*, um alvo direto da sinalização canônica Wnt, está envolvido na ativação do gene *Hox* e na padronização do eixo A-P. Então, a sinalização Wnt parece estar envolvida no controle dos genes *Hox*, via fatores de transcrição Cdx. (AULEHLA & HERMANN, 2004).

1.3.3.3.3 - NÚMERO DE SOMITOS

A formação dos somitos ocorre de forma periódica, numa sequência anterior-posterior fixa. Nos embriões de galinha, um novo somito é formado a cada 90 minutos, enquanto em ratos, a cada 2 horas, aproximadamente, sendo o espaçamento entre os somitos regular. O número de somitos é frequentemente usado como referência do estágio de desenvolvimento em que embriões de vertebrados se encontram.

Diferentes espécies possuem diferentes números de somitos, entretanto, todos os animais de uma determinada espécie formam o mesmo número de somitos. O número de somitos é frequentemente usado como referência do estágio de desenvolvimento em que embriões de vertebrados se encontram.

O número de somitos não é afetado por alterações no tamanho do embrião. Por exemplo, quando os tamanhos de embriões de *Xenopus laevis* foram experimentalmente reduzidos, o tamanho dos somitos foi ajustado, mas o número normal foi mantido. No camundongo mutante *amputated*, o comprimento do corpo é menor, os somitos são menores, mas o número permanece o mesmo. (AULEHLA & HERMANN, 2004; BAKER *et al.*, 2006).

1.4 – PLACENTA:

A placenta é o primeiro órgão a ser formado durante o desenvolvimento embrionário de mamíferos. Embora seja um órgão temporário, é a interface materno-fetal, através da qual as trocas metabólicas, de nutrientes e de gases entre mãe e feto ocorrem. (CROSS, 2005; SIMMONS & CROSS, 2005; FURUKAWA *et al.*, 2011 b). Trata-se de uma estrutura especializada que se desenvolve concomitantemente com o embrião, e é composta por vários tipos celulares, dentre os quais, células trofoblásticas. Apesar da estrutura da placenta variar entre as diferentes espécies de mamíferos, a morfologia básica, os principais tipos celulares e funções, são conservados. Entretanto, os hormônios específicos que governam o reconhecimento materno da gravidez são diferentes. Em humanos e em outras espécies de primatas, o trofoblasto produz gonadotrofina coriônica, que estimula diretamente a secreção de progesterona lútea, enquanto a placenta de roedores produz lactogênios. (FONSECA *et al.*, 2012).

A placenta corioalantóica é a principal placenta em mamíferos, do meio para o fim da gestação, e é formada pelo endométrio materno e o troectoderma embrionário (FURUKAWA *et al.*, 2011).

Em humanos e roedores (ratos e camundongos), a placenta definitiva é do tipo hemocorial, compreendida por um epitélio externo de origem trofoblástica, e uma rede vascular e estroma subjacentes, derivados do mesoderma embrionário. (CROSS, 2000; SIMMONS & CROSS, 2005). Estas placentas são morfologicamente discoides, e a interdigitação materno-fetal se dá ao nível labiríntico. A placenta, em sendo responsável pela nutrição fetal hemotrófica, desempenha duas funções elementares, a saber: *i*) assegura o fluxo de nutrientes maternos para placenta; *ii*) transfere nutrientes da placenta para o feto (SOARES *et al.*, 2012; DERELANKO & AULETA, 2014). Além das funções nutricionais, a placenta ainda ancora o feto à parede uterina, medeia a tolerância imune materna, medeia trocas gasosas (O₂/CO₂), remove o lixo embrionário produzido, funciona como barreira protetora contra a entrada de xenobióticos, além de secretar vários hormônios esteroides e citocinas (FURUKAWA *et al.*, 2011).

Em mamíferos, as placentas saco-vitelínica e a corioalantóica estão presentes durante a gestação. O saco vitelino absorve ativamente nutrientes do corion e da cavidade coriônica, e transportam esses nutrientes para o embrião através da circulação do saco vitelino, desempenhando um papel de placenta transitória durante os primeiros períodos pós-implantação, até o estabelecimento da placenta corioalantóica. Na maioria dos mamíferos, incluindo homens, a placenta vitelina torna-se vestigial após o primeiro trimestre. Por outro

lado, um saco vitelino invertido eventualmente poderá envolver o feto e desempenhar funções especiais, como o que ocorre em roedores e coelhos. (FURUKAWA *et al.*, 2011).

A placentação de roedores (ratos e camundongos), portanto, ocorre em dois momentos. Inicialmente é formada a placenta coriovitelina, em associação com a decídua antimesometrial que depois, é substituída pela placenta córioalantóica definitiva, desenvolvida na região mesometrial (CORRÊA, 2009). A placenta coriovitelina, constituída por células trofoblásticas gigantes, é transitória, sendo fisiologicamente importante entre a implantação e meados da gestação. Já a placenta corioalantóica, formada a partir do cone ectoplacentário, é compreendida por quatro fenótipos celulares diferenciados, *i.e.*, células trofoblásticas gigantes, células espongiotrofoblásticas, células trofoblásticas glicogênicas e células sinciotrofoblásticas. (HEBEL & STROMBERG, 1986; FONSECA *et al.*, 2012).

A placentação hemocorial é caracterizada por invasão trofoblástica intrauterina, seguida por remodelamento das artérias espirais uterinas (AIN *et al.*, 2003; DEY *et al.*, 2004; SOARES *et al.*, 2012).

1.4.1 – PLACENTA CORIOVITELINA E SACO VITELINO VISCERAL:

Nutrição histiotrófica é um processo através do qual o saco vitelino visceral de roedores (ratos) internaliza e degrada macromoléculas exógenas, levando os seus produtos de degradação até o embrião, para serem usados na biossíntese molecular *de novo*. Este processo é importante para o desenvolvimento embrionário, particularmente durante o início da gestação e organogênese, até a formação da placenta, e é realizado através do saco vitelino visceral (SVV), um tecido simples, constituído por um epitélio derivado do endoderma (apresentando um sistema vacuolar altamente ativo), uma camada fina de mesoderma, e células endoteliais (ilhas sanguíneas e vasculatura vitelina dentro da qual as células sanguíneas primordiais se formam). O SVV tem capacidade de endocitar moléculas exógenas e transportá-las para o embrião, intactas, ou então, degradam estas moléculas e transportam seus produtos de degradação como precursores metabólicos. O último processo é denominado nutrição histiotrófica, representando a principal rota para precursores metabólicos como aminoácidos. O mecanismo de captação de macromoléculas se dá por uma combinação de pinocitose e endocitose mediada por receptores. (AMBROSO & HARRIS, 2012). Em ratos, o SVV é uma membrana importante para nutrição, durante a primeira metade da gestação, atuando como placenta e conectando mãe e embrião, desde a sua formação (DG 7-7,5), até o estabelecimento da circulação cório-alantóica. Neste caso, o processo de diferenciação da

placenta, formando as conexões vasculares necessárias para o transporte de nutrientes, começa em torno do DG12. (ALCOLEA *et al.*, 2008). Embriões de ratos de 11 dias pós-concepção mostram: Saco vitelino visceral invertido (apresentando vasculatura proeminente), cobrindo todo o embrião, e saco amniótico. No DG11 o embrião é circundado pelo amnion e pelo saco vitelino visceral invertido, cujo epitélio está voltado para parede uterina. A superfície do saco vitelino apresenta epitélio diferenciado contendo células sanguíneas subjacentes em desenvolvimento. (KIMMEL & BUELKE-SAM, 1994; AMBROSO & HARRIS, 2012).

Apesar dos sacos vitelinos viscerais, humano e de roedores, se assemelharem estruturalmente, eles diferem na sua orientação. Nos conceptos humanos o SVV flutua como um balão dentro da cavidade celômica, e apresenta a camada celular endocítica voltada para o interior - os nutrientes são absorvidos dentro da cavidade exocelômica, e transferidos para cavidade do SVV, onde são endocitados. Os roedores apresentam o SVV invertido, com a camada endodérmica endocítica voltada para fora, e a cavidade do SVV situada entre as camadas epiteliais derivadas dos endodermas visceral e parietal. Nos conceptos de ratos, os nutrientes são absorvidos diretamente na cavidade do SVV e endocitados. O SVV de roedores não se degenera depois que a placenta definitiva já está totalmente formada e funcional, e aparentemente continua contribuindo, em algum grau, para absorção de nutrientes. Em ambas as espécies, a absorção de nutrientes ocorre na camada celular endodérmica do SVV. (ZOHAN & SARKAR, 2010).

A placenta vitelínica é formada, na medida em que o endoderma parietal do saco vitelino vai sendo revestido pelo mesoderma extraembrionário. Este tecido torna-se vascularizado durante a primeira metade da gestação, e realiza as trocas metabólicas e gasosas com o sangue materno extravasado na superfície das células trofoblásticas primárias. (CORRÊA, 2009).

1.4.2 – PLACENTA CORIOALANTÓICA (HEMOCORIAL):

Antes da placentação, as células TE do blastocisto rompem o epitélio uterino, penetrando a membrana basal e o tecido conectivo subjacente. Subsequentemente, uma invasão mais intensa ocorre, envolvendo remodelamento endometrial e vascular. A invasão endovascular é a expansão das células trofoblásticas dentro da artéria espiral, localizada na decídua uterina. As células trofoblásticas endovasculares substituem as células endoteliais e passam a envolver os vasos locais, e migram para glândula metrial no DG13-14. A invasão

trofoblástica intersticial envolve a penetração das células trofoblásticas através do estroma uterino, e ocorre por volta do DG15. Os trofoblastos endovasculares invasivos, bem como as células uNK são absolutamente necessários para o remodelamento das artérias espirais. (AIN *et al.*, 2003; FURUKAWA *et al.*, 2011; FONSECA *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2012).

Em ratos a invasão intersticial é semelhante à de humanos, e se estende para além da decídua, durante o último terço da gestação. Em homens e ratos, a invasão trofoblástica ocorre tanto intersticial, como endovascularmente, enquanto no camundongo, a invasão das artérias espirais maternas é limitada ao compartimento da decídua mesometrial, e a invasão intersticial não atinge o triângulo mesometrial (glândula metrial). Ratos e homens exibem um padrão de desenvolvimento de placenta hemocorial altamente invasivo, e a profundidade das interações materno-fetais estabelecidas é muito semelhante. (FONSECA *et al.*, 2012).

A glândula metrial é uma estrutura que se desenvolve no triângulo mesometrial (na parede uterina), a partir do início da gestação. Esta glândula é composta por uma população mista de células endometriais decidualizadas, células uNK, artérias espirais e fibroblastos. (FURUKAWA *et al.*, 2011).

Histologicamente, a parte materna da placenta corioalantóica do rato, consiste na decídua e na glândula metrial. A parte fetal consiste da zona labiríntica e da zona basal. Além disso, dois tipos distintos de membranas envolvem o feto: saco vitelino (camada mais externa) e amnion (mais interno). (FURUKAWA *et al.*, 2011).

1.4.3 - DESENVOLVIMENTO DA PLACENTA CORIOALANTOICA EM RATOS:

A placenta corioalantóica de ratos é formada a partir de células tronco produzidas pelo ectoderma extraembrionário, derivado do trofoectoderma (TE) polar, por volta do DG9, no aspecto mesometrial (HEBEL & STROMBERG, 1986 FURUKAWA *et al.*, 2011; FONSECA *et al.*, 2012).

O TE polar forma o cone ectoplacentário e invade o interior da decídua. As arestas e o centro do cone ectoplacentário se diferenciam, respectivamente, em células trofoblásticas gigantes secundárias e espongiotrofoblastos, e essas massas celulares formam a zona juncional. A zona labiríntica surge da fusão do mesoderma alantóico (alantoide, derivado do intestino posterior embrionário) e o ectoderma coriônico (córion, que é a membrana embrionária do cone ectoplacentário do lado embrionário). Na camada labiríntica, no sítio de troca entre o sangue materno e fetal, as células trofoblásticas fundem formando o sinciotrofoblasto, o que resulta no estabelecimento da barreira para trocas materno-fetais. A

zona juncional limita a decídua mesometrial uterina. (ARMANT, 2005; SIMONS & CROSS, 2005; FURUKAWA *et al.*, 2011; FONSECA *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2012).

No endométrio, as células do estroma se diferenciam (após estimuladas pela aposição do blastocisto), formando a matriz estrutural básica da decídua.

No DG11, duas regiões placentárias morfológica e funcionalmente distintas são identificadas: uma porção labiríntica interna que contém vasos maternos e fetais, e uma zona juncional externa (espongiotrofoblasto) contendo apenas vasos maternos. (HEBEL & STROMBERG, 1986).

Na placenta corioalantóica, quatro fenótipos celulares diferenciados podem ser identificados, *i.e.*, células trofoblásticas gigantes, células espongiotrofoblásticas, células trofoblásticas glicogênicas e células sinciotrofoblásticas. Esses subtipos de células trofoblásticas especializadas surgem durante o desenvolvimento, fomentando funções, como por exemplo: as células trofoblásticas invasivas promovem o fluxo sanguíneo materno para o sítio de implantação; as células que se fundiram formando um sincício se expandem e se dobram, aumentando a superfície da área de transporte. (CROSS, 2000). As células parenquimais da placenta são células trofoblásticas especializadas, que participam de dois tipos de interação: 1) Células trofoblásticas que se associam com a vasculatura materna, especializadas em facilitar o fluxo de nutrientes para a placenta (rato: zona juncional; humano: trofoblasto extraviloso); 2) Células trofoblásticas residentes nas proximidades da vasculatura fetal que promovem a transferência de nutrientes para o feto (rato: zona labiríntica; humanos: trofoblasto viloso). (FONSECA *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2012).

Zona juncional (= zona basal = espongiotrofoblasto = trofoesponjoso = região esponjosa):

A zona juncional está localizada entre o tecido decidual uterino e a zona labiríntica, limitando a decídua uterina mesometrial (FONSECA *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2012). Quatro linhagens trofoblásticas se diferenciam, a partir de células progenitoras existentes dentro do espongiotrofoblasto: células trofoblásticas gigantes, células espongiotrofoblásticas, células glicogênicas e células trofoblásticas invasivas (MEHROTRA, 1988; SOARES *et al.*, 2012).

As células espongiotrofoblásticas são o principal componente estrutural da zona basal e estão situadas imediatamente acima da camada de células trofoblásticas gigantes, próximas à base do labirinto (SOARES *et al.*, 2012).

As células trofoblásticas gigantes, localizadas na interface materno-fetal, são as principais células endócrinas da placenta, uma vez que sintetizam e secretam hormônios e

citocinas pertencentes à família das prolactinas (AIN *et al.*, 2003; WOODING & BURTON, 2008; SOARES *et al.*, 2012).

As células glicogênicas derivam do espongiotrofoblasto, e são transitoriamente detectadas na zona basal, embebidas no espongiotrofoblasto, no meio da gestação. Estas células formam pequenas ilhas de células glicogênicas, e a maioria delas desaparece ao final da gravidez. A função biológica dessas células ainda não é bem entendida, mas parecem estar relacionadas ao metabolismo de glicogênio, além de serem consideradas como reservatório energético. (AIN *et al.*, 2003; FONSECA *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2012).

Os trofoblastos invasivos, originados a partir das células glicogênicas invadem o interior da decídua e da glândula metrial (invasão intersticial). As células trofoblásticas invasivas aparecem pela primeira vez, no meio da gestação, e são células que saem da zona juncional e entram no compartimento uterino mesometrial, onde penetram e cercam artérias espirais uterinas. As células trofoblastos que invadem o interior dos vasos estão situadas entre a vasculatura, e desempenham papel no remodelamento das artérias espirais uterinas. (MEHROTRA, 1988; AIN *et al.*, 2003; SOARES *et al.*, 2012).

Zona labiríntica:

A zona labiríntica está situada na interface fetal, e consiste de uma malha de sangue materno (sinusoides) delimitada por um septo trofoblástico (formado por epitélio trofoblástico trilaminar e capilares fetais). O labirinto é constituído por células trofoblásticas gigantes, células sinciciotrofoblásticas, células mesenquimais fetais e vasculatura. (FURUKAWA *et al.*, 2011; FONSECA *et al.*, 2012).

Os sinusoides maternos cheios de sangue materno passam entre o septo trofoblástico sem endotélio. O epitélio trofoblástico que entra em contato direto com o sangue materno é referido como citotrofoblasto. O citotrofoblasto apresenta numerosos microvilos sobre a sua superfície e contem muitas vesículas pinocíticas. Debaxo da camada citotrofoblástica, existem duas camadas de sinciciotrofoblasto, do lado dos sinusoides maternos, que formam a barreira placentária, na periferia da parte fetal da placenta. Os capilares fetais são fenestrados (os poros contribuem para alta permeabilidade dos capilares fetais). O sangue materno e fetal chegam muito perto um do outro, e as trocas materno-fetais ocorrem na zona labiríntica. (FURUKAWA *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2012).

As células do sinciciotrofoblasto são multinucleadas, e formadas pela fusão de células trofoblásticas gigantes progenitoras (citotrofoblasto). As células gigantes regulam fluxo sanguíneo materno nos sítios de troca, e estão implicadas no transporte bidirecional de

nutrientes e lixo entre os compartimentos materno e fetal (FONSECA *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2012).

A placenta atinge o auge do seu desenvolvimento no DG16. Neste momento, o labirinto contém lamelas correndo em paralelo ao eixo da placenta, e os sinos maternos e capilares fetais estão distribuídos na mesma direção. As artérias fetais entram no centro da placenta, e, com o tempo, surgem pequenos vasos, que vão formar uma rede de capilares enveloados. Os capilares venozos tornam-se menos enrolados e fazem o fluxo do sangue oriundo de vênulas e veias. (HEBEL & STROMBER, 1986).

O tipo de placenta e o início da placentação em ratos e humanos têm muitas similaridades, como por exemplo, o tipo e o grau de profundidade da invasão trofoblástica (FONSECA *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2012), mas existem algumas diferenças (duração dos períodos embrionário e fetal, tipo de implantação, função da placenta vitelina, estrutura da placenta, síntese endócrina, etc) que devem ser levadas em conta, quando se tratar de extrapolar para homens, os dados obtidos nesses animais. De acordo com FURUKAWA e colaboradores (2011), para extrapolar dados de rato para homem, as diferenças e as similaridades entre as placentas de ratos e de homens devem ser conhecidas, inclusive sob o ponto de vista macroscópico e histopatológico, conforme ilustrado no Anexo 2.

1.4.4 - PLACENTA: ALVO TOXICOLÓGICO

Durante o desenvolvimento embrionário, mãe e feto mantêm uma relação muito próxima, e formam a unidade placentária materno-fetal. A placenta definitiva (corioalantóica) é composta por uma variedade de tipos celulares diferenciados (trofoblastos), que desempenham funções especializadas. A placenta cresce rapidamente por um período pequeno, mantendo um alto fluxo sanguíneo, e funcionando como: barreira protetora contra xenobióticos, interface de trocas materno-fetais de gases (O_2/CO_2) e de nutrientes requeridos para o desenvolvimento embrionário, órgão metabolizador de drogas, e órgão endócrino. (CROSS, 2005; SIMMONS & CROSS, 2005; FONSECA *et al.*, 2012).

A placenta é um órgão altamente suscetível para ação adversa de várias drogas e de outras substâncias químicas. As injúrias ou depressões funcionais da placenta induzidas por estas substâncias, exercem efeitos adversos sobre a manutenção da gestação, crescimento e desenvolvimento fetal, podendo levar à reabsorção, mortalidade ou à teratogênese. Dentro desse contexto, a placenta é um importante órgão alvo para avaliação da toxicologia do

desenvolvimento de embriões, e para a compreensão dos mecanismos de toxicidade. (FURUKAWA, *et al.*, 2011 b; TAKI *et al.*, 2012).

Nos estudos de toxicidade reprodutiva, o índice de toxicidade da placenta é fornecido pela diferença de peso placentário, e a avaliação histopatológica do órgão normalmente não é conduzida, sendo os dados de avaliação morfológica e histopatológica da placenta escassos, em experimentos *in vivo*. Entretanto, muitos tipos diferentes de lesões patogênicas placentárias podem ser induzidos pela exposição à substâncias químicas, dependendo da substância testada e do período de exposição. Portanto, a abordagem histopatológica da patogênese da placenta, consiste numa ferramenta importante, para compreensão do mecanismo de teratogenicidade, particularmente no que se refere à letalidade e ao retardo do desenvolvimento. (FURUKAWA *et al.*, 2011 b).

O tamanho da placenta, a arquitetura da placenta, os processos do desenvolvimento, os processos patológicos, e as interações metabólicas com o feto, a regulação do *status* nutricional, são fatores que estão implicados no transporte e nos mecanismos metabólicos envolvidos nas trocas de nutrientes entre placenta e feto (HAY, 1995; CROSS & MICKELSON, 2006; FURUKAWA *et al.*, 2011 b). Por exemplo, uma placenta pequena, *per se*, é o maior limitante da transferência adequada de glicose, da circulação materna para circulação fetal, que é absolutamente crucial para o metabolismo e o crescimento fetal normal, uma vez que a glicose é o principal substrato energético para a placenta e para o feto (HAY, 2006; FURUKAWA, *et al.*, 2011 b).

FURUKAWA, *et al.*, (2011 b), descreveram e classificaram várias lesões histopatológicas da placenta de ratas, induzidas por muitas drogas, inclusive por agentes antineoplásicos. Dependendo da droga e do período de exposição, tipos diferentes de alterações foram registrados. Por exemplo, FURUKAWA, *et al.* (2011 b) classificaram esses achados histopatológicos em 3 grandes categorias: i) Lesões associadas com aumento do peso placentário (hipertrofia da placenta); ii) Lesões associadas com diminuição do peso placentário (placenta pequena); iii) Lesões que ocorrem sem alterações do peso placentário. Por exemplo, a exposição ao monóxido de carbono provoca uma lesão histopatológica associada com o aumento do peso da placenta, observado como hipertrofia. Por outro lado, várias classes de substâncias químicas provocam lesões histopatológicas distintas, porém associadas à diminuição do peso placentário, levando à formação da placenta pequena. Dentre estas substâncias podemos destacar o ácido valproico, a clorpromazina, glicocorticoides, estreptozotocina, TCDD, e drogas antineoplásicas (etilnitrosureia, busulfan, 6-MP, etc). A última categoria proposta por FURUKAWA, *et al.*, (2011 b), inclui as lesões histopatológicas que ocorrem sem alteração do peso placentário, que por sua vez podem ocorrer de duas

maneiras: 1) Através de hipoplasia hipoplasia da decídua/glândula metrial, neste caso sendo causada, por exemplo, pela exposição a substâncias como fungicidas benzimidazólicos, hidroxureia, mitomicina, cisplatina, tamoxifeno, etc; 2) Através da degeneração vacuolar do epitélio do saco vitelino (azul de tripano, Triton, sucrose, leupeptina, somatomedina, etanol, etc).

1.5 – O PROCESSO DE OSSIFICAÇÃO:

O desenvolvimento normal dos ossos do rato ocorre no final da gestação, no período perinatal (DG19-DG21). Neste momento, o esqueleto em formação apresenta ossos em diferentes estágios de maturação (ossificação), *i.e.*, variando entre ossos que ainda não foram formados e encontram-se ausentes, ossos que ainda não estão completamente ossificados, e ossos que já se encontram totalmente ossificados, dependendo da região esquelética. Alguns ossos são ossificados no período pós-natal, poucos dias depois do nascimento. Em um determinado momento do desenvolvimento, qualquer redução da velocidade de ossificação, em relação ao padrão normal de maturação esperado, é considerado um retardo de crescimento (FRITZ & HESS, 1970; ARIYURI *et al.*, 1982; CHAHOUD & PAUMGARTTEN, 2005).

Os ossos são formados pela substituição de tecido conectivo derivado do mesênquima, por osteócitos, através de dois processos diferentes: ossificação intramembranosa e ossificação endocondral.

Durante a ossificação intramembranosa, o mesênquima primitivo é substituído diretamente por osso. Inicialmente, o mesênquima, que é altamente condensado e vascularizado, é rodeado por uma rede de fibras colágenas, e posteriormente embebido por uma substância (gel). As células mesenquimais mais superficiais se agrupam e se diferenciam em osteoblastos, substituindo o tecido conectivo primitivo por uma matriz óssea, que rapidamente é calcificada. À medida que a massa óssea é desenvolvida, os osteoblastos são encarcerados dentro da matriz óssea e tornando-se osteócitos (células ósseas maduras), enquanto osteoblastos da superfície continuam formando um osso novo. O calvário (ossos frontal, parietais e interparietais, occipital) é formado por este processo. (SASANO *et al.*, 1997; CARNEY & KIMMEL, 2007)

Na ossificação endocondral, o mesênquima se diferencia em uma cartilagem intermediária, que serve como um molde. O arcabouço cartilaginoso é subsequentemente removido e substituído por osso. Este processo ocorre através das seguintes etapas: 1) diferenciação de células mesenquimais em condrócitos; 2) alongamento e alinhamento dos condrócitos, ao longo do eixo de desenvolvimento; 3) proliferação dos condrócitos seguida de alteração morfológica (adquirem forma cuboide); 4) vacuolação; 5) desintegração celular, deixando espaços vazios na matriz; 6) calcificação da matriz, e substituição da cartilagem por osso. Os ossos da base do crânio, coluna vertebral, ossos da região peitoral e pélvica, e ossos longos, são formados por este processo. (SASANO *et al.*, 1997; CARNEY & KIMMEL, 2007).

Em roedores, a mandíbula, a maxila, os ossos pélvicos, as costelas e os ossos longos dos membros ossificam mais cedo, enquanto falanges, centros vertebrais torácicos e lombares, esternobras e calvário, ossificam em momentos mais avançados da gestação.

A ossificação de cada centro vertebral começa com dois centros de ossificação separados, que posteriormente se fundem, formando um centro de ossificação em forma de *dumb-bell*, que mais tarde adquire um formato mais ovoide. As vértebras torácicas, lombares e sacrais ossificam antes, enquanto as cervicais e caudais, mais tarde. Dentre as esternobras, as esternobras de 1-4 calcificam primeiro, seguido da 6ª esternobra, e por último, a 5ª esternobra. (CARNEY & KIMMEL, 2007).

1.6 - MALFORMAÇÕES E VARIAÇÕES ESQUELÉTICAS:

As alterações anatômicas esqueléticas observadas a termo podem ser classificadas como variações ou malformações (CARNEY & KIMMEL, 2007; CHAHOUD & PAUMGARTTEN, 2009).

Variações são alterações menores que ocorrem de maneira transitória, e tendem a desaparecer com o tempo, *i.e.*, são reparadas durante a vida pós-natal. Essas alterações são pouco prováveis de afetarem a sobrevivência ou a saúde, e podem ocorrer espontaneamente. Malformações são alterações estruturais mais severas e permanentes, que afetam adversamente a sobrevivência, o desenvolvimento, e a saúde, podendo comprometer a fertilidade, e a longevidade. (KHERA, 1981; CARNEY & KIMMEL, 2007; CHAHOUD & PAUMGARTTEN, 2009).

Durante o desenvolvimento dos ossos fetais, as ocorrências de “retardos na ossificação” são frequentes. Retardos são atrasos provisórios no crescimento, ou na morfogênese (KHERA 1981; CARNEY & KIMMEL, 2007).

Retardo na ossificação é um termo que se refere à diminuição da quantidade de osso mineralizado, em relação ao que seria esperado para um determinado momento do desenvolvimento, ou idade. Na maioria das vezes, essas alterações são transitórias e consideradas como variações. Nesses casos, o arcabouço da cartilagem geralmente permanece intacto e a mineralização (ou remodelamento) ocorre mais tarde. (CARNEY & KIMMEL, 2007; CHAHOUD & PAUMGARTTEN, 2009).

O grau de ossificação do esqueleto fetal é geralmente considerado um indicador do crescimento e do desenvolvimento. Em ratos, alterações esqueléticas, como ossos não ossificados, pobremente ossificados, ou apresentando ossificação incompleta, são ocorrências

que indicam retardo na ossificação. (KHERA 1981; SOLECKI *et al.*, 2001; CARNEY & KIMMEL, 2007; CHAHOUD & PAUMGARTTEN, 2009).

Durante o desenvolvimento pré-natal, a ossificação do esqueleto fetal pode ser impactada por alterações na homeostase materna, incluindo fatores fisiológicos, fatores hormonais, e *status* nutricional materno.

Os fatores fisiológicos gerais, como fatores de crescimento (TGF- α e EGF), circulação placentária e transferência de nutrientes, tamanho da placenta, tiroxina, e IGF-1, podem influenciar, indiretamente, a velocidade de ossificação do esqueleto fetal, que por sua vez está atrelada à velocidade do crescimento fetal (CARNEY & KIMMEL, 2007)

Alguns hormônios maternos implicados na ossificação fetal regulam, de forma coordenada, os níveis sistêmicos de cálcio, como hormônios da paratireoide (PTH) e calcitonina (tireoideano). O PTH e a vitamina D aumentam os níveis sanguíneos de cálcio, estimulando a reabsorção óssea, enquanto a calcitonina provoca o efeito inverso. O PTH também está presente na placenta, e controla a atividade da bomba de cálcio placentária, mantendo o feto hipercalcêmico. (CARNEY & KIMMEL, 2007).

A má nutrição materna, ou a menor captação de alimento, são mecanismos comuns através dos quais o crescimento fetal e a ossificação diminuem. Na última semana de gestação os estoques nutricionais maternos são consumidos intensamente, para dar suporte ao rápido crescimento fetal. No rato, a restrição proteica materna, por exemplo, retarda o desenvolvimento de centros de ossificação de ossos, como o esterno. Neste caso, há uma relação aparentemente linear, entre peso corporal e o número e forma dos centros de ossificação: quanto maior o peso fetal, maior o número de centros de ossificação. Além disso, deficiências em nutrientes específicos, como o zinco, podem também atrasar a ossificação do esqueleto fetal. (KHERA 1981; TAUBENECK *et al.*, 1994; CARNEY & KIMMEL, 2007).

A exposição *in utero* a inúmeros xenobióticos provoca atrasos na ossificação, em decorrência de um retardo generalizado do crescimento fetal, ou de toxicidade materna. O retardo generalizado do crescimento, geralmente é acompanhado pela redução da mineralização de ossos, que normalmente ossificariam nos últimos dias de gestação, como falanges, 6^a e 5^a esternibras, calvário, e centros de ossificação de vértebras cervicais, torácicas, sacrais e caudais. O retardo da ossificação fetal, resultante de toxicidade materna, pode ocorrer em função de uma diminuição da ingestão calórica materna, da redução do fluxo sanguíneo útero-placentário, de deficiências vitamínicas, hipóxia, etc. (DESESSO, 1987; CARNEY & KIMMEL, 2007).

Apesar de retardos da ossificação do esqueleto fetal, serem considerados meras variações, em algumas situações essas observações mereceriam mais atenção, como por

exemplo; i) quando envolvem ossos que estariam normalmente bem ossificados nos fetos a termo (costelas, clavícula, ossos longos dos membros, centros vertebrais lombares); ii) quando os moldes cartilagosos apresentam anomalias; iii) quando ocorrem na ausência de diminuições do peso fetal; iv) quando ocorrem na ausência de toxicidade materna; v) quando estão associados à teratogênese. Isto quer dizer que, a ossificação incompleta, quando é detectada em uma única estrutura, enquanto o resto do esqueleto está normalmente ossificado, é muito mais importante, do que quando é acompanhada por diminuição do peso corporal fetal, ou por outros sinais de imaturidade esquelética. (SOLECKI *et al.*, 2001; CARNEY & KIMMEL, 2007).

O aumento da incidência de variações ósseas induzidas por substâncias químicas, significa que estas substâncias têm potencial para perturbar o desenvolvimento do esqueleto. Além disso, dependendo das condições de exposição, ou das espécies consideradas, as perturbações no desenvolvimento ósseo podem ter consequências diversas, podendo ser mais, ou menos severas. Nestas situações, dados de controles históricos e experimentais (incidências espontâneas) são extremamente importantes, para auxiliar na interpretação das observações de atrasos na ossificação, bem como na caracterização do padrão normal de esquelotogênese. (CARNEY & KIMMEL, 2007; CHAHOUD & PAUMGARTTEN, 2009).

Quando uma observação esquelética é variação, ou malformação, é difícil classificar. A persistência dessas alterações anatômicas na vida pós-natal, e suas consequências para sobrevivência, crescimento e saúde, são pouco conhecidas. (SOLECKI *et al.*, 2001; CHAHOUD & PAUMGARTTEN, 2009).

1.7 - DROGAS ANTITUMORAIS

A compreensão do conceito de ciclo celular é importante, por que muitas drogas antitumorais atuam somente sobre células que estão em constante ciclagem, como é o caso de células neoplásicas. As drogas ciclo celular-específicas, por exemplo, exercem seus efeitos sobre células que estão se dividindo ativamente, porém, não agem sobre células quiescentes (em G₀). Algumas dessas drogas atuam em fases específicas do ciclo celular. Por outro lado, drogas ciclo celular-inespecíficas atuam sobre as células em qualquer etapa do ciclo celular, incluindo a fase G₀. Estes agentes químicos, ou os seus metabólitos, apresentam porções eletrofílicas que interagem com sítios nucleofílicos presentes na molécula de *DNA*, geralmente formando ligações cruzadas e produzindo lesões. (ALMEIDA *et al.*, 2005).

A hidroxiureia (HU) e a mercaptopurina (6-MP), substâncias utilizadas no presente estudo, são agentes quimioterápicos citotóxicos/citostáticos, que interferem com a síntese de *DNA*, através de vias metabólicas distintas, *i.e.*, são antimetabólitos fase S-específicos (WINKELSTEIN, 1975; HERKEN *et al.*, 1978). Como veremos mais detalhadamente a seguir, a inibição da síntese de *DNA* parece ser o principal mecanismo de ação pelo qual, estas drogas, exercem as suas funções terapêuticas. A HU inibe a enzima ribonucleotideo redutase, que catalisa a conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos, e bloqueia a síntese de *DNA*, resultando em citotoxicidade na fase S e morte celular rápida, sem afetar a síntese de *RNA* ou de proteínas. Já a 6-MP é uma pró-droga ativada intracelularmente pela via *HGPRT*, através de uma série de processos multienzimáticos envolvendo cinases, originando os nucleotídeos de 6-tioguanina (6-TGNs), que são incorporados ao *DNA* celular, inibindo a sua síntese.

Tanto a HU, como a 6-MP, são agentes embriotóxicos potentes em animais experimentais. O mecanismo de ação embriotóxico da 6-MP está relacionado à incorporação de nucleotídeos de 6-tioguanina ao *DNA*, enquanto o da HU ainda não está totalmente esclarecido. Os dois antineoplásicos também provocam danos ao *DNA*, induzindo a interrupção do ciclo celular para reparo e apoptose. Recentemente, alguns autores sugeriram, que a indução da apoptose em tecidos embrionários pode estar relacionada ao aparecimento de defeitos morfológicos e funcionais fetais (BARR & BEAUDOIN, 1981; WOO *et al.*, 2003; WOO *et al.*, 2006; KANEMITSU *et al.*, 2009 a, b, c; DOI, 2011).

1.7.1 - HIDROXIUREIA (HU)

1.7.1.1 - EXPOSIÇÃO HUMANA

A HU foi aprovada pelo *FDA* (*Food and Drug Administration*) como agente antineoplásico, e para o tratamento de doenças falciformes. Enquanto droga quimioterápica, a HU é indicada para o tratamento de melanoma, leucemia mielocística crônica resistente e carcinoma de ovário metastático recorrente inoperável, podendo ser também administrada, em associação à radioterapia, no controle de cânceres celulares escamosos (epidermóides) de cabeça e pescoço. Já no tratamento de doenças falciformes⁵, incluindo anemia falciforme, doença SC e talassemia, a HU é utilizada para reduzir as frequências de crises dolorosas e a necessidade de transfusões de sangue em pacientes adultos. Nas aplicações quimioterápicas, se o tratamento for efetivo e não resultar em toxicidade severa para o paciente, a HU pode ser usada indefinidamente, e nas doenças falciformes, durante períodos de tempo bastante longos, ou em ciclos terapêuticos repetidos. Embora não aprovado pelo *FDA*, o uso da HU em

⁵A hemoglobina normal é um tetrâmero composto por quatro cadeias de globina, duas cadeias α e duas cadeias β . A anemia falciforme é uma hemoglobinopatia resultante de uma mutação de ponto A→T no gene que codifica a β -globina, resultando na substituição da valina pela glutamina, na posição 6 da cadeia polipeptídica. Em indivíduos homocigotos para o gene mutante da β -globina, existem somente cadeias β anormais (β^S) para construção da hemoglobina. A hemoglobina anormal, designada hemoglobina S (HbS), é polimerizada dentro dos eritrócitos, quando a tensão de oxigênio diminui, ou quando a concentração de hemoglobina local aumenta. A polimerização da hemoglobina implica em perda da flexibilidade do eritrócito, o que promove alterações em sua morfologia, incluindo a aquisição da forma de foice. Estes eritrócitos, em não passando normalmente pela microcirculação, obstruem o fluxo sanguíneo e causam isquemia nos tecidos afetados, podendo levar à ocorrência de episódios chamados “crises vaso-oclusivas”. As doenças SC ocorrem em indivíduos apresentando as mutações A→T (produzindo cadeias β^S) e A→G (produzindo cadeias β^C), *i.e.*, heterocigotos para as hemoglobinas S e C. A talassemia falciforme ocorre quando um gene que codifica a cadeia β sofre a mutação S, e o outro, sofre mutações que resultam, ou na redução, ou na perda da transcrição da cadeia β . Indivíduos com talassemia do tipo β^+ produzem alguma hemoglobina A, e apresentam uma forma menos severa da doença, enquanto os indivíduos que não produzem hemoglobina A (β^0), apresentam um curso clínico semelhante aos doentes SS. (LIEBELT *et al.*, 2007).

crianças apresentando doenças celulares falciformes, bem como no tratamento de psoríase e infecção por HIV, tem sido relatado com frequência. (LIEBELT *et al.*, 2007).

Apesar do mecanismo de ação antineoplásica da HU não ser totalmente conhecido, a sua utilização quimioterápica baseia-se na inibição da enzima ribonucleotideo redutase (RR)⁶, que catalisa a conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos, levando à uma diminuição parcial do *pool* de desoxirribonucleotídeos (Fig. 1.6). O esgotamento do *pool* de desoxirribonucleotídeos, embora não seja completo, é suficiente para levar à inibição da síntese do *DNA*, resultando em citotoxicidade na fase S do ciclo celular, morte celular rápida, e ao aprisionamento de células malignas em G₁. O efeito citotóxico da HU parece justificar a sua utilização em desordens mieloproliferativas, como leucemia mielóide crônica, policitemia vera, etc. Por outro lado, a pausa da ciclagem de células malignas em G₁ aumenta a sensibilidade à radioterapia. (HANSEN *et al.*, 1995; LIEBELT *et al.*, 2007).

O uso da HU no tratamento de doenças falciformes foi fundamentado, inicialmente, na sua capacidade em aumentar os níveis de hemoglobina fetal (HbF)⁷ em primatas não humanos (LETVIN *et al.*, 1984; LIEBELT *et al.*, 2007). A HbF inibe a polimerização da hemoglobina S anormal (HbS) dentro dos eritrócitos, resultando em manifestações clínicas mais moderadas da doença falciforme. A HbF interfere com a polimerização da HbS, tanto pela inibição do contato entre moléculas de HbS adjacentes, como pela formação de polímeros híbridos com HbS, que apresentam uma solubilidade maior do que os constituídos apenas por HbS. (YANG & PACE, 2001; HALSEY & ROBERTS, 2003).

O mecanismo exato pelo qual a HU aumenta os níveis de HbF ainda não está completamente elucidado. De acordo com HALSEY & ROBERTS (2003), a HU pode induzir a produção de HbF, atuando diretamente sobre células eritropoiéticas precursoras primitivas e estimulando a produção de HbF, ou indiretamente, matando rapidamente as células eritropoiéticas em divisão e levando ao recrutamento de células precursoras imaturas que mantiveram a capacidade de sintetizar HbF. Entretanto, alguns autores relataram mecanismos

⁶A RR é constituída por duas subunidades, R1 e R2. A subunidade R2 contém um radical livre tirosil, estabilizado por um centro de ferro (não-heme). Ambos, o ferro e o grupo tirosil, são essenciais para atividade catalítica enzimática. A inibição da RR pela HU parece decorrer da redução do radical tirosil (HANSEN *et al.*, 1995; TENÓRIO *et al.*, 2005).

⁷A HbF é composta por duas cadeias α e duas cadeias γ , e é a principal hemoglobina produzida pelo feto durante a segunda metade da gravidez. Todos os adultos produzem pequenas quantidades de HbF (menos de 1% da hemoglobina total). (LIEBELT *et al.*, 2007).

alternativos, através dos quais a HU exerce os seus efeitos benéficos, diminuindo a incidência e a severidade das crises vaso-oclusivas. Estes mecanismos envolvem:

- Redução da expressão de moléculas de adesão em eritrócitos falciformes, e diminuição das interações entre estas células e células endoteliais;
- Melhora das propriedades reológicas dos eritrócitos falciformes, obtida pelo aumento do grau de hidratação dessas células, pelo aumento do tamanho dos eritrócitos acompanhado de diminuição da densidade celular, e pela diminuição da contagem de neutrófilos, com conseqüente diminuição da liberação de mediadores pró-inflamatórios e diminuição da viscosidade do sangue;
- Aumento da eritropoietina;
- Aumento da produção de óxido nítrico (NO), resultando em indução da expressão do gene da γ -globina, em vasodilatação e em inibição da agregação plaquetária. (HALSEY & ROBERTS, 2003; LIEBELT *et al.*, 2007; NASCIMENTO-JÚNIOR & MELO, 2012).

1.7.1.2 – EFEITOS DO TRATAMENTO COM HU SOBRE A GESTAÇÃO HUMANA:

Algumas informações sobre a toxicidade do desenvolvimento da HU, obtidas de mulheres tratadas com este fármaco durante a gravidez, foram relatadas em uma revisão publicada por LIEBELT *et al.* 2007.

LIEBELT *et al.* (2007) listaram alguns estudos publicados, envolvendo o acompanhamento da gestação de mulheres doentes tratadas com HU. De acordo com esses autores, a maioria das complicações maternas envolviam nascimentos prematuros e infecções pós-parto, enquanto que para o feto, as complicações mais frequentes incluíam restrição do crescimento intrauterino e prematuridade. O Quadro I, apresentado a seguir, descreve alguns dos resultados compilados por LIEBELT *et al.* (2007), a partir de três estudos publicados por outros autores. O estudo 1 corresponde a um estudo prospectivo, envolvendo mulheres adultas apresentando doenças falciformes. O estudo 2 envolveu uma revisão retrospectiva de dados de obstetrícia, coletados durante 20 anos. O estudo 3 seguiu uma coorte de meninas, pacientes com hemoglobina S, desde o nascimento.

QUADRO I: Resultados de estudos relatando o acompanhamento da gestação de mulheres com doenças falciformes, tratadas com HU. (Adaptado de LIEBELT *et al.*, 2007)

DESFECHOS AVALIADOS	ESTUDO		
	Estudo 1	Estudo 2	Estudo 3
Nº de sujeitos	445 (72% SS; 17% SC; 11% TAL)	127 (54% SS; 46% SC)	94 gestações em 52 mulheres SS
Controles	Histórico	129 AA	157 gestações em 68 mulheres AA
Abortos eletivos	29%	-	11% SS; 8% AA
Abortos espontâneos	6,5%	7% SS; pacientes SC não foram avaliadas	36% SS *; 10% AA
Natimortos	0,7%	4% SS; 2% SC	7% SS *; 0,7% AA
Idade gestacional média (semanas)	37,5 SS; 38,6 SC	-	37,0 SS *; 38,7 AA
Prematuridade (< 37 semanas)	27% de SS; 17% de SC	45% de SS *; 22% de SC *	44% SS *; 15% AA
Peso médio ao nascer (g)	2630 g SS; 3016 g SC	-	2500 SS *; 3000 g AA
Baixo peso ao nascer (< 2500 g)	38% de SS; 17% de SC	46% de SS *; 17% de SC	42% SS *; 19% AA
Mortalidade materna	-	-	2% SS; 0% AA

Os estudos 1, 2 e 3 foram realizados por Smith *et al.*, 1996, Sun *et al.*, 2001 e Sorjeant *et al.*, 2004 (*apud* LIEBELT *et al.*, 2007).

*: Estatisticamente diferente dos controles.

AA: hemoglobina normal; SS: pacientes homocigotos para anemia falciforme; SC: pacientes com doença da hemoglobina SC; TAL: pacientes talassêmicas.

1.7.1.3 - EFEITOS DA HU SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIOFETAL DE ANIMAIS

A hidroxiureia (HU) é um teratôgeno conhecido, que provoca toxicidade do desenvolvimento em ratos, camundongos, coelhos, *hamsters* e macacos, sendo o aumento da taxa de reabsorção, considerado o seu efeito principal. Entretanto, vários outros efeitos embriotóxicos foram registrados. Por exemplo, o tratamento único de coelhas grávidas com HU, provoca deformações severas em seus filhotes, tanto craniofaciais, como no tronco e nos membros, bem como uma marcada redução do fluxo sanguíneo uterino-placentário (DESESSO, 1981; IARC, 2000).

Em ratos, a HU causa uma marcada redução do peso corporal e produz uma variedade de anomalias externas, esqueléticas e viscerais, na prole de mães tratadas. Dentre as malformações induzidas pela HU, destacam-se as craniofaciais (*e.g.* exencefalia, anoftalmia, fenda palatina, micrognatia, etc) nos membros (*e.g.* posição irregular das patas, ausência de dedo, etc) e na cauda (LIEBELT *et al.*, 2007). Além disso, a HU produz uma depressão importante nos pesos dos fetos e das placentas (BARR & BEAUDOIN, 1981). HU é neurotóxica para embriões de ratos e camundongos (WOO *et al.*, 2003; DOI, 2011).

1.7.1.4 – MECANISMOS DE AÇÃO EMBRIOTÓXICA DA HU

O mecanismo pelo qual a HU induz a embriotoxicidade ainda não foi totalmente elucidado. Alguns autores, através da realização de estudos relevantes, relataram possíveis mecanismos de ação embriotóxica da HU, que estão descritos a seguir.

Inicialmente, um conjunto de estudos *in vitro* e *in vivo* forneceu fortes evidências de que o bloqueio da atividade da enzima RR (ribonucleotídeo redutase), resultando na diminuição do *pool* de desoxirribonucleotídeos, e na inibição da síntese de *DNA* embrionário, desempenhava um papel crucial para indução da embriotoxicidade pela HU (HERKEN *et al.*, 1978; HANSEN *et al.*, 1995). SKOOG & NORDENSKJOLD, 1971, demonstraram que a adição de HU ao meio de cultivo de células de embriões de camundongo causava, quase que instantaneamente, perda do *pool* de trifosfato de desoxiguanosina (dGTP), redução do tamanho do *pool* das moléculas de trifosfato de desoxiadenosina (dATP), aumento dos *pools* de trifosfato de desoxicidina (dCTP) e trifosfato de desoximidina (dTTP), e diminuição do *turnover* de dTTP. Por outro lado, a remoção da HU do meio, resultava numa rápida normalização dos *pools* de trifosfato e numa restauração, mais gradual, da síntese de *DNA*.

Estes resultados mostraram que a inibição da síntese do *DNA* pela HU estava correlacionada com a diminuição dos *pools* de dGTP e dATP, e do *turnover* de dTTP, indicando que havia uma diminuição generalizada da formação de desoxirribonucleotídeos, presumivelmente devida à inibição da enzima RR. Alguns resultados de estudos *in vivo*, utilizando embriões de camundongos, foram consistentes com os dados obtidos *in vitro* por SKOOG & NORDENSKJOLD, 1971. Por exemplo, no estudo conduzido por CHAUBE & MURPHY, fêmeas grávidas de camundongos receberam, no dia 10 de gestação, 500 mg/kg de HU, ou 500 mg/kg de HU combinados com doses variadas de pirimidina (monofosfato de desoxicidina - dCMP). Três horas antes do tratamento, os animais receberam timidina tritiada, e uma hora depois, os embriões foram removidos. Foram feitas análises autorradiográficas dos embriões, para determinar os índices percentuais de necroses, necroses marcadas, mitoses, mitoses marcadas, e de células neuroepiteliais do cordão espinhal marcadas. A administração simultânea de dCMP causou uma diminuição da duração da inibição da síntese de *DNA* induzida pela HU, um aumento importante dos índices marcados, um encurtamento da duração da fase G₂ do ciclo das células neuroepiteliais, e uma inibição parcial dos efeitos citotóxicos da HU sobre as células neuroepiteliais. (CHAUBE & MURPHY, 1973). HERKEN *et al.*, 1978, realizaram um estudo em condições similares, porém, administrando às fêmeas grávidas somente HU ou HU + timidina tritiada (³H-Tdr), e removendo os embriões em tempos diferentes após os tratamentos. Estes autores observaram que, duas horas após a administração da HU, condensações na estrutura da cromatina eram detectadas em algumas células. Trinta minutos depois, os nucléolos tornavam-se menores e mais densos, o citoplasma mais contraído, e as organelas celulares mais próximas umas das outras. Três horas depois da aplicação da droga, as células entravam em colapso. A análise dos autorradiogramas mostrou que aproximadamente 98% das necroses contadas eram marcadas. Como ³H-Tdr é quase que exclusivamente incorporada durante a fase S, HERKEN e colaboradores postularam que a HU influenciava processos metabólicos que ocorriam somente durante a fase S, e concluíram que, em se tratando de etapas metabólicas fase S-específicas que eram influenciadas pela HU, eles estavam lidando, primariamente, com a síntese do *DNA*.

HANSEN *et al.*, 1995, realizaram um estudo *in vitro*, partindo da premissa de que várias enzimas eram capazes de metabolizar os desoxirribonucleotídeos. Portanto, não estava claro, para estes autores, se o dCMP (monofosfato de desoxicidina), ou algum outro metabólito era, de fato, o agente responsável pelo efeito protetor, observado *in vivo* por CHAUBE e MURPHY, em 1973. Utilizando sistema de cultura de embrião, os pesquisadores avaliaram os efeitos de precursores de *DNA*, monofosfato de desoxiadenosina (dAMP) e dCMP, sobre a embriotoxicidade induzida pela HU, na ausência de qualquer influência materna. Os autores

também investigaram se havia alguma diferença entre os efeitos da HU em embriões de ratos e de camundongos.

No estudo de HANSEN, culturas de embriões de rato e de camundongo foram previamente expostas à várias concentrações de HU, e posteriormente tratadas com concentrações não embriotóxicas de dCMP ou dAMP. Os embriões foram avaliados morfológicamente e os números de pares de somitos foram registrados. Foram obtidos extratos desses embriões, para posterior quantificação de proteínas e *DNA*. Além disso, os níveis de *pools* de nucleotídeos (CTP, dCTP, dUTP, GTP, dUMP, dTTP, ATP, dTMP, dATP) foram determinados. Os resultados desse estudo demonstraram que a HU produziu diminuições dose-dependentes para a maioria dos desfechos avaliados, tanto em ratos, como em camundongos. Como era de se esperar, para uma droga inibidora da síntese de *DNA*, o maior impacto do tratamento com HU ocorreu sobre o conteúdo de *DNA* de ambas as espécies, uma vez que diminuiu os *pools* de todos os nucleotídeos avaliados. Apesar da adição de dAMP a embriões de ratos pré-tratados com HU ter aumentado os níveis de todos os *pools*, os tratamentos com dAMP e dCMP não resultaram em melhoras significativas do crescimento/desenvolvimento para os embriões de nenhuma das espécies estudadas. Neste estudo, a embriotoxicidade induzida pela HU não foi atenuada com o aumento dos níveis de nucleotídeos, indicando que os efeitos adversos da HU não eram somente decorrentes dos efeitos sobre a síntese de *DNA*, e sugerindo que a HU deveria ter mecanismos de ação adicionais. (HANSEN *et al.*, 1995).

DESESSO (1981) e DESESSO & GOERINGER (1990 a e b), propuseram um mecanismo alternativo para a embriotoxicidade induzida pela HU. Estes autores verificaram que, algumas substâncias apresentando propriedades antioxidantes, quando administradas simultaneamente com a HU, retardavam o aparecimento de desfechos embriocitotóxicos, acarretando em uma melhora da teratogenicidade (*e.g.*, redução da frequência e da severidade de malformações específicas), observada a termo. Estes pesquisadores estudaram a ação dos antioxidantes propil-galato (PG), etoxiquina (ETX) e ácido nordihidroguaiarético (NDGA), sobre os efeitos embriotóxicos induzidos pela HU, em embriões provenientes de coelhas *New Zealand* grávidas, tratadas no dia 12 de gestação, e verificaram que: a) a administração do PG atrasava o início do processo de necrose de células embrionárias em até 6 horas, e a ocorrência de morte celular em até 8 horas; b) a ação protetora do PG resultava em reduções significativas nas taxas de reabsorção e nas frequências de malformações específicas, de maneira dose-relacionada; c) a interação paliativa entre HU e PG ocorria dentro dos embriões; d) os antioxidantes ETX ou NDGA atenuavam os efeitos embriotóxicos produzidos pela HU, bem como os efeitos fetotóxicos, manifestados pela redução do número de fetos malformados,

e pelo aumento do peso corporal dos mesmos. Estes autores sugeriram que a ação embriotóxica da HU ocorria, via produção de radicais livres, e que era atenuada pela co-administração de antioxidantes, *in vivo*. Neste caso, a HU reagia com oxigênio para produzir H₂O₂, gerando radicais livres de hidroxila que poderiam ser as espécies reativas intermediárias envolvidas na morte celular embrionária imediata e na teratogênese induzidas pela HU (DESESSO, 1981; DESESSO & GOERINGER, 1990 a, b; CHAHOUD *et al.*, 2002).

Além disso, experimentos *in vitro* também evidenciaram que a adição de vários antioxidantes (α -tocoferol, benzoato de sódio, ácido acetilsalicílico, catalase, peroxidase, superóxido-dismutase e vitamina E) à culturas de células L5178Y previamente expostas a HU, produziu um efeito protetor substancial contra os efeitos citotóxicos da HU, contudo, sem alterar a inibição da síntese do DNA. (PRZYBYSZWSKI & MALEC, 1982; PRZYBYSZWSKI *et al.*, 1987).

Outro possível mecanismo de indução de citotoxicidade pela HU foi proposto por SKOG *et al.*, 1992. Os autores demonstraram que o tratamento de células de linfoma humano com HU provocava uma diminuição drástica do crescimento celular, devido ao acúmulo de células no estágio inicial da fase S, acarretando em um desequilíbrio da razão DNA/proteína e dos *pools* de desoxirribonucleotídeos (dNTP). Neste estudo, a HU não aumentou a frequência de quebras simples no DNA, nem alterou a viabilidade celular. Entretanto, a remoção da droga, apesar de ter normalizado os conteúdos de proteína e DNA, bem como os *pools* de dNTP, causou uma perda celular de 10-15%, que foi paralela a um aumento de quebras simples no DNA e à uma rápida progressão das células em fase S, para fase G₂. Estes resultados mostraram que as alterações pronunciadas do índice DNA/proteína e dos *pools* de dNTP não eram diretamente letais, mas, quando combinadas com uma alta taxa de síntese de DNA replicativo, como a observada após a remoção da HU, levavam a um aumento da morte celular. Neste caso, os efeitos citotóxicos da HU não foram decorrentes da inibição da síntese do DNA, e sim, de danos subletais ao DNA, ao desequilíbrio da taxa DNA/proteína (refletindo crescimento desequilibrado), e ao aumento da velocidade da síntese de DNA replicativo. (SKOG *et al.*, 1992; HANSEN *et al.*, 1995).

WOO *et al.*, 2003, avaliaram os efeitos da administração intraperitoneal de 400 mg/kg a fêmeas de camundongos grávidas (dia 13 de gestação) sobre vários tecidos fetais, e, constataram que, após o tratamento com HU, houve um aumento do número de corpos picnóticos em células do Sistema Nervoso Central, pulmões, tecido mesenquimal craniofacial, brotos de membros, etc. Estes autores sugeriram que a fetotoxicidade da HU é caracterizada por um excesso de morte celular por apoptose, e que este excesso deve estar relacionado com a ocorrência de anomalias fetais (morfológicas e funcionais), descritas na literatura para estes

tecidos. De acordo com WOO, a apoptose induzida pela HU em células progenitoras neurais provavelmente é mediada pela proteína p53, e ocorre através de ambas as vias, intrínseca e extrínseca. (WOO *et al.*, 2006; DOI, 2011).

1.7.1.5 – FARMACOCINÉTICA DA HU EM ANIMAIS

Há relativamente poucos estudos sobre a cinética da HU em animais, apesar deste fármaco ser um clássico agente teratogênico, amplamente utilizado na teratologia experimental, particularmente em estudos *in vivo* (IARC, 2000). Em ratos, após a administração de HU (100 mg/kg) por via intraperitoneal, as maiores concentrações do fármaco foram encontradas no fígado, rins e intestino, e a excreção ocorreu predominantemente por via renal (LIEBELT *et al.*, 2007).

Em ratas grávidas tratadas com 100, 137 ou 175 mg/kg/dia *ip*, nos dias 9 a 12 de gestação (DG 9-12) a HU foi rapidamente eliminada do organismo materno e, de forma mais lenta, dos embriões. As concentrações de HU nos embriões excederam as concentrações registradas no sangue materno, 1 hora após o tratamento com 100 mg/kg, e a partir de 2 horas depois do tratamento com 137 e 175 mg/kg/dia. Enquanto a meia vida de eliminação da HU do plasma materno foi 15 minutos, nos embriões a meia-vida de eliminação foi calculada em 60 e 85 minutos, após serem alcançadas as concentrações estado-estacionário (steady-state) correspondentes às doses de 100 e 137 mg/kg/dia, respectivamente (WILSON *et al.*, 1975; LIEBELT *et al.*, 2007). HU inibiu a síntese de DNA de embriões de rato 3-5 horas após a administração retornando esta níveis normais 11 horas após o tratamento das mães (BARR & BEAUDOIN, 1981).

Em síntese, a meia-vida de eliminação da HU em ratas grávidas ou não grávidas foi estimada em 11 a 30 minutos (LIEBELT *et al.*, 2007). O *clearance* materno da HU é rápido e a transferência do fármaco de um dia para o outro é mínima nos embriões. Porém, o tratamento com uma única administração de HU no dia DG9 é suficiente para causar danos ao embrião (BELILES *et al.*, 1991), sendo a concentração de 10^{-4} M, a menor concentração de HU que foi capaz de inibir a síntese de DNA no tecido embrionário (WILSON *et al.*, 1975).

1.7.1.6 – EFEITOS DA HU SOBRE A PLACENTA

A HU, além de exercer seus efeitos embriotóxicos e teratogênicos diretos na prole de fêmeas grávidas expostas, também age adversamente sobre as placentas, comprometendo o desenvolvimento embrionário. Os efeitos da HU sobre a decídua, matriz para o desenvolvimento da placenta definitiva, e parte integrante da mesma (interface materna), foram evidenciados por um estudo realizado por SPENCER *et al.*, 2000, relatado a seguir.

SPENCER e colaboradores (2000) avaliaram os efeitos da HU sobre o decíduoma de ratas pseudográvidas, e sobre a placenta e o desenvolvimento de fetos oriundos de ratas grávidas. Decíduoma de mamíferos é um tecido uterino em proliferação semelhante à decídua, porém induzido artificialmente em ratas pseudográvidas. O desenvolvimento da decídua verdadeira é induzido pela implantação do blastocisto, durante a gestação. Este estudo utilizou decíduoma de ratas pseudográvidas (sem feto) para esclarecer respostas celulares a HU. A pseudogravidez foi induzida por estimulação mecânica vaginal, e o dia 1 PPG (PPG1) foi considerado o primeiro dia em que o infiltrado de leucócitos no esfregaço vaginal foi detectado após a estimulação. A decidualização foi artificialmente induzida via laparotomia, por trauma bilateral uterino aplicado ao epitélio da região antimesometrial, no PPG4. Nas ratas grávidas, o primeiro dia em que infiltrado de leucócitos apareceu no esfregaço vaginal, foi considerado DG1. A HU foi injetada via *sc* (500 mg/kg) nas ratas pseudográvidas, nos PPGs de 5 a 8, e a retirada do útero e do sangue foram realizadas no PPG9, para obtenção do tecido endometrial das regiões antimesometrial e mesometrial, e para avaliações bioquímicas e hormonais, respectivamente; as ratas grávidas receberam HU por via *i.p.*, DGs 5-8, e sacrificadas no DG16 para avaliação do processo de desenvolvimento.

As avaliações bioquímicas e moleculares realizadas no decíduoma revelaram que a HU não alterou os níveis ou as funções dos hormônios esteroides (progesterona e estrogênio), mas inibiu marcadamente, o peso endometrial, bem como os conteúdos proteicos e de DNA, e modificou as atividades de algumas enzimas, como metaloproteinases da matriz extracelular. Nas fêmeas grávidas, uma única dose de HU (500 mg/kg) atuou como um agente anti-placentário, tendo diminuído o peso das placentas. Além disso, o tratamento aumentou drasticamente as taxas de reabsorção fetais e de perdas pós-implantação, e causou redução do peso fetal e das ninhadas. Este estudo indicou que, independentemente da rota de administração, uma única dose de HU foi capaz de interferir com as atividades proliferativas das células endometriais, perturbando a mitogênese e a diferenciação do endométrio, sem o envolvimento de hormônios esteroides ou de seus receptores. (SPENCER *et al.*, 2000).

1.7.2 - 6-MERCAPTOPURINA (6-MP)

1.7.2.1 - EXPOSIÇÃO HUMANA

A 6-mercaptopurina (6-MP) é uma das principais drogas usadas na terapia da leucemia linfoblástica aguda. É também indicada para o tratamento de doenças reumatológicas e autoimunes (como imunomodulador/imunossupressor), bem como para o tratamento de colites ulcerativas e doenças intestinais inflamatórias, como a doença de Crohn. É uma pró-droga inativa que requer absorção intestinal, absorção celular e anabolismo intracelular para exercer sua atividade citotóxica (PENNINGTON & BRONK, 1995; CEGIELA *et al.*, 2005; PREFONTAINE *et al.*, 2010).

Geralmente as células tumorais apresentam um metabolismo acelerado, quando comparadas aos seus pares fisiológicos, com relação à taxa de crescimento e à proliferação celular. De uma maneira geral, as rotas anabólicas estão aumentadas nestas células, enquanto as rotas catabólicas são menos ativas. Este desequilíbrio aumenta com o estado de malignidade das células tumorais, e pode ser usado como ferramenta para terapia do câncer. Os antimetabólitos de purinas, como a 6-MP, e de pirimidinas, são de grande interesse, uma vez que eles podem ser incorporados ao *DNA* e *RNA* de células tumorais, e, conseqüentemente, inibir a síntese destes polinucleotídeos (ABREU *et al.*, 1995; http://www.druglib.com/druginfo/imuran/description_pharmacology).

Após a sua absorção, a 6-MP é extensamente metabolizada no fígado e na mucosa intestinal, onde é convertida em dois metabólitos inativos. A inativação da 6-MP ocorre através de duas vias metabólicas: 1^a) Hidroxilação pela xantina oxidase (XO), gerando ácido 6-tioúrico (6-TU); 2^a) Metilação do tiol, catalisada pela tiopurina S-metiltransferase (TPMT)⁸, formando o metabólito inativo metil-6-mercaptopurina (6-MeMP). A etapa metabólica seguinte, a ativação, ocorre intracelularmente. (INNOCENTI *et al.*, 1999; PETIT *et al.*, 2008).

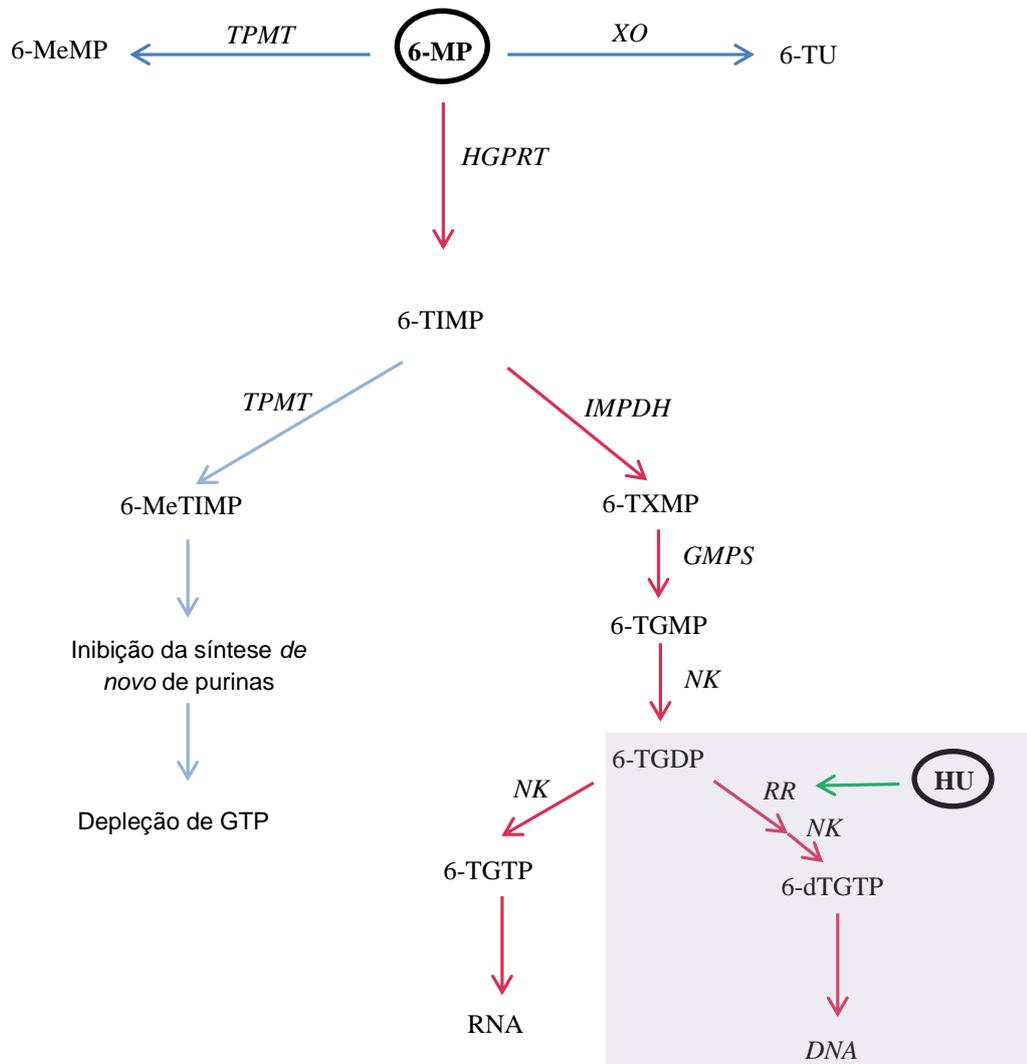
As etapas de inativação e ativação da 6-MP estão esquematizadas na Fig. 1.6.

A ativação da 6-MP ocorre por via da enzima hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase (*HGPRT*) através de uma série de processos multienzimáticos

⁸A atividade da TPMT é controlada por polimorfismo genético. 10% da população de caucasianos e afro-americanos apresenta um alelo TPMT não funcional (heterozigotos), o que confere uma atividade enzimática intermediária à esta enzima; 0,3% apresentam alelos não funcionais (homozigotos), implicando em pouca ou nenhuma atividade. A atividade da TPMT está inversamente relacionada aos níveis de 6-TGNs nos eritrócitos e, possivelmente, em outros tecidos hematopoiéticos, uma vez que estas células apresentam atividades insignificantes de XO (envolvida na outra via de inativação). Nestes casos, a via TPMT torna-se a única possibilidade de inativação. (FAKHOURY *et al.*, 2010; http://www.druglib.com/druginfo/imuran/description_pharmacology).

envolvendo cinases, que vão originar os 6-TGNs, como metabólito principal. Inicialmente, a 6-MP é convertida, pela *HGPRT*, em monofosfato de 6-tioinosina (6-TIMP), e, em seguida, em monofosfato de 6-tioxantosina (6-TXMP) e monofosfato de 6-tioguanosina (6-TGMP), pelas ações das enzimas IMP desidrogenase (IMPDH) e GMP sintetase (GMPS), respectivamente. Subsequentemente, 6-TGMP, através de etapas consecutivas, é convertida a difosfato de 6-tioguanosina (6-TGDP), trifosfato de 6-tioguanosina (6-TGTP) e trifosfato de 6-desoxitioguanosina (6-dTGTP). Estes últimos são posteriormente incorporados ao RNA (6-TGTP) ou ao DNA (6-dTGTP). (INNOCENTI *et al.*, 1999; PETIT *et al.*, 2008; DE BEAUMAIS *et al.*, 2010). As etapas de ativação da 6-MP estão esquematizadas na Figura 1.6.

O produto da ativação da 6-MP, 6-TIMP, também pode sofrer metilação, pela ação TMTP, formando metil-6-tiomercaptopurina (6-MeTIMP), um potente inibidor da PRPP amidotransferase. A PRPP amidotransferase é a segunda enzima que participa da síntese *de novo* de purinas, e catalisa a conversão de PRPP (fosforribosil-pirofosfato) em PRA (5-fosforribosilamina), resultando em um acúmulo de PRPP e depleção de nucleotídeos endógenos. A depleção de nucleotídeos púricos causa a diminuição da síntese de DNA e RNA. Como o PRPP funciona como co-substrato para conversão intracelular da 6-MP em 6-TIMP, a sua acumulação induz o aumento do anabolismo da 6-MP, o que também contribui para citotoxicidade. (NELSON *et al.*, 1975; ABREU *et al.*, 1995; PETIT *et al.*, 2008).



(Adaptado de INNOCENTI *et al.*, 1999 e PETIT *et al.*, 2008)

Fig. 1.6: Esquema do metabolismo da 6-mercaptopurina (6-MP) e sítio de ação da hidroxiureia (HU).

- As setas azuis indicam as duas vias de inativação da 6-MP, que geram metabólitos inativos: 1ª) Metilação do tiol catalisada pela enzima TPMT (tiopurina S-metiltransferase), formando o metabólito inativo metil-6-MP (6-MeMP); 2ª) Hidroxilação pela XO (xantina oxidase), originando 6-TU (ácido 6-tioúrico).

- As setas vermelhas representam as etapas metabólicas da via de ativação da 6-MP, que inclui: Nucleotídeos tiopurínicos: 6-TIMP (monofosfato de 6-tioinosina); 6-TDP (difosfato de 6-tioinosina); 6-TITP (trifosfato de 6-tioinosina); 6-TXMP (monofosfato de 6-tioxantosina); 6-TGMP (monofosfato de 6-tioguanosina); 6-TGDP (difosfato de 6-tioguanosina); 6-TGTP (trifosfato de 6-tioguanosina); 6-dTGTP (trifosfato de 6-desoxitioguanosina); Enzimas: HGPRT (hipoxantina guanina fosforribosil transferase); IMPDH (inosina monofosfato desidrogenase); GMPS (guanosina monofosfato sintetase); NK (nucleotídeo quinase); RR (ribonucleotídeo redutase).

As setas azuis claras indicam que o primeiro produto da via HGPRT, o 6-TIMP, pode ser metilado, originando a 6-MeTIMP (monofosfato de metil-6-tioinosina), que também exerce efeito antimetabólico, inibindo a síntese de novas purinas, e depletando nucleotídeos endógenos (GTP).

- O destaque em fundo lilás mostra o sítio de ação da HU, a enzima RR (seta verde).

A enzima PRPP amidotransferase também regula uma das etapas da biossíntese de pirimidinas, e, assim sendo, o bloqueio de sua atividade implica no aumento do *pool* de bases pirimídicas. O aumento da quantidade de nucleotídeos pirimídicos combinado à diminuição do *pool* de nucleotídeos púricos provoca um desequilíbrio no crescimento celular, o que também contribui para ocorrência de morte celular. (ABREU *et al.*, 1995; DING *et al.*, 2011).

É geralmente aceito, que a incorporação de nucleotídeos de 6-tioguanina (6-dTGNs) ao DNA de células tumorais, levando à indução de danos, tais como quebras simples e duplas, ligações cruzadas DNA-proteína, ligações cruzadas entre as cadeias de DNA e troca de cromátides irmãs, seja a causa mais importante da citotoxicidade induzida pela 6-MP. Entretanto, como já mencionado, a 6-MP pode provocar citotoxicidade através de outros mecanismos, incluindo o bloqueio da transcrição, quando os TGNs são incorporados ao RNA, e, conseqüentemente, da síntese de proteínas. (ABREU *et al.*, 1995; PETIT *et al.*, 2008; FAKHOURY *et al.*, 2010).

Além dos efeitos citotóxicos resultantes de mecanismos de ação inespecíficos (bloqueio da replicação do DNA e da transcrição de RNA), alguns resultados da literatura sugeriram que os efeitos imunossupressores das tiopurinas são mediados pela ligação do trifosfato de tioguanina à proteína Rac-1, no lugar do trifosfato de guanina. Esta ligação poderia resultar na supressão da ativação de Rac-1, *i.e.*, no bloqueio de sua sinalização, e na indução de apoptose (TIEDE *et al.*, 2003). Outros resultados demonstraram que as tiopurinas inibem seletivamente a expressão de genes inflamatórios em linfócitos T ativados (THOMAS *et al.*, 2005).

1.7.2.2 – EFEITOS DO TRATAMENTO COM 6-MP E AZATIOPRINA SOBRE A GESTAÇÃO HUMANA:

A azatioprina (AZA) é um fármaco empregado no tratamento de doenças autoimunes, e também utilizado em regimes de imunossupressão preventivos de rejeição de transplantes. Em sendo um precursor da 6-MP, AZA também origina metabólitos análogos da purina que interferem na síntese de ribonucleosídeos de adenina e guanina (Figura 1.6).

Na maioria dos estudos *in vivo*, a 6-MP e AZA foram administradas por via parenteral. Ambos os fármacos, quando injetados em fêmeas grávidas pertencentes à várias espécies de animais de laboratório, em doses similares ou maiores do que as doses terapêuticas utilizadas em humanos, foram claramente teratogênicos para os embriões. Pacientes humanos, por outro lado, geralmente usam AZA ou 6-MP por via oral, o que reduz consideravelmente a sua

biodisponibilidade, uma vez que grande parte da droga administrada é metabolizada a ácido tiourico (pela enzima xantina oxidase presente no fígado e no intestino), que é excretado pela urina (Figura 1.6). AZA e 6-MP atravessam a placenta humana, podendo ser detectadas nos fluidos amniótico e fetal. (POLIFKA & FRIEDMAN, 2002).

Os efeitos teratogênicos da AZA e da 6-MP em humanos foram revisados por POLIFKA & FRIEDMAN (2002). De acordo com esses autores, o contingente de dados sobre a teratogenicidade desses agentes é bastante limitado. Os dados existentes, sobre defeitos congênitos observados em filhos de mulheres tratadas com AZA e 6-MP durante a gravidez (mulheres submetidas ao tratamento anticâncer ou de imunopatias severas; receptoras de órgãos transplantados), foram descritos por diversos autores em um grande número de séries clínicas e relatos de casos individuais. Estas informações foram compiladas e listadas por POLIFKA & FRIEDMAN (2002), e encontram-se resumidas no Quadro II, e nos Anexos de 3 a 5.

Nesta revisão, POLIFKA & FRIEDMAN (2002) também ressaltaram que, a ausência de dados provenientes de estudos epidemiológicos bem conduzidos e controlados, aliada ao fato de que, tanto AZA como 6-MP, são geralmente usadas em conjunto com outros medicamentos, torna difícil determinar, se o risco de defeitos congênitos é realmente maior entre crianças cujas mães foram tratadas com AZA ou 6-MP durante a gravidez, em relação à população geral.

Ainda dentro deste contexto, cabe também a ponderação de que, o tratamento de mulheres cronicamente doentes com AZA e 6-MP (pró-drogas potencialmente teratogênicas), permite também que estas mulheres tenham filhos normais, como ilustrado nos Anexos 3-5.

QUADRO II: Anomalias congênitas observadas entre filhos de mulheres tratadas com AZA e 6-MP durante a gravidez, listadas por POLIFKA & FRIEDMAN, 2002.

ANOMALIA	Nº DE CRIANÇAS AFETADAS NASCIDAS DE MÃES TRATADAS	
	AZA	6-MP
Hidrocefalia	1	0
Anencefalia	1	0
Plagiocefalia com dano neurológico	1	0
Hemangioma frontal	1	0
Comprometimento do desenvolvimento psicomotor	2	0
Fechamento prematuro das fontanelas	1	0
Fenda palatina	1	1
Duto arterial patente	1	0
Regurgitação mitral	1	0
Defeito cardiovascular	1	0
Defeito do septo atrial	2	0
Ventrículo direito com dupla saída	1	0
Estenose arterial pulmonar periférica	1	0
Anomalia da válvula aórtica e defeito do septo ventricular	1	0
Deformidade da mão esquerda	1	0
Hipoplasia na perna esquerda	1	0
Hiperflexão do 5º dedo, e grande deformidade da unha do pé	1	0
Polidactilia	2	1
Hérnia do diafragma	2	0
Hérnia inguinal bilateral	1	0
Hérnia umbilical	2	0
Testículo não descendente	1	0
Hipospádia	3	0
Pés tortos equinovaros	2	0
Microcefalia	1	1
Anomalias faciais	1	0
Micropênis	1	0
Focomelia	0	1
Microftalmia	0	1
Malformações severas incompatíveis com a sobrevivência	1	0

Algumas crianças apresentavam uma ou mais anomalias.

1.7.2.3 - EFEITOS DA 6-MP SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIOFETAL DE ANIMAIS

Em animais experimentais, a 6-MP induz citotoxicidade e fetotoxicidade, envolvendo redução do tamanho da placenta, reabsorção fetal, retardo do crescimento intrauterino e aparecimento de uma variedade de defeitos externos, esqueléticos e teciduais, incluindo malformações no cérebro e sistema nervoso (neurotoxicidade) da prole exposta. (PLATZEK *et al.*, 1994; PLATZEK & SCHWABE, 1999; FURUKAWA *et al.*, 2008; CHAHOUD & PAUMGARTEN, 2009; KANEMITSU *et al.*, 2009; FAKHOURY *et al.* 2010; PREFONTAINE *et al.*, 2010; FURUKAWA *et al.*, 2011).

O efeito citotóxico e teratogênico da 6-MP está associado ao seu mecanismo de ação antineoplásica, *i.e.*, à incorporação de 6-tioguanina ao dos embriões, como falso análogo da guanina. (PLATZEK *et al.*, 1994; PLATZEK & SCHWABE, 1999; KANEMITSU *et al.*, 2009).

1.7.2.4 – MECANISMOS DE AÇÃO EMBRIOCITOTÓXICA DA 6-MP

O principal mecanismo de ação embriotoxic/teratogênica da 6-MP é a sua ação citotóxica, que está associada ao seu mecanismo de ação antineoplásica, *i.e.*, inibição da síntese de DNA devido à incorporação de 6-tioguanina ao dos embriões, como falso análogo da guanina. (PLATZEK *et al.*, 1994; PLATZEK & SCHWABE, 1999; KANEMITSU *et al.*, 2009). Entretanto, um segundo mecanismo de ação teratogênica da 6-MP, envolvendo o metabolismo materno de zinco foi também proposto (POLIFKA & FRIEDMAN, 2002).

Muitos estudos demonstraram que a incorporação de 6-MP aos ácidos nucleicos de células de mamíferos, é o seu principal mecanismo de citotoxicidade. Neste caso, o efeito citotóxico e teratogênico da 6-MP está associado ao seu mecanismo de ação antineoplásica, *i.e.*, à incorporação de 6-tioguanina ao dos embriões, como falso análogo da guanina. No caso da 6-MP, foi especulado que a teratogenicidade em roedores está correlacionada à incorporação da 6-tioguanina ao DNA dos embriões. (PLATZEK *et al.*, 1994; PLATZEK & SCHWABE, 1999; KANEMITSU *et al.*, 2009).

PLATZEK e colaboradores, por exemplo, encontraram uma correlação entre incorporação de marcado 6-MP-ribosídeo marcado com ³⁵S (metabólito ativo da 6-MP) em DNA embrionário, e o aumento da frequência de alterações esqueléticas na prole de fêmeas grávidas de camundongos, tratadas no DG11. Esta observação é consistente com a hipótese de

que a embriotoxicidade da 6-MPr é devido à sua incorporação, provavelmente como 6-tioguanina, ao DNA dos embrionário. (PLATZEK *et al.*, 1994).

Bragonier e Carver (*apud* POLIFKA & FRIEDMAN, 2002) administraram 6-MP por via ip, em ratas grávidas, no DG12. A síntese de purinas placentária foi diminuída 6 horas depois do tratamento, e o conteúdo de *DNA* fetal foi reduzido 48 horas após o tratamento. Foram observados defeitos esqueléticos fetais em fetos de 20 dias de idade, após o tratamento.

KANEMITSU e colaboradores demonstraram o mecanismo de ação neurotóxica da 6-MP em roedores, através de três estudos relacionados entre si. No primeiro estudo, os autores acompanharam as alterações morfológicas ocorridas em células progenitoras neurais do cérebro de embriões de ratos, coletados de 12 a 96 horas após o tratamento materno com 6-MP (no dia 13 de gestação). A avaliação microscópica revelou a presença de características apoptóticas nestas células, que, além disso, responderam positivamente para fragmentação de *DNA* e para presença de caspase 3. Os resultados sugeriram que a 6-MP induzia morte celular apoptótica das células neurais do cérebro fetal de ratos, provavelmente devido à sua ação citotóxica. Um segundo estudo foi conduzido, para esclarecer o mecanismo pelo qual a 6-MP induzia a interrupção do ciclo celular e a apoptose. Neste caso, telencéfalos fetais foram examinados, no período de 12 a 72 horas após o tratamento. A análise por citometria de fluxo revelou, o acúmulo de células apoptóticas nas fases G2/M, S e sub-G1, o aumento dos níveis da proteína p21 e de seu respectivo m-RNA, uma diminuição dos níveis de Cdc25A (ciclina necessária para progressão da fase S), e um aumento dos níveis de cdc2 fosforilada (forma inativa da cdc2, necessária para passagem G2/M), a partir de 24 horas. Os resultados sugeriram que a 6-MP induzia a interrupção na fase G2/M, atrasava a progressão da fase S, e induzia apoptose, mediada pela p53. No terceiro trabalho, os autores verificaram qual das duas vias (intrínseca ou extrínseca) estava envolvida na apoptose telencefálica observada, e constataram que este processo ocorria através da indução da via intrínseca mitocondrial. O conjunto desses três estudos revelou que a 6-MP induz apoptose em células neurais de roedores (ratos e camundongos), mediada pela p53, através da via intrínseca. (KANEMITSU *et al.*, 2009 a,b,c).

O zinco é essencial para muitos sistemas enzimáticos implicados na síntese de *DNA* e *RNA*, bem como na divisão e a proliferação celular. Em ratos, a deficiência materna de zinco pode produzir anomalias fetais. Alguns estudos demonstraram que a 6-MP é capaz de alterar o metabolismo de zinco e de outros minerais em ratas grávidas Assim sendo, tem sido proposto que o efeito teratogênico de 6-MP poderia também ser mediado, pela deficiência de zinco embrionário. (TAUBENECK *et al.*, 1994; POLIFKA & FRIEDMAN, 2002).

ANEMIYA e colaboradores relataram os efeitos da 6-MP sobre o metabolismo do zinco, ratas *Sprague-Dawley* grávidas. Em um desses estudos, grupos de ratas grávidas receberam dieta suplementada com diferentes quantidades de zinco (4,5, 100, ou 1000 µg/1g de alimento). Todos os grupos foram tratados com 6-MP (27,5 mg/kg), por via *i.p.*, no DG11. Foi observado que, a dieta suplementada com Zn-1000 µg protegeu os fetos dos efeitos deletérios induzidos pela 6-MP, o que não ocorreu com dietas suplementadas com as menores quantidades. (ANEMIYA *et al.*, 1986). No segundo estudo, os autores descreveram a distribuição de ⁶⁵Zn (administrado por gavagem) no organismo de ratas grávidas, 24 horas após uma injeção de 6-MP (DG13). Os níveis de Zn das placentas e dos embriões também foram determinados (DG21). O tratamento com 6-MP causou uma retenção de ⁶⁵Zn no fígado materno, acompanhada por uma diminuição dos níveis plasmáticos e uterinos, além de ter reduzido os níveis medidos na placenta e nos embriões, em relação aos controles (não tratados). Além disso, análises cromatográficas revelaram que o zinco retido no fígado de fêmeas tratadas estava associado à uma proteína de ligação, a metalotioneína, o que não foi detectado nos animais controles. Os resultados desse estudo indicaram que a deficiência de Zn observada nos embriões era decorrente da indução, pela 6-MP, do sequestro de zinco no fígado materno, seguido pela diminuição dos seus níveis plasmáticos, e pela subsequente redução de sua captação pelo feto. Os autores desse estudo sugeriram que a 6-MP induzia a síntese de metalotioneína. (ANEMIYA *et al.*, 1989). Globalmente, estes dois estudos indicaram que a teratogenicidade da 6-MP seria devida, em parte, pelas alterações no metabolismo do zinco, por ela induzidas.

1.7.2.5 – EFEITOS DA 6-MP SOBRE A PLACENTA:

Na literatura, foram encontrados alguns trabalhos importantes, demonstrando alguns efeitos adversos da 6-MP sobre a placenta, descritos, sumariamente, a seguir.

FURUKAWA *et al.*, (2008) investigaram os efeitos tóxicos da 6-MP sobre o desenvolvimento da placenta, através da avaliação de alterações morfológicas neste órgão. Neste estudo, ratas grávidas foram tratadas, por via intraperitoneal, com 6-MP (60 mg/kg), nos DG 11 a 12. As placentas foram coletadas e nos dias 13, 15 e 21. Os resultados deste estudo indicaram, que o tratamento com 6-MP: a) suprimiu o ganho de peso materno (DG 12-21); b) aumentou a taxa de mortalidade embrionária/fetal (DG21); c) diminuiu o peso dos embriões/fetos (DG 13, 15 e 21); d) induziu o aparecimento de malformações externas no DG21 (micrognatia, hérnia umbilical/onfalocele, atresia anal, focomelia, anomalias digitais,

defeitos na cauda e pina ectópica; e) induziu a ocorrência de placenta pequena. A 6-MP evocou a diminuição da espessura da zona labiríntica, com aumento de células apoptóticas e diminuição de células em mitose; na zona basal, houve diminuição da espessura, com citólise de células glicogênicas e aumento do número de células compostas (espongiotrofoblastos, células glicogênicas e células gigantes). Concluindo, a administração de 6-MP a ratas grávidas provocou a interrupção do crescimento da zona labiríntica e o atraso do desenvolvimento da zona basal, ocasionando placentas pequenas. Estes autores sugeriram que a fetotoxicidade provocada pela 6-MP poderia ser responsável pelos efeitos antiproliferativos diretos, resultando em disfunção placentária (FURUKAWA *et al.*, 2008).

Para investigar o efeito do tamanho da placenta sobre o retardo do crescimento fetal intrauterino, FURUKAWA *et al.* (2011 a) avaliaram as alterações morfológicas, bem como a expressão de um transportador de glicose (GLUT3), nas placentas de ratas tratadas com 6-MP (via oral), nas doses de 0 e 60 mg/kg/dia, nos DGs 9, 11, 13 ou 15 de gestação. As placentas foram coletadas nos dias 17 e 21. Os principais achados patológicos em todos os grupos tratados foram: reabsorção fetal; retardo do crescimento intrauterino, com ou sem o aparecimento de malformações fetais; placenta pequena, decorrente da inibição da mitose e da indução de apoptose das células trofoblásticas da zona labiríntica. Os embriões de ratas expostas no dia 9 foram mais sensíveis à mortalidade induzida pela 6-MP, e os de ratas tratadas no dia 11, foram mais sujeitos à indução de malformações fetais. As menores placentas também foram registradas no DG11. A expressão de GLUT3 estava aumentada no septo trofoblástico, em todos os grupos tratados (DG11), e foi particularmente marcada, em ninhadas apresentando aumento da relação peso fetal/peso placentário. Embora as respostas mais significativas de placenta pequena e anomalias fetais terem ocorrido quando o tratamento foi feito no DG11, as ninhadas de 25% das mães não mostraram toxicidade fetal, apesar da redução do tamanho da placenta e do aumento da taxa peso fetal/peso placentário. De acordo com a interpretação de FURUKAWA *et al.* (2011 b), a expressão aumentada de GLUT3 pode refletir uma tentativa em aumentar o transporte de glicose materno-fetal, para compensar a deterioração da função placentária, observada nos grupos expostos a 6-MP apresentando placenta pequena, contribuindo para o crescimento e o desenvolvimento fetal normal. Sendo assim, o crescimento fetal normal pode ser mantido, como resultado de um aumento na expressão do transportador de glicose, como uma mudança adaptativa, mesmo quando o peso da placenta diminui em ratos expostos a 6-MP. (FURUKAWA *et al.*, 2011 a,b).

Em outro estudo, TAKI e colaboradores (2012) inicialmente investigaram a toxicidade da 6-MP sobre a placenta e sobre o desenvolvimento embrionário, e depois, verificaram se a condição isquêmica poderia representar um possível mecanismo de toxicidade. Neste estudo,

a 6-MP foi administrada a ratas grávidas, nas doses de 0 e 60 mg/kg, por via ip, nos DGs 11 e 12. Os embriões, as placentas, e amostras de plasma, foram coletados nos DGs 13 e 15. No grupo tratado com 6-MP, houve um aumento de reabsorções. No DG15, o tratamento com 6-MP provocou redução dos pesos placentários e do tamanho dos embriões, e a ocorrência de embriões com defeitos nos membros e na cauda. As avaliações morfológicas da placenta mostraram: uma zona labiríntica mais estreita, com uma menor quantidade de células, e com um aumento de células positivas para caspase-3; uma zona basal mais estreita, apresentando células glicogênicas lisadas (citólise). O tratamento com 6-MP também aumentou o número de células espongiotrofoblásticas e de células trofoblásticas gigantes. O tratamento com 6-MP resultou em aumento da expressão do gene *Xdh* (codifica xantina oxidase) na placenta. Este gene está relacionado à condição isquêmica de tecidos. Os dados sugeriram que apoptose nas células labirínticas pode levar à redução das trocas materno-fetais. Além disso, isquemia subsequente do tecido placentário pode ocorrer, induzindo a expressão de *Xdh*. (TAKI *et al.*, 2012).

1.7.3 - ADMINISTRAÇÃO COMBINADA DE HIDROXIUREIA (HU) E 6-MERCAPTOPURINA (6-MP)

A interação da HU com a 6-MP foi abordada por dois trabalhos publicados em 1999. O primeiro estudo investigou a interação farmacocinética após a administração concomitante e repetida de HU+6-MP a ratos (INNOCENTI *et al.*, 1999) e o segundo comparou os efeitos da administração combinada (concomitante e seqüencial) com aqueles resultantes da administração de apenas um dos dois fármacos a camundongos (PLATZEK & SCHWABE, 1999).

INNOCENTI *et al.*, 1999 investigaram o metabolismo da 6-MP nos eritrócitos e tecidos de ratos, após administração concomitante e repetida de HU e 6-MP. Ratas Wistar adultas foram tratadas por via intraperitoneal com 6-MP (12,5 e 25 mg/kg/dia) durante 12 dias. Os níveis de 6-MP-nucleotídeos (6-MPN) e os de 6-TGN nos eritrócitos, fígados e rins foram determinados (por HPLC) durante e 50 dias após o tratamento. No grupo de ratas que recebeu concomitantemente os dois fármacos, a dose de HU administrada foi 200 mg/kg/dia, injetada também por via ip. Os resultados indicaram que a concentração máxima (C_{max}) e a área sob a curva (AUC) da 6-TGN e 6-MPN nos eritrócitos e nos tecidos aumentaram de forma dose-relacionada após a administração de 6-MP. Os níveis de 6-TGN (6-tioguanina nucleotídeos) nos eritrócitos foram comparativamente maiores do que os de 6-MPN (6-mercaptopurina nucleotídeos) após tratamento com 25 mg/kg de 6-MP. A administração concomitante de HU, um inibidor da ribonucleotídeo redutase (e portanto da conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos), aumentou a produção e a acumulação de 6-MPN e 6-TGN nos eritrócitos e nos tecidos. Esses resultados indicaram que a 6-MP é bem absorvida por via parenteral (ip) e é convertida em nucleotídeos tiopurina nos eritrócitos, e células hepáticas e renais; e também que níveis detectáveis (HPLC) de 6-MPN e 6-TGN são alcançados 24 horas após a primeira dose. Em síntese, a absorção celular da 6-MP, e a subsequente conversão desta em metabólitos (ribonucleotídeos) é rápida.

Os resultados de INNOCENTI *et al.* (1999) são consistentes com a interpretação de que a HU modula a biotransformação *in vivo* da 6-MP, e conversão deste pró-fármaco em metabólitos que são farmacologicamente (inibição do crescimento de tumores) e toxicologicamente ativos (inibidores da proliferação celular) por ação em etapa posterior a formação de 6-TGN (*i.e.*, a HU inibe a conversão da 6-MP em nucleotídeos 6-tioguanina ativos (6-TGNs), incluindo o trifosfato de 6-tiodesoxiguanosina (6-dTGTP). Este último metabólito parece ser o mais ativo em termos de citotoxicidade, e a sua incorporação ao DNA é considerada como o mecanismo primário pelo qual a 6-MP inibe a proliferação celular. O metabolismo da 6-MP é apresentado esquematicamente na Figura 1.6.

O conjunto de resultados de INNOCENTI *et al.* (1999) demonstra que a 6-MP é ativamente metabolizada em ratos e que a sua biotransformação *in vivo* pode ser modulada pela administração concomitante de HU, fármaco que inibe a enzima responsável pela interconversão intracelular de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos. Estes achados também evidenciam que o rato é um modelo animal adequado para investigar o metabolismo da 6-MP, e como outros fármacos poderiam modular os seus efeitos farmacológicos e toxicológicos.

PLATZEK & SCHWABE (1999) estudaram os efeitos da administração combinada (concomitante e seqüencial) de HU e 6-mercaptopurina ribosídeo (6-MPr) a camundongos no dia 11 de gestação (DG11). Os autores administraram uma dose teratogênica de 6-mercaptopurina ribosídeo (6-MPr) (16 mg/kg sc) e uma dose (NOAEL) não embriotóxica de HU (250 mg/kg ip) de acordo com três esquemas de tratamento combinado: administração concomitante; administração de HU 2 horas antes da injeção de 6-MPr; e administração de 6-MPr 2 horas antes da injeção de HU. Os fetos foram removidos no dia 18 de gestação (DG18) e examinados. As doses de 6-MPr e HU foram selecionadas a partir de relações dose-resposta embriotóxica em camundongos determinadas em experimentos prévios que integram o mesmo trabalho (HU) ou, no caso da 6-MPr, trabalho anterior do grupo (PLATZEK & BOCHERT, 1996). Além dos tratamentos combinados (HU e 6-MPr) o estudo incluiu um grupo controle não tratado, mas não incluiu no mesmo experimento grupos tratados apenas com um dos dois fármacos (monotratamento). Assim sendo, as conclusões dos autores relativas às comparações entre a resposta (dos camundongos) à administração combinada dos dois fármacos (concomitante ou seqüencial) e o tratamento com apenas um deles (monotratamento), na realidade envolveram comparações de resultados obtidos em experimentos diferentes, realizados em épocas distintas.

Segundo PLATZEK & SCHWABE (1999), os resultados obtidos mostraram que as diferenças da incidência global de anormalidades morfológicas fetais entre os tratamentos combinados foi “moderada”. Entretanto, quando as diferenças de incidência foram analisadas em detalhe (*i.e.*, anomalias específicas) o grupo que recebeu 6-MPr 2 horas antes da HU se destacou dos demais. Os autores também identificaram o que, segundo eles, seriam anomalias tipicamente causadas pela HU (crânio) e pelo 6-MPr (patas) o que possibilitaria inferências sobre qual fármaco estaria modulando o efeito típico do outro em relação a essas anomalias fetais de camundongos. As interações observadas por PLATZEK & SCHWABE (1999) em camundongos poderiam ser sintetizadas como se segue:

- A administração concomitante de HU e 6-MP não teria alterado o efeito embriotóxico (teratogenico) típico da 6-MPr, mas teria causado um pequeno aumento da frequência de anomalias do crânio típicas da HU;
- A administração de HU 2 horas da 6-MPr teria aumentado a incidência de anomalias de patas e do crânio (efeito maior do que aumento registrado com o tratamento concomitante) em comparação com o que ocorreria com o monotratoamento com 6-MPr (patas) e HU (crânio).
- A administração de 6-MPr 2 horas antes da HU teria diminuído acentuadamente a frequência de defeitos nas patas (6-MPr), e aumentado de forma ainda mais evidente as anomalias de ossos do crânio.

PLATZEK & SCHWABE (1999) também investigaram a influência do co-tratamento com HU sobre a taxa de incorporação de 6-tioguanina ao DNA após a administração de 6-MPr marcada com enxofre radioativo (^{35}S). Essa avaliação, entretanto, foi realizada apenas em relação a um dos esquemas empregados, ou seja, aquele esquema de tratamento cujos resultados forneceram a evidência mais forte de interação (6-MPr administrada 2 horas antes de HU). De um grupo de fêmeas grávidas tratado (DG 11) com ^{35}S -6-MPr metade recebeu também uma injeção de HU 2 horas depois do primeiro fármaco enquanto as demais não receberam qualquer tratamento. Todos os embriões foram removidos 4 horas após a administração de ^{35}S -6-MPr e a incorporação de 6-tioguanina ao DNA foi medida nas duas situações. Os autores constataram que a administração seqüencial de HU reduziu a incorporação de 6-tioguanina ao DNA a níveis que correspondem a 42% do observado na ausência de co-tratamento, Essa redução é consistente com a hipótese de que a HU inibe a conversão do pró-fármaco 6-MP em metabólitos que são incorporados ao DNA, bloqueando a sua replicação e conseqüentemente inibindo a proliferação celular. Como, nesse esquema específico de administração seqüencial de HU, houve também uma atenuação dos efeitos embriotóxicos (teratogênicos) da 6-MP, pode-se supor – como fazem os autores – que a teratogenicidade da 6-MP seria pelo menos em parte devida à incorporação de 6-tioguanina e modificação do DNA. Em estudo anterior, PLATZEK *et al.* (1994) haviam também encontrado evidências de que há um paralelismo entre a taxa de incorporação de 6-tioguanina ao DNA e o efeito teratogênico da 6-MPr em camundongos. Entretanto, essa hipótese sobre o modo de ação subjacente ao efeito teratogênico da 6-MP teria sido consideravelmente fortalecida se, no

estudo de tratamentos combinados, os autores tivessem determinado também a incorporação de 6-tioguanina nos demais esquemas de administração, e não apenas em um deles, e obtido resultados consistentes com essa interpretação. Isto é, se os resultados tivessem indicado que não ocorreu diminuição da incorporação da 6-tioguanina nas situações em que tratamento combinado com HU não atenuou os efeitos típicos da 6-MP.

Não encontramos estudos experimentais com este foco (interação da HU com a 6-MP) posteriores aos dois acima mencionados, embora haja inconsistências entre a hipótese proposta por INNOCENTI *et al.* (1999) e os resultados obtidos por PLATZEK & SCHWABE (1999).

2 – OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

O objetivo da primeira parte deste trabalho foi analisar as relações entre as doses dos fármacos antineoplásicos (hidroxiuréia, HU e 6-mercaptopurina, 6-MP) administradas durante período crítico da embriogênese/organogênese e as manifestações de embriotoxicidade observadas no feto a termo. Os efeitos adversos de medicamentos antineoplásicos sobre o desenvolvimento embriofetal são amplamente conhecidos, a partir tanto de estudos experimentais com animais de laboratório quanto de observações clínicas. Entretanto, embora se saiba há muito tempo que a HU e a 6-MP são teratogênicas para roedores, poucos estudos examinaram em detalhe as relações dose-efeito em amplo intervalo de doses.

A segunda parte deste trabalho teve como objetivo investigar se haveria interação entre os efeitos da hidroxiuréia (HU) e da 6-mercaptopurina (6-MP) sobre o embrião após tratamentos sequenciais ou concomitantes. Só foi possível desenhar este segundo estudo após analisar as relações quantitativas entre dose administrada e efeito embriotóxico realizada para cada um dos fármacos isoladamente na primeira parte deste trabalho. A hipótese de que a HU, inibindo a bio-ativação da 6-MP a 6-tioguanina (nucleotídeo ativo) poderia modular o efeito citotóxico e antineoplásico da 6-MP foi originalmente proposta por INNOCENTI *et al.*, 1999. No mesmo ano, PLATZEK *et al.*, 1999 investigaram se haveria interação entre a HU e a 6-MP em termos dos seus efeitos embriotóxicos em camundongos. Como os resultados obtidos por PLATZEK e colaboradores em camundongos foram pouco claros, em relação a ocorrer ou não a interação prevista pela hipótese de INNOCENTI e colaboradores, decidimos testar esta hipótese em ratas grávidas.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 – Análise das relações entre as doses de HU e 6-MP administradas a ratas no dia 11 de gravidez e as manifestações de embriotoxicidade observadas em fetos a termo. (Primeira parte do trabalho).

2.2.1.1 – Determinação da relação entre a dose de HU dada no DG11 e o efeito embriotóxico em ratos (DG21).

- 1) Avaliação das relações entre as doses da HU e desfechos relacionados a morte do concepto: reabsorções, morte fetal.
- 2) Avaliação das relações entre as doses da HU e peso fetal.
- 3) Avaliação das relações entre as doses da HU e anormalidades visíveis ao exame externo do feto.
- 4) Avaliação das relações entre as doses da HU e anomalias do esqueleto fetal, geralmente classificadas como “variações”.
- 5) Avaliação das relações entre as doses da HU e anomalias do esqueleto fetal, geralmente classificadas como “malformações”.
- 6) Construir curvas dose-resposta para o conjunto de malformações induzidas pela HU.
- 7) Determinar máxima dose não teratogênica / embriotóxica da HU.

2.2.1.2 - Determinação da relação entre a dose de 6-MP dada no DG11 e o efeito embriotóxico em ratos (DG21).

- 1) Avaliação das relações entre as doses da 6-MP e desfechos relacionados a morte do concepto: reabsorções, morte fetal.
- 2) Avaliação das relações entre as doses da 6-MP e peso fetal.
- 3) Avaliação das relações entre as doses da 6-MP e anormalidades visíveis ao exame externo do feto.
- 4) Avaliação das relações entre as doses da 6-MP e anomalias do esqueleto fetal geralmente classificadas como “variações”.
- 5) Avaliação das relações entre as doses da 6-MP e anomalias do esqueleto fetal geralmente classificadas como “malformações”.

- 6) Construir curvas dose-resposta para o conjunto de malformações induzidas pela 6-MP.
- 7) Determinar máxima dose não teratogênica/embriotóxica da 6-MP.
- 8) Determinar dose teratogênica/embriotóxica sub-máxima da 6-MP.

2.2.2 - Investigação da hipótese de que haveria interação entre os efeitos da hidroxiuréia (HU) e da 6-mercaptopurina (6-MP) sobre o embrião de rato após tratamentos sequenciais ou concomitantes (DG11). (Segunda parte do Trabalho).

2.2.2.1 – Elucidação das interações entre HU (máxima dose não teratogênica) e 6-MP (dose teratogênica sub máxima), administradas concomitantemente (DG11) que são observáveis em fetos de rato a termo (DG21).

- 1) Avaliação de desfechos relacionados a morte do concepto: reabsorções, morte fetal.
- 2) Avaliação das alterações de peso fetal.
- 3) Avaliação das anormalidades visíveis ao exame externo do feto.
- 4) Avaliação das anomalias do esqueleto fetal geralmente classificadas como “variações”.
- 5) Avaliação das anomalias do esqueleto fetal geralmente classificadas como “malformações”.

2.2.2.2 - Elucidação das interações da HU (máxima dose não teratogênica) administrada 2 e 4 horas, antes ou depois (DG11) da 6-MP (dose teratogênica sub máxima), que são observáveis em fetos de rato a termo (DG21).

- 1) Avaliação de desfechos relacionados a morte do concepto: reabsorções, morte fetal.
- 2) Avaliação das alterações de peso fetal.
- 3) Avaliação das anormalidades visíveis ao exame externo do feto.
- 4) Avaliação das anomalias do esqueleto fetal geralmente classificadas como “variações”.
- 5) Avaliação das anomalias do esqueleto fetal geralmente classificadas como “malformações”.

3 – MATERIAL E MÉTODO

3.1 – FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS:

- Hidroxiureia (HU): Sigma-Aldrich (*St. Louis, MO, USA*)

Pureza: $\geq 98\%$:

Lote: # 021M1728V

CAS: 127-07-1.

- 6-mercaptopurina (6-MP): Sigma-Aldrich (*St. Louis, MO, USA*).

Pureza: 98%

Lote: # MKBF9113V

CAS: 6112-76-1

3.2 – SAIS, SOLVENTES E OUTRAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS:

- Cloreto de sódio PA (NaCl): Vetec®Química Fina

- Hidróxido de sódio PA (NaOH)

- Ácido clorídrico fumegante (HCl): Merck

- Ferrocianeto de potássio: Merck, Ref. 1049730

- Sulfeto de amônio: Vetec Química Fina Ltda.

- Formaldeído, P.A.: Vetec

- Álcool benzílico PA: Vetec Química Fina Ltda.

- Alcool etílico PA (etanol absoluto): Vetec®Química Fina, cod 107 (Rio de Janeiro, RJ, Brasil)

- *Alizarin Red S*: Sigma – Aldrich

- Glicerina: Vetec Química Fina Ltda

- Hidróxido de potássio Vetec Química Fina Ltda.

- Éter dietílico: Merck, Ref. 100921

3.3 - ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Wistar* (machos e fêmeas nulíparas), fornecidos pelo Biotério Central da FIOCRUZ. Após o recebimento dos animais com 100 dias (200-250 g), machos e fêmeas foram alojados individualmente em gaiolas *standard*, e mantidos em condições controladas de temperatura (23 ± 1 °C), fotoperíodo (12 horas) e umidade relativa (70%). Os animais foram aclimatizados por 10 dias e, após este período, machos e fêmeas foram acasalados.

Este estudo obteve aprovação prévia pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório (CEUA/FIOCRUZ), conforme o Protocolo P-55/11-3.

3.4 - PRIMEIRA FASE DO ESTUDO: ESTUDOS DOSE-EFEITO DE EMBRIOTOXICIDADE DA HU E DA 6-MP.

Os estudos dose-efeito incluídos nesta fase, que envolveram a exposição *in utero* de embriões à HU ou 6-MP, foram conduzidos de maneira similar, e envolveram procedimentos comuns, que encontram-se descritos a seguir, e esquematizados na Figura 3.1.

3.4.1 - CRUZAMENTO DOS ANIMAIS

Para o acasalamento dos animais, 2 fêmeas virgens foram transferidas para gaiola de 1 macho, durante as duas últimas horas da fase escura. Após este período, a ocorrência do acasalamento foi confirmada, pela presença de espermatozoides no lavado vaginal ou presença de *plug* vaginal. Consideramos, para as ratas que apresentaram uma, ou ambas as condições, o dia 0 de gestação.

3.4.2 - TRATAMENTO DAS RATAS GRÁVIDAS

No dia 11 de gestação (DG11), ratas grávidas receberam HU, 6-MP, ou veículo (salina 0,9% ou solução de NaOH 0,05 N, pH 8,0, respectivamente). A HU foi diluída em salina a 0,9% e administrada por via intraperitoneal (10 ml/kg), nas doses de 250, 300, 400 e 500 mg/kg. A 6-MP foi injetada subcutaneamente (4 ml/kg), nas doses de 6, 12 e 24 mg/kg.

As doses de HU e 6-MP utilizadas, foram determinadas com base nos dados existentes descritos por CHAHOUD *et al.*, 2002 e CHAHOUD *et al.*, 2009.

3.4.3 – CESARIANA

No dia 21 de gestação (DG21), as ratas grávidas foram eutanasiadas por inalação de CO₂, e submetidas à cesariana. O útero grávido com todo seu conteúdo foi pesado, e os fetos e as suas respectivas placentas foram retirados e pesados. Os efeitos embrioletais (sítios de implantação e reabsorções) foram quantificados de acordo com SALEWSKI, 1964. Os fetos vivos foram identificados, pesados e examinados com relação à presença e aos tipos de anomalias externas. Os fetos foram fixados em formalina a 5%, para posterior diafanização/coloração e avaliação das anomalias esqueléticas.

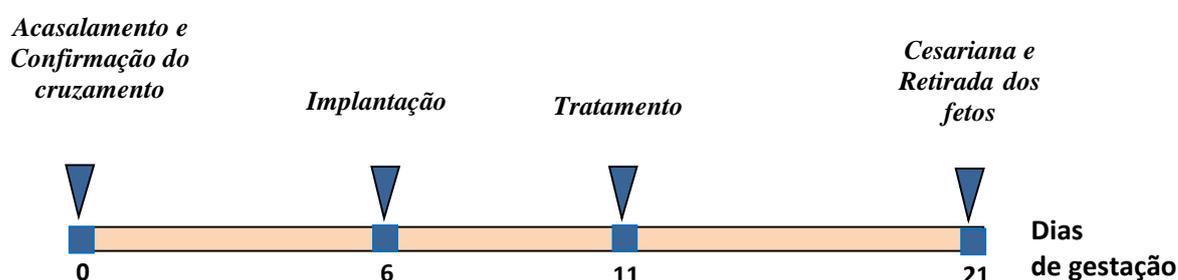


Fig. 3.1: Desenho Experimental empregado nos estudos de embriotoxicidade.

3.4.4 – DIAFANIZAÇÃO E COLORAÇÃO DOS FETOS

Os fetos fixados em formalina a 5% foram eviscerados e transferidos para uma cuba apropriada, contendo solução de éter etílico/etanol (1:4), onde foram imersos e mantidos durante uma semana.

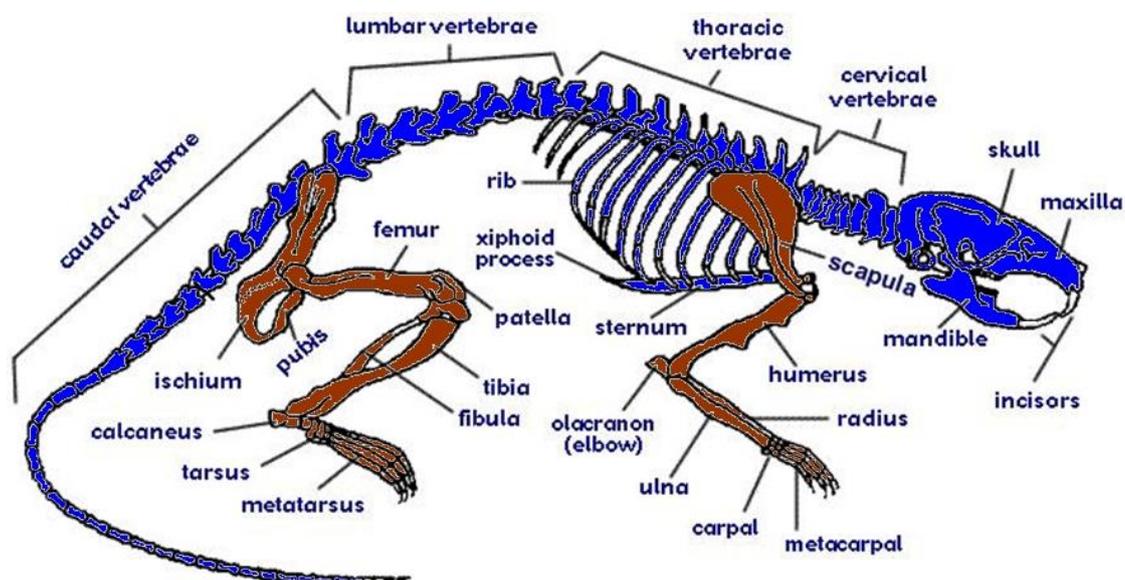
Em seguida, os fetos foram lavados em água, e transferidos para um novo recipiente com solução Alizarina *Red S* a 0,3% (p/v) / KOH a 10% (p/v) - preparada na proporção de 28-30 gotas/10 ml, por aproximadamente sete dias, para a clarificação das peles e coloração dos esqueletos. Esta solução era renovada a cada dois dias.

Os fetos foram novamente lavados em água e transferidos para uma solução de álcool benzílico/etanol/glicerol (1:2:2), onde permaneceram por 24 horas. Os fetos diafanizados e corados foram mergulhados em glicerol, e assim mantidos até o momento da avaliação dos esqueletos.

3.4.5 – AVALIAÇÃO DOS ESQUELETOS

Após a diafanização das partes moles e a coloração das estruturas mineralizadas (calcificadas) com *Alizarina red S* (incorporada ao cálcio presente nos ossos), a avaliação sistemática completa dos esqueletos axial (crânio, coluna vertebral, costelas e esterno) e apendicular (ossos dos cinturões peitoral e pélvico, e dos membros superiores e inferiores) dos fetos, As avaliações esqueléticas foram realizadas por meio de microscópio estereoscópico (Olympus SZX12, Olympus Optical Co LTD). Todas as malformações ósseas encontradas, bem como o estado de calcificação dos ossos, foram registrados e classificados de acordo com WISE, *et al.*, 1997. Assim sendo, quanto ao estado de calcificação (ossificação), os ossos foram classificados como esponjosos, não calcificados, ou pobremente calcificados.

O esqueleto do rato está esquematizado na Figura 3.2.



(Adaptado de http://www.biologycorner.com/resources/rat_skeleton_labeled.gif)

Fig. 3.2: Representação esquemática do esqueleto do rato adulto.

Azul: Esqueleto axial que compreende ossos localizados próximos ou ao longo do eixo central do corpo. **Marrom:** esqueleto apendicular que compreende ossos articulados ao esqueleto axial, *i.e.*, ossos dos membros anteriores e posteriores, e cintas peitoral e pélvica.

3.4.6 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Neste estudo, para verificarmos se a distribuição dos dados obtidos se ajustavam à uma distribuição normal, procedemos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, e à análise de gráficos descritivos (QQ-plot, Box-plot e histograma), utilizando o programa R (R Core Team, 2016).

Para as comparações entre os grupos experimentais, em relação às variáveis apresentando distribuição normal (peso materno, peso das placentas, pesos fetais, e relação entre peso da placenta/peso do feto), procedemos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni. As variáveis “sítios de implantação/ninhada”, “reabsorções/sítios de implantação/ninhada”, “fetos vivos/ninhada” e “fetos mortos/ninhada” (que não apresentaram distribuição normal), foram comparadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste post-hoc de Dunn. Todas as proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado, ou pelo teste da proporção exata de Fisher.

As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPadPrism5. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas significativas, quando $p < 0,05$.

3.4.7 – ESTABELECIMENTO DO NOAEL E NOEL

Os valores de NOAEL e NOEL foram determinados com base nos resultados do estudo das relações dose-resposta de cada uma das substâncias antineoplásicas testadas (HU e 6-MP), isto é, nas tabelas contendo os resultados após terem sido analisados estatisticamente.

NOAEL: *No observed adverse effect level*. Em termos práticos, o NOAEL estabelecido, dentro de cada uma das faixas de doses testadas, correspondeu à maior dose experimental em que não foram observados efeitos adversos biológica ou estatisticamente significativos, para os desfechos embriotóxicos avaliados (*e.g.*: desfechos relacionados à morte do conceito, pesos fetais e placentários, anomalias visíveis ao exame externo do feto).

NOEL: *No observed effect level*. De maneira similar, o NOEL correspondeu à maior dose experimental em que não se observou quaisquer efeitos biológica ou estatisticamente significativos, sendo estes efeitos considerados adversos (anomalias esqueléticas classificadas como malformações – eventos teratológicos), ou não (anomalias esqueléticas classificadas como variações).

3.5 - SEGUNDA FASE DO ESTUDO: ESTUDO DOS EFEITOS DAS EXPOSIÇÕES CONCOMITANTE E SEQUENCIAL DA HU E 6-MP SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE RATOS.

Nos estudos combinados envolvendo as administrações sequenciais e concomitantes, utilizamos a dose máxima não teratogênica de HU, e uma dose claramente embriotóxica e teratogênica de 6-MP, escolhidas a partir dos resultados obtidos nos dois estudos da primeira fase.

O estudo dos efeitos da exposição concomitante da HU e 6-MP sobre desenvolvimento de ratos incluiu um conjunto de três estudos similares, que variaram apenas nos horários das administrações das drogas (11:00, 13:00 ou 15:00 hs). Em todos esses estudos, as drogas foram administradas nas duas seqüências: HU e 6-MP, e vice-versa.

Nos experimentos de exposição sequencial, foram fixados intervalos de 2 ou 4 horas entre as administrações dos fármacos. Em todos os casos, duas seqüências de administração foram empregadas (HU sendo administrada antes e depois da 6-MP). Sendo assim, quatro grupos foram constituídos:

- 1) Ratas grávidas não tratadas.
- 2) Ratas grávidas tratadas com HU e veículo, e vice-versa.
- 3) Ratas tratadas com veículo e 6MP, e vice-versa.
- 4) Ratas tratadas com HU e 6MP, e vice-versa.

Todos os estudos envolveram o cruzamento dos animais, tratamento das ratas grávidas, cesariana e retirada do útero gravídico contendo fetos, bem como a fixação dos fetos, diafanização e coloração do esqueleto, que foram conduzidos de acordo com o descrito nos itens de 3.4.1 a 3.4.5. Em todos os experimentos combinados a HU foi testada na dose de 250 mg/kg e a 6-MP, na dose de 24 mg/kg, que foram estabelecidas com base dos achados da primeira fase.

O desenho experimental dos estudos empregando administrações combinadas de HU e 6-MP (concomitantes e sequenciais) realizados na segunda fase deste trabalho, e o número de fêmeas grávidas tratadas em cada grupo experimental (DG11) encontram-se resumidos no Quadro III.

QUADRO III: Desenho experimental empregado nos estudos dos efeitos das exposições combinadas (concomitantes e sequenciais) a HU e 6-MP – Segunda fase.				
Tratamento	Intervalo entre tratamentos (hs)	Horário das administrações	Grupos experimentais	Fêmeas Grávidas (N)
Concomitante	0	11:00 hs	HU+NaOH ou NaOH+HU	24
		13:00 hs	Salina+6MP ou 6MP+Salina	30
		15:00 hs	HU+6MP ou 6MP+HU	28
Sequencial	2	1 ^a - 11:00 hs	HU→NaOH	11
			Salina→6MP	11
			HU→6MP	11
	4	2 ^a - 13:00 hs	NaOH→HU	10
			6MP→Salina	10
			6MP→HU	10
4	1 ^a - 11:00 hs	HU→NaOH	13	
		Salina→6MP	11	
		HU→6MP	10	
4	2 ^a - 15:00 hs	NaOH→HU	10	
		6MP→Salina	11	
		6MP→HU	14	
Nenhum	-	-	NADA	17

De acordo com o Quadro III, o estudo dos efeitos do tratamento concomitante com HU e 6-MP sobre desenvolvimento embrionário envolveu três grupos de ratas grávidas tratadas com ambos os agentes antineoplásicos, em três horários distintos (3, 5 ou 7 horas após o início do ciclo claro, *i.e.*, às 11:00, 13:00 ou 15:00 hs). No rato, durante o DG11, o intervalo de 2 horas corresponde ao tempo médio aproximado de aparecimento de um somito. Como a susceptibilidade aos agentes teratogênicos pode variar com o estágio de desenvolvimento em que ocorre a exposição, verificamos se diferenças de até 4 horas no horário de tratamento poderiam modificar qualitativamente e/ou quantitativamente, a manifestação do efeito teratogênico dos fármacos utilizados.

4 – RESULTADOS

4.1 - PRIMEIRA FASE

4.1.1 – DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE DOSES DE HU ADMINISTRADAS A RATAS NO DG11 E OS EFEITOS EMBRIOTÓXICOS EM RATOS (DG21).

4.1.1.1 – TOXICIDADE MATERNA, PERDAS GESTACIONAIS, PESO DO FETO E DA PLACENTA, E ANORMALIDADES MORFOLÓGICAS DETECTADAS NO EXAME EXTERNO.

O ganho de peso materno durante a gravidez, o peso do útero gravídico no DG21 e o número de sítios de implantação estão mostrados na Tabela 4.1.1. Os parâmetros analisados por ocasião da cesárea, tais como perdas gestacionais pós-implantação (reabsorções e fetos mortos), tamanho das ninhadas, peso das placentas, peso fetal (DG21), e proporção de fetos com malformações detectadas pelo exame externo são mostrados na Tabela 4.1.2.

Toxicidade materna. Alterações de ganho de peso durante a gestação podem resultar, tanto da toxicidade para o organismo materno, quanto da toxicidade para o concepto (perdas gestacionais e redução do peso fetal e da placenta). A redução do ganho de peso materno durante toda a gestação (DG 21-0) descontado o peso do útero com todo o seu conteúdo (útero gravídico) ao final da mesma (DG21), é um indicador de toxicidade para o organismo materno, decorrente do tratamento.

Como pode ser observado na Tabela 4.1.1, o tratamento com a maior dose de HU (500 mg/kg) causou uma redução significativa no peso do útero gravídico (com todo seu conteúdo), bem como no ganho de peso materno (DG 21-11 e DG 21-0), em relação ao grupo controle e aos grupos que receberam menores doses. Esta mesma dose causou aumentos importantes nas taxas reabsorção e redução do tamanho da ninhada (perda gestacional). Quando o peso do útero gravídico foi descontado do ganho total de peso materno durante a gravidez (dia 21-0), as diferenças entre os ganhos de peso observadas com a dose de 500 mg/kg de HU desapareceram, o que significa que o tratamento não provocou toxicidade materna. Portanto, as diminuições do ganho de peso materno registradas no DG 21-11 e DG

21-0 provavelmente foram decorrentes da perda gestacional causada pelo tratamento (reabsorções), somada às reduções dos pesos dos fetos e das placentas observadas na Tabela 4.1.2.

A tabela 4.1.2 mostra que as doses de 400 e 500 mg/kg de HU causaram um aumento da frequência de fetos apresentando anomalias visíveis ao exame externo (fetos malformados). Podemos observar que estas mesmas doses de HU causaram uma redução significativa dos pesos dos fetos (fetos individuais e ninhadas como unidades de análise), sendo que, quando os pesos individuais foram utilizados como unidade de análise, esta diminuição ocorreu de maneira dose-dependente. A HU provocou uma diminuição dose-dependente dos pesos das placentas, bem como da razão peso da placenta/peso fetal (indivíduos como unidade de análise), a partir 300 mg/kg. Quando estes mesmos parâmetros foram analisados utilizando a ninhada como unidade de análise, as diminuições observadas foram significativas, somente a partir de 400 mg/kg. A diminuição progressiva da relação peso da placenta/peso fetal indicou que o efeito da HU sobre o peso da placenta foi relativamente maior do que o seu efeito sobre o peso fetal.

Em suma, os resultados descritos nas Tabelas 4.1.1 e 4.1.2 indicaram que a HU, até 500 mg/kg:

- i) Não provocou toxicidade materna.
- ii) Agiu sobre as placentas, reduzindo os seus pesos, o que pode ter contribuído, pelo menos em parte, para diminuição do peso dos embriões.
- iii) Agiu diretamente sobre os embriões, aumentando as taxas de reabsorção, diminuindo a proporção de fetos vivos, aumentando a frequência do aparecimento de malformações fetais externas, e diminuindo seus pesos.
- iv) Teve um efeito maior sobre o peso da placenta, do que sobre o peso do feto.
- v) Dentro da faixa de doses testadas o NOAEL (*no observe adverse effect level*) da HU para embriotoxicidade, isto é, a menor dose em que não foram observados efeitos adversos, ou que não diferiram do observado no grupo controle, foi de 250 mg/kg.

4.1.1.1.1 - ANOMALIAS DETECTADAS NO EXAME EXTERNO:

A Tabela 4.1.3 mostra os tipos e as frequências de malformações externas induzidas pela HU, registradas nos fetos, logo após o nascimento (cesariana: DG21).

Como podemos observar, com 400 e 500 mg/kg de HU houve um aumento significativo e dose-dependente da proporção de fetos apresentando posição irregular das patas traseiras, ausência de dedo(s) e caudas com pontas curvas. A maior dose (500 mg/kg) provocou também, um aumento percentual de fetos com dobras irregulares nas orelhas.

De uma maneira geral, o tratamento com as maiores dose HU aumentou as incidências de malformações de patas traseiras, cauda e orelha.

Tabela 4.1.1: Ganho de peso durante a gravidez de ratas tratadas (DG11) com HU.

PARÂMETROS AVALIADOS	HU (mg/kg, ip)				
	0	250	300	400	500
Fêmeas grávidas (N)	11	11	11	12	9
<i>Reabsorções</i>					
Total (N)	13	12	11	14	37
Por sítios de implantação (%)	10,92	8,39	8,59	9,79	38,14 abcd
Por implantação por ninhada (%)	12,50 (22,22)	7,69 (14,29)	7,69 (12,50)	8,33 (13,52)	28,57 (85,44)
Peso do útero gravídico (g)	70,41 ± 20,40	81,76 ± 16,00	74,07 ± 19,60	67,84 ± 20,02	39,48 ± 33,84 abc
<i>Ganho de peso materno (Δg)</i>					
Dia 11-0	49,46 ± 18,88	52,93 ± 7,53	50,27 ± 14,80	49,76 ± 9,90	43,44 ± 6,88
Dia 13-11	7,29 ± 0,05	4,85 ± 3,41	9,40 ± 8,28	5,10 ± 3,14	4,76 ± 3,12
Dia 15-11	11,72 ± 6,12	14,16 ± 3,81	16,14 ± 5,15	15,52 ± 8,52	10,05 ± 7,41
Dia 21-11	79,01 ± 18,29	86,57 ± 11,69	71,92 ± 22,87	73,78 ± 20,07	47,36 ± 29,27 ab
Dia 21-0	128,47 ± 32,04	139,50 ± 16,60	122,19 ± 28,70	123,53 ± 27,33	84,49 ± 38,65 abd
Dia 21-0 - (peso do útero)	58,06 ± 17,98	57,74 ± 7,57	48,12 ± 15,23	55,69 ± 12,30	45,01 ± 10,38

Os dados representados como medianas (Q1-Q3) foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. (Q3-Q1): amplitude interquartilica, calculada pela diferença entre o 3º (Q3) e o 1º quartil (Q1). Os dados representados como médias ± d.p foram analisados por ANOVA seguida por teste de Bonferroni. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ 0 mg/kg; b ≠ 250 mg/kg; c ≠ 300 mg/kg; d ≠ 400 mg/kg.

Tabela 4.1.2: Efeito embriotóxico do tratamento de ratas grávidas com HU (DG11). Análise dos parâmetros obtidos por ocasião da cesária (DG21).

PARÂMETROS AVALIADOS	HU (mg/kg, ip)				
	0	250	300	400	500
Fêmeas grávidas (N)	11	11	11	12	9
<i>Sítios de Implantação</i>					
Total (N)	119	143	128	143	97
Por ninhada	12,00 (5,00)	13,00 (3,00)	12,00 (7,00)	12,00 (3,00)	11,00 (7,00)
<i>Reabsorções</i>					
Total (N)	13	12	11	14	37
Por sítios de implantação (%)	10,92	8,39	8,59	9,79	38,14 abcd
Por implantação por ninhada (%)	12,50 (22,22)	7,69 (14,29)	7,69 (12,50)	8,33 (13,52)	28,57 (85,44)
<i>Fetos vivos</i>					
Total (N)	106	131	117	129	60
Por sítios de implantação (%)	89,08	91,61	91,41	90,21	61,86 abcd
Por ninhada	10,00 (5,00)	12,00 (1,00)	10,00 (5,00)	11,00 (3,75)	7,00 (10,50)
Fetos mortos (N)	0	0	0	0	0
Fetos malformados (%)	0,00	3,81	0,00	20,93 abc	46,67 abcd
<i>Peso fetal (g)</i>					
Individual (média ± d.p.)	4,97 ± 0,39	4,82 ± 0,34	4,80 ± 0,45	4,42 ± 0,60 abc	4,04 ± 0,74 abcd
Por ninhada (média ± d.p.)	4,97 ± 0,23	4,82 ± 0,17	4,79 ± 0,34	4,42 ± 0,48 a	4,02 ± 1,82 abc
<i>Peso das placentas (g)</i>					
Individual (média ± d.p.)	0,50 ± 0,07	0,48 ± 0,07	0,45 ± 0,08 a	0,38 ± 0,08 abc	0,32 ± 0,12 abcd
Por ninhada (média ± d.p.)	0,51 ± 0,05	0,48 ± 0,05	0,46 ± 0,07	0,38 ± 0,07 abc	0,32 ± 0,12 abc
<i>Peso da placenta/peso fetal (%)</i>					
Individual (média ± d.p.)	10,25 ± 2,15	9,90 ± 1,49	9,46 ± 1,88 a	8,72 ± 1,66 abc	7,66 ± 1,83 abcd
Por ninhada (média ± d.p.)	10,39 ± 1,44	9,93 ± 1,00	9,67 ± 1,55	8,72 ± 1,00 a	7,70 ± 4,92 abc

Os dados representados como medianas (Q1-Q3) foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. (Q3-Q1): amplitude interquartílica, calculada pela diferença entre o 3º (Q3) e o 1º quartil (Q1). Os dados representados como médias ± d.p foram analisados por ANOVA seguida por teste de Bonferroni. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ 0 mg/kg; b ≠ 250 mg/kg; c ≠ 300 mg/kg; d ≠ 400 mg/kg.

Tabela 4.1.3: Tipos e frequências de anomalias detectadas pelo exame externo na prole (DG21) de ratas que receberam tratamento HU durante a gravidez (DG11).

PARÂMETROS AVALIADOS	HU (mg/kg, <i>ip</i>)				
	0	250	300	400	500
Fetos vivos (N)	106	131	117	129	60
Ninhadas (N)	11	11	11	12	7
<i>Malformações (%)</i> :					
Posição irregular PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,76 (9,09)	0,00 (0,00)	6,20 ^{abc} (25,00)	18,33 ^{abcd} (42,86) ^{abcd}
Ausência de 1 ou mais dedos PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,65 ^{abc} (25,00)	5,00 ^{abc} (42,86) ^{abcd}
Posição irregular do 1º dedo PTD	0,00 (0,00)	3,03 (27,27)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Posição irregular do 2º dedo PTD	0,00 (0,00)	0,76 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Cauda com ponta curva	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,20 ^{abc} (33,33)	20,00 ^{abcd} (57,14) ^{abcd}
Cauda curva	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
Cauda curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,55 (16,67)	1,67 (14,29)
Cauda encrespada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
Cauda curta e encrespada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
Cauda curta com ponta curva	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
Cauda encrespada com ponta curva	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Anoftalmia dupla	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
Gastroquise	0,00 (0,00)	0,76 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Dobra irregular da OE e/ou OD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,33 (16,67)	5,00 ^{abc} (14,29)
Inserção e forma irregular da OE e/ou OD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Posicionamento irregular da OE	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Protusão da língua	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos malformados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 250 mg/kg; c \neq 300 mg/kg; d \neq 400 mg/kg. PTE e PTD: patas traseiras esquerda e direita, respectivamente; PDE e PDD: patas dianteiras esquerda e direita, respectivamente; OE e OD: orelha esquerda e direita.

4.1.1.2 – ANORMALIDADES DO ESQUELETO FETAL

O exame minucioso e sistemático do esqueleto fetal, após a diafanização das partes moles e a coloração dos ossos (estruturas calcificadas) com *Alizarina red S*, constitui uma das abordagens mais sensíveis para evidenciar e quantificar o efeito de agentes teratogênicos em roedores.

Nesta etapa do trabalho, foi realizada a avaliação completa dos esqueletos de todos os fetos, o que incluiu a leitura de todos os ossos pertencentes ao esqueleto axial (ossos do crânio, coluna vertebral, costelas e esterno) e ao esqueleto apendicular (ossos dos cinturões peitoral e pélvico, e dos membros superiores e inferiores). Além disso, os ossos também foram classificados, em relação aos seus respectivos graus de calcificação, entre esponjosos, não calcificados, e pobremente calcificados.

O registro sistemático das anomalias observadas após os exames dos esqueletos fetais (todos os ossos) produziu uma grande quantidade de dados. O quadro completo com todas as observações registradas está apresentado nos Anexos de 6 a 16.

As informações apresentadas nas tabelas a seguir foram extraídas das tabelas completas, e apresentam os perfis dose-resposta apenas de anomalias, cujas incidências diferiram significativamente das do grupo controle, separadas de acordo com a localização no esqueleto (regiões do esqueleto axial ou do esqueleto apendicular).

As Tabelas simplificadas de 4.1.4 a 4.1.15 mostram os tipos e as frequências das malformações esqueléticas induzidas pela HU, e o estado de ossificação dos ossos.

4.1.1.2.1 – ESQUELETO AXIAL:

Crânio:

No crânio, foram registrados aumentos das incidências de alterações anatômicas anomalias classificadas como malformações e como variações (item 1.6), conforme os dados apresentados na Tabela 4.1.4. A Tabela 4.1.5 mostra o estado de calcificação dos ossos cranianos.

As incidências de fusão do osso zigomático com o processo jugular do maxilar, observadas nos animais tratados com HU, aumentaram pouco em relação ao grupo controle (frequência = 0,0%), *i.e.*, para 0,8%, 0,9%, 3,9% e 6,7% nas doses 250, 300, 400 e 500 mg/kg, respectivamente, sendo este aumento estatisticamente significativo, apenas na maior

dose. Este tipo de fusão normalmente ocorre durante o período pós-natal, e, de certo modo, o tratamento com HU antecipou este processo (Tabela 4.1.4).

Foram registrados aumentos nas incidências de alterações ósseas classificadas, consensualmente, como malformações, como a ocorrência de ossos com formato irregular, menores, ou mais curtos (SOLECKI *et al.*, 2001). Para os ossos apresentando forma irregular, como supraoccipital, exoccipital, timpânico e escamoso, e presfenoide, foram observados perfis dose-resposta variados.

A administração de HU provocou um aumento significativo da ocorrência de “forma irregular do osso exoccipital”, a partir de 300 mg/kg, porém, não houve diferença entre as frequências desta ocorrência entre fetos tratados com as duas maiores doses (400 e 500 mg/kg), que corresponderam a 22,5 e 21,7%, respectivamente. Os aumentos (em relação ao grupo controle) da incidência de ossos timpânicos com forma irregular foram similares (9,3% e 5,0%), e observados apenas das duas maiores doses (400 e 500 mg/kg), enquanto a ocorrência de “forma irregular do osso escamoso” foi observada somente com 250 mg/kg (frequência de 33,6%). A ocorrência “osso timpânico mais curto” foi registrada apenas na dose de 400 mg/kg de HU, porém, com uma frequência baixa (4,5%). Por outro lado, houve um aumento significativo e claramente dose-dependente, das incidências de ossos timpânicos menores, a partir de 400 mg/kg.

Para a ocorrência “forma irregular do osso supraoccipital”, verificamos que as doses de 250 e 300 mg/kg de HU causaram aumentos significativos porém pequenos, das frequências de fetos malformados em relação aos controles (de 0,9% para 7,6% e 12,0%), enquanto as doses de 400 e 500 mg/kg diminuíram as frequências observadas nas menores doses (para 3,1% e 1,7%). Apenas as doses de 250 e 400 mg/kg provocaram aumentos na frequência da ocorrência “forma irregular do osso presfenoide”, em comparação com o grupo controle.

Em todos esses casos, as frequências espontâneas observadas no grupo controle foram baixas (de 0,0% ou 0,9%), com exceção à registrada para a ocorrência “forma irregular do osso escamoso”, cuja frequência foi de aproximadamente 12,3%.

Como já mencionado no item 1.3.6, alterações esqueléticas, como buraco nos ossos, apresentando ossificação incompleta, ossos mais distantes, ossos não calcificados, pobremente calcificados, ou esponjosos, são ocorrências que indicam retardo na ossificação, que geralmente são transitórias e consideradas como variações. (KHERA 1981; SOLECKI *et al.*, 2001; CARNEY & KIMMEL, 2007; CHAHOUD & PAUMGARTEN, 2009).

Neste estudo, o tratamento com HU provocou aumento da ocorrência de vários ossos incompletos, ossos parietais mais distantes, buracos nos ossos supraoccipital e escamoso, bem

como das incidências de uma grande quantidade de ossos apresentando alterações nos graus de ossificação, em relação ao grupo controle (Tabelas 4.1.4 e 4.1.5).

Os aumentos significativos das frequências de ossos incompletos, como parietais, interparietais e escamoso, foram observados apenas na dose de 500 mg/kg, enquanto aumentos equivalentes da frequência desta ocorrência no osso frontal, ocorreram nas três maiores doses. HU provocou um aumento significativo e de maneira dose-relacionada, das frequências de fetos apresentando “osso supraoccipital incompleto” (a partir de 300 mg/kg), e “osso exoccipital incompleto”, a partir de 300 mg/kg e 400 mg/kg, respectivamente. Com relação à ocorrência “osso supraoccipital incompleto”, não houve diferença significativa entre as frequências de fetos tratados com as doses de 400 e 500 mg/kg de HU, que resultaram nas proporções de 72,9 e 81,7%. Em todos esses casos as frequências espontâneas, observadas no grupo controle, foram baixas, variando entre 0,0% a 1,9%, com exceção à registrada para a ocorrência de “osso supraoccipital incompleto”, que foi alta (39,8%). (Tabela 4.1.4). A ocorrência de ossos incompletos pode estar associada ao estado de ossificação e mineralização (calcificação) dos ossos envolvidos.

As duas menores doses (250 e 300 mg/kg) aumentaram as frequências de fetos apresentando a variação “buraco no osso supraoccipital” (para 6,1% e 6,8%), em relação ao grupo controle (frequência de 0,9%), ao passo que a ocorrência de “buraco no osso escamoso” só foi registrada com 400 mg/kg de HU.

A Tabela 4.1.5 apresenta os graus de calcificação (processo de ossificação) dos ossos crânio.

De acordo com a Tabela 4.1.5, com exceção do osso supraoccipital, a HU aumentou as frequências dos fetos apresentando ossos pobremente calcificados, de maneira significativa e dose dependente, a partir de 300 mg/kg (osso interparietal, exoccipital e timpânico), ou de 400 mg/kg (osso frontal, parietal, escamoso, processo jugular do escamoso, processo jugular do maxilar e presfenoide), aumentos estes que foram acompanhados por aumentos nas proporções de ninhadas afetadas. O tratamento com doses crescentes de HU provocou um aumento pequeno e uniforme da proporção de ossos supraoccipitais pobremente calcificados, em relação ao grupo controle.

A administração de HU também aumentou, de maneira dose-dependente, as incidências de vários outros ossos pobremente calcificados que não estavam malformados, incluindo: osso nasal, hióide, processo jugular do escamoso, premaxilar, orbital, orbitosfenoide, basoesfenoide, hamulus, pterigóide e mandíbula. A maior dose de HU também aumentou significativamente a frequência de fetos com o osso gonialo apresentando esta alteração.

A Tabela 4.1.5 mostra também, que houve um aumento significativo da incidência de ossos supraoccipitais e interparietais esponjosos, em fetos tratados com as duas maiores doses (400 e 500 mg/kg), e com a maior dose de HU, respectivamente.

Em suma, na maior parte dos casos, a HU aumentou, de modo claramente dose-dependente, as frequências de muitos ossos pobremente calcificados, quando as incidências observadas nos grupos controles não foram altas (variando entre 0,0% a 5,7%), com exceção das frequências espontâneas observadas para os ossos supraoccipital, basoccipital e basosfenoide que corresponderam a 50,0%, 12,3% e 10,4%, respectivamente. De acordo com a faixa de doses testadas, o NOEL (*no observed effect level*), estabelecido, tanto para malformações, quanto para variações observadas nos ossos do crânio foi < 250 mg/kg.

As informações completas das alterações ósseas cranianas estão disponíveis nos Anexos 6-9.

Tabela 4.1.4: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do crânio induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg, ip)				
	0	250	300	400	500
<i>Fetos vivos (N)</i>	106	131	117	129	60
<i>Ninhadas (N)</i>	11	11	11	12	7
<i>Malformações (%):</i>					
Fusão do osso zigomático com processo jugular do maxilar	0,00 (0,00)	0,76 (9,09)	0,85 (9,09)	3,88 (33,33)	6,67 ^{abc} (42,86) ^a
Forma irregular do osso supraoccipital	0,94 (9,09)	7,63 ^a (36,36)	11,97 ^a (45,45)	3,10 ^c (25,00)	1,67 ^c (14,29)
Forma irregular do osso exoccipital	0,00 (0,00)	1,53 (18,18)	11,97 ^{ab} (36,36)	22,48 ^{abc} (41,67) ^a	21,67 ^{ab} (28,57)
Forma irregular do osso timpânico	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	9,30 ^{abc} (41,67) ^{abc}	5,00 ^{abc} (42,86) ^{abc}
Forma irregular do osso escamoso	12,26 (45,45)	33,59 ^a (81,82)	12,82 ^b (54,55)	20,93 ^b (91,67) ^a	10,00 ^b (57,14)
Forma irregular do osso presfenoide	0,00 (0,00)	15,27 ^a (36,36)	0,85 ^b (9,09)	6,20 ^{abc} (16,67)	0,00 ^b (0,00)
Osso frontal incompleto	0,94 (9,09)	3,05 (27,27)	17,09 ^{ab} (36,36)	15,50 ^{ab} (50,00)	11,67 ^{ab} (28,57)
Osso parietal incompleto	0,94 (9,09)	6,11 ^a (36,36)	1,71 (18,18)	1,55 (8,33)	10,00 ^{abcd} (28,57)
Osso interparietal incompleto	1,89 (9,09)	0,76 (9,09)	0,00 (0,00)	3,88 (25,00)	21,67 ^{abcd} (28,57)
Osso supraoccipital incompleto	36,79 (90,91)	48,09 (72,73)	53,85 ^a (100,00)	72,87 ^{abc} (100,00)	81,67 ^{abc} (85,71)
Osso exoccipital incompleto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	7,75 ^{abc} (25,00)	30,00 ^{abcd} (28,57)
Osso escamoso incompleto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,00 ^{abcd} (14,29)
Osso timpânico menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	23,26 ^{abc} (50,00) ^{ab}	40,00 ^{abcd} (57,14) ^{abc}
Osso timpânico mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,65 ^{abc} (16,67)	0,00 (0,00)
Ossos parietais mais distantes	0,00 (0,00)	10,69 ^a (27,27)	31,62 ^{ab} (54,55) ^a	24,03 ^{ab} (58,33) ^a	56,67 ^{abcd} (71,43) ^a
Buraco no osso supraoccipital	0,94 (9,09)	6,11 ^a (27,27)	6,84 ^a (27,27)	2,33 (25,00)	1,67 (14,29)
Buraco no osso escamoso	12,26 (54,55)	19,85 (81,82)	16,24 (63,64)	34,11 ^{abc} (91,67)	23,33 (42,86) ^d

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos malformados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 250 mg/kg; c \neq 300 mg/kg; d \neq 400 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Tabela 4.1.5: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos do crânio induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg, ip)				
	0	250	300	400	500
<i>Fetos vivos (N)</i>	106	131	117	129	60
<i>Ninhadas (N)</i>	11	11	11	12	7
<i>Alterações (%)</i>					
Osso supraoccipital esponjoso	0,00 (0,00)	3,82 (27,27)	1,71 (18,18)	11,63 ^{abc} (33,33)	21,67 ^{abc} (28,57)
Osso interparietal esponjoso	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	8,33 ^{abcd} (14,29)
Osso nasal pobremente calcificado	1,89 (9,09)	1,53 (18,18)	0,85 (9,09)	22,48 ^{abc} (58,33) ^{ac}	53,33 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Osso frontal pobremente calcificado	1,89 (9,09)	1,53 (18,18)	0,85 (9,09)	22,48 ^{abc} (58,33) ^{ac}	53,33 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Osso parietal pobremente calcificado	1,89 (9,09)	1,53 (18,18)	4,27 (27,27)	26,36 ^{abc} (75,00) ^{abc}	56,67 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Osso interparietal pobremente calcificado	5,66 (27,27)	7,63 (45,45)	14,53 ^a (63,54)	34,88 ^{abc} (83,33) ^a	63,33 ^{abcd} (85,71)
Osso supraoccipital pobremente calcificado	50,00 (81,82)	64,12 ^a (100,00)	73,50 ^a (100,00)	74,42 ^a (91,67)	78,33 ^a (85,71)
Osso exoccipital pobremente calcificado	2,83 (18,18)	0,76 (9,09)	8,55 ^b (36,36)	32,56 ^{abc} (75,00) ^{ab}	61,67 ^{abcd} (85,71) ^{ab}
Osso basoccipital pobremente calcificado	12,26 (36,36)	34,35 ^a (72,73)	31,62 ^a (90,91) ^a	58,14 ^{abc} (91,67) ^a	78,33 ^{abcd} (85,71)
Osso timpânico pobremente calcificado	3,77 (9,09)	2,29 (27,27)	11,97 ^{ab} (27,27)	35,66 ^{abc} (75,00) ^{abc}	66,67 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Osso gonialo pobremente calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,55 (8,33)	21,67 ^{abcd} (42,86) ^{abc}
Osso hioide pobremente calcificado	0,00 (0,00)	6,11 ^a (36,36)	9,40 ^a (18,18)	37,98 ^{abc} (91,67) ^{abc}	63,33 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Osso escamoso pobremente calcificado	1,89 (18,18)	2,29 (18,18)	5,13 (27,27)	28,68 ^{abc} (83,33) ^{abc}	60,00 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Processo jugular do osso escamoso pobremente calcificado	3,77 (18,18)	2,29 (18,18)	4,27 (27,27)	28,68 ^{abc} (83,33) ^{abc}	60,00 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Osso zigomático pobremente calcificado	3,77 (18,18)	3,05 (27,27)	4,27 (27,27)	30,23 ^{abc} (83,33) ^{abc}	60,00 ^{abcd} (85,71) ^{abc}

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos alterados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 250 mg/kg; c \neq 300 mg/kg; d \neq 400 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

(Cont.) Tabela 4.1.5: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos do crânio induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg, ip)				
	0	250	300	400	500
<i>Fetos vivos (N)</i>	106	131	117	129	60
<i>Ninhadas (N)</i>	11	11	11	12	7
<i>Alterações (%)</i>					
Osso maxilar pobremente calcificado	3,77 (18,18)	3,05 (27,27)	4,27 (27,27)	27,91 ^{abc} (83,33) ^{abc}	60,00 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Processo jugular do maxilar pobremente calcificado	3,77 (18,18)	3,05 (27,27)	4,27 (27,27)	27,91 ^{abc} (83,33) ^{abc}	60,00 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Osso premaxilar pobremente calcificado	3,77 (18,18)	3,05 (27,27)	4,27 (27,27)	27,91 ^{abc} (83,33) ^{abc}	60,00 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Osso lacrimal pobremente calcificado	2,83 (18,18)	2,29 (18,18)	3,42 (27,27)	26,36 ^{abc} (75,00) ^{abc}	60,00 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Lâmina orbital do osso frontal pobremente calcificada	1,89 (9,09)	2,29 (18,18)	3,42 (27,27)	26,36 ^{abc} (75,00) ^{abc}	60,00 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Osso palatino pobremente calcificado	3,77 (27,27)	6,87 (27,27)	16,24 ^{ab} (81,82) ^{ab}	36,43 ^{abc} (83,33) ^{ab}	71,67 ^{abcd} (85,71) ^{ab}
Osso presfenoide pobremente calcificado	3,77 (9,09)	0,00 ^a (0,00)	1,71 (9,09)	16,28 ^{abc} (50,00) ^b	38,33 ^{abcd} (71,43) ^{abc}
Osso orbitoesfenoide pobremente calcificado	5,66 (36,36)	6,87 (27,27)	11,97 (63,64)	36,43 ^{abc} (83,33) ^{ab}	70,00 ^{abcd} (85,71) ^b
Osso basoesfenoide pobremente calcificado	10,38 (36,36)	18,32 (81,82)	23,08 ^a (81,82)	41,86 ^{abc} (83,33) ^a	70,00 ^{abcd} (85,71)
Osso hamulus pobremente calcificado	2,83 (18,18)	6,87 (36,36)	15,38 ^{ab} (63,64)	37,21 ^{abc} (83,33) ^{ab}	71,67 ^{abcd} (85,71) ^a
Osso pterigóide pobremente calcificado	2,83 (18,18)	9,16 (54,55)	15,38 ^a (63,64)	36,43 ^{abc} (75,00) ^a	71,67 ^{abcd} (85,71) ^a
Mandíbula pobremente calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	16,28 ^{abc} (50,00) ^{ab}	98,33 ^{abcd} (100,00) ^{abcd}

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos alterados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 250 mg/kg; c \neq 300 mg/kg; d \neq 400 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Coluna Vertebral:

A exposição *in utero* a HU aumentou as incidências de várias alterações nos ossos da coluna, incluindo malformações estruturais permanentes (ossos com forma irregular, curtos, fundidos ou desalinhados) e variações (ossificação incompleta, corpos vertebrais divididos, centros de ossificação de corpos vertebrais em forma de *dumb-bell*, interrupção do processo de fechamento de corpos vertebrais, vértebra lombar extra, ossos não calcificados, ou ossos pobremente calcificados). (Tabelas 4.1.6 e 4.1.7).

A Tabela 4.1.6 mostra que a administração das duas maiores doses de HU (400 e 500 mg/kg) causou um aumento da frequência de fetos com arcos vertebrais lombares adjacentes fundidos, enquanto os aumentos das incidências das demais fusões, registradas nas regiões lombar e sacral, ocorreram somente com maior dose testada. A indução do aparecimento de arcos vertebrais sacrais com formas irregulares pela HU, embora tenha sido observada em todas as doses, ocorreu de maneira homogênea, a partir de 300 mg/kg.

Aumentos significativos, das incidências de atlas mais curto e de corpos vertebrais sacrais desalinhados, foram observados apenas com a maior dose testada. Por outro lado, houve um aumento dose-dependente, a partir de 400 mg/kg de HU, das frequências de corpos vertebrais lombares desalinhados.

Todas as doses testadas de HU provocaram aumentos uniformes da incidência de adição de 1 vértebra na coluna lombar. Essa alteração é considerada uma variação, apesar de seu caráter permanente. (KHERA, 1981; SOLECKI *et al.*, 2001).

O tratamento com HU induziu a ocorrência de corpos vertebrais divididos, bem como de centros de ossificação de corpos vertebrais torácicos e lombares em forma de *dumb-bell*. As frequências de corpos vertebrais torácicos e lombares divididos assimetricamente aumentaram significativamente, em relação aos controles, nas doses de 400 e 500 mg/kg. Em todas as doses de HU testadas, as incidências de centros de ossificação de corpos vertebrais torácicos em forma de *dumb-bell* aumentaram significativamente, sendo que, a partir de 400 mg/kg, este aumento foi dose-dependente; em corpos vertebrais lombares, os aumentos das incidências dessa ocorrência, foram registrados nas doses de 300 a 500 mg/kg.

O aumento da incidência de outras alterações esqueléticas indicativas de retardo do desenvolvimento ósseo foi também registrado. As frequências de “Interrupção do processo de fechamento” de corpos vertebrais torácicos aumentaram significativamente em todas as doses de HU testadas, em relação ao grupo controle, enquanto nos corpos vertebrais lombares, esta variação ocorreu de maneira dose-dependente, a partir de 400 mg/kg. A incidência de

ossificação incompleta de arcos vertebrais cervicais aumentou significativamente na maior dose.

A Tabela 4.1.7 mostra o estado de mineralização dos ossos da coluna vertebral. De um modo geral, houve um aumento dose-dependente de vértebras e de corpos vertebrais não calcificados e pobremente calcificados.

A HU aumentou a proporção de fetos apresentando vértebras pobremente calcificadas (cervicais, torácicas, sacrais e caudais), bem como corpos vertebrais sacrais e vértebras caudais não calcificados. Em todas as situações, o aumento observado ocorreu de maneira dose dependente, a partir de 400 mg/kg, exceto em relação às incidências de vértebras torácicas pobremente calcificadas, e de corpos vertebrais sacrais não calcificados, cujas frequências aumentaram a partir de 300 mg/kg, ou somente na maior dose testada. Com exceção das ocorrências de vértebras caudais e sacrais pobremente ossificadas, cujos controles apresentaram frequências espontâneas relativamente altas (aproximadamente 17,0% e 38,0%, respectivamente), as incidências espontâneas para as demais variações foram mais baixas, variando entre 0,0% a 8,5%.

O NOEL estabelecido, tanto para malformações, quanto para variações observadas nos ossos da coluna vertebral foi < 250 mg/kg.

Tabela 4.1.6: Tipos e frequências de anomalias dos ossos da coluna vertebral, induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg, ip)				
	0	250	300	400	500
<i>Fetos vivos (N)</i>	106	131	117	129	60
<i>Ninhadas (N)</i>	11	11	11	12	7
<i>Malformações (%):</i>					
Atlas mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,00 ^{abcd} (14,29)
Forma irregular do axis	4,72 (27,27)	19,85 ^a (72,73)	14,53 ^a (36,36)	9,30 ^b (16,67) ^b	13,33 (28,57)
Ossificação incompleta de 1-6 arcos vertebrais cervicais	0,00 (0,00)	0,76 (9,09)	3,42 (18,18)	3,88 (16,67)	18,33 ^{abcd} (28,57)
Interrupção processo de fechamento de 1-13 corpos vertebrais torácicos	3,77 (27,27)	12,21 ^a (54,55)	11,11 ^a (54,55)	33,33 ^{abc} (75,00) ^a	46,67 ^{abc} (85,71) ^a
1-2 corpos vertebrais torácicos divididos assimetricamente	0,00 (0,00)	1,53 (18,18)	0,85 (9,09)	6,20 ^{ac} (41,67) ^a	11,67 ^{abc} (42,86) ^a
Centros de ossific. de 1-6 corpos vertebrais torácicos em forma de <i>dumb-bell</i>	0,94 (9,09)	13,74 ^a (72,73) ^a	6,84 ^a (45,45)	24,81 ^{abc} (75,00) ^a	45,00 ^{abcd} (85,71) ^a
Fusão entre 2-6 arcos vertebrais lombares adjacentes	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,20 ^{abc} (33,33)	18,33 ^{abc} (57,14) ^{abc}
Fusão de 1 arco vertebral lombar com 1 arco sacral adjacente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	8,33 ^{abcd} (28,57)
Fusão entre 2 corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,55 (8,33)	6,67 ^{abc} (28,57)
Interrupção processo de fechamento de 1-6 corpos vertebrais lombares	1,89 (9,09)	3,05 (27,27)	0,85 (9,09)	10,08 ^{abc} (58,33) ^{ac}	28,33 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Centros de ossific.de 1-2 corpos vertebrais lombares em forma de <i>dumb-bell</i>	0,00 (0,00)	2,29 (18,18)	7,69 ^a (36,36)	4,65 ^a (50,00) ^a	13,33 ^{ab} (57,14) ^a
1-2 corpos vertebrais lombares divididos assimetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	5,43 ^{ab} (33,33)	15,00 ^{abcd} (28,57)
1-7 corpos vertebrais lombares desalinhados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,43 ^{abc} (25,00)	21,67 ^{abcd} (42,86) ^{abc}
Adição de 1 vértebra na coluna lombar	0,00 (0,00)	6,11 ^a (45,45) ^a	8,55 ^a (36,36)	6,20 ^a (25,00)	6,67 ^a (14,29)

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos malformados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 250 mg/kg; c \neq 300 mg/kg; d \neq 400 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente. Ossific.: ossificação.

(Cont.) Tabela 4.1.6: Tipos e frequências de anomalias dos ossos da coluna vertebral, induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg, ip)				
	0	250	300	400	500
<i>Fetos vivos (N)</i>	106	131	117	129	60
<i>Ninhadas (N)</i>	11	11	11	12	7
<i>Alterações (%)</i>					
Forma irregular de 1-2 arcos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	21,37 ^a (81,82) ^a	42,74 ^{ab} (72,73) ^a	34,11 ^{ab} (83,33) ^a	41,67 ^{ab} (71,43) ^a
Fusão entre 2-4 arcos vertebrais sacrais adjacentes	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	0,00 (0,00)	31,67 ^{abcd} (57,14) ^{abcd}
Fusão entre 1-4 corpos vertebrais sacrais adjacentes	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	8,33 ^{abcd} (42,86) ^{abcd}
Ossificação unilateral do corpo de 1-4 vértebras sacrais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,00 ^{abcd} (14,29)
1-4 corpos vertebrais sacrais divididos assimetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,67 ^{abcd} (42,86) ^{abcd}
1-4 corpos vertebrais sacrais desalinhados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	8,33 ^{abcd} (28,57)

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos malformados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 250 mg/kg; c \neq 300 mg/kg; d \neq 400 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Tabela 4.1.7: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos da coluna vertebral, induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg, <i>ip</i>)				
	0	250	300	400	500
<i>Fetos vivos (N)</i>	106	131	117	129	60
<i>Ninhadas (N)</i>	11	11	11	12	7
<i>Alterações (%)</i>					
Todas as 7 vértebras cervicais pobremente calcificadas	2,83 (18,18)	5,34 (36,36)	5,98 (36,36)	31,78 ^{abc} (66,67) ^{abc}	66,67 ^{abcd} (85,71) ^a
1-13 vértebras torácicas pobremente calcificadas	2,83 (18,18)	6,11 (36,36)	10,26 ^a (54,55)	37,21 ^{abc} (83,33) ^{ab}	70,00 ^{abcd} (85,71) ^a
1-6 vértebras lombares pobremente calcificadas	8,49 (45,45)	12,21 (81,82)	15,38 (63,64)	42,64 ^{abc} (83,33)	71,67 ^{abcd} (85,71)
1-4 corpos vertebrais sacrais não calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	5,00 ^{abc} (28,57)
1-4 vértebras sacrais pobremente calcificadas	16,98 (63,64)	19,85 (90,91)	27,35 (72,73)	56,59 ^{abc} (91,67)	75,00 ^{abcd} (85,71)
1-2 vértebras caudais não calcificadas	0,94 (9,09)	5,34 (45,45)	9,40 (36,36)	16,28 ^{ab} (66,67) ^a	28,33 ^{abc} (57,14) ^a
1-2 vértebras caudais pobremente calcificadas	37,74 (90,91)	33,59 (90,91)	38,46 (81,82)	62,79 ^{abc} (100,00) ^a	70,00 ^{abc} (71,43) ^a

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos alterados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 250 mg/kg; c \neq 300 mg/kg; d \neq 400 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Costela:

Como mostrado na Tabela 4.1.8 e no Anexo 10, a HU induziu o aparecimento de poucos tipos de defeitos nas costelas.

A HU provocou um aumento pequeno, mas significativo, da proporção de fetos com costelas fundidas, na dose de 400 mg/kg (5,4%), em relação à observada no grupo controle (0,0%). Além disso, todas as doses de HU administradas provocaram aumentos equivalentes da ocorrência de costelas mais curtas em relação ao grupo controle (frequência = 6,6%), resultando nas frequências de 26,0%, 20,5%, 24,8% e 26,7% (nas doses de 250, 300 400 e 500 mg/kg). Ambas as anomalias morfológicas são classificadas como malformações.

As incidências de costelas extras, cervicais e lombares, diminuíram com a administração de HU, em relação às registradas nos controles. As diminuições dessa ocorrência nas costelas lombares foram homogêneas, e significativas apenas nas doses de 250 e 400 mg/kg. As frequências espontâneas de costelas cervicais e lombares, observadas no grupo controle foram altas, correspondendo a aproximadamente 11,3% e 50,0%, respectivamente.

De acordo com a Tabela 4.1.9, a HU provocou um aumento dose-dependente da proporção de fetos apresentando até 13 costelas pobremente calcificadas, a partir de 400 mg/kg.

O NOEL estabelecido, tanto para malformações, quanto para variações observadas nos ossos da costela foi < 250 mg/kg.

Tabela 4.1.8: Tipos e frequências de anomalias da costela induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg, ip)				
	0	250	300	400	500
<i>Fetos vivos (N)</i>	106	131	117	129	60
<i>Ninhadas (N)</i>	11	11	11	12	7
<i>Malformações (%):</i>					
Fusão entre 2 costelas	0,00 (0,00)	0,76 (9,09)	1,71 (18,18)	5,43 ^{ab} (50,00) ^a	1,67 (14,29)
1 a 13 costelas mais curtas	6,60 (27,27)	25,95 ^a (63,64)	20,51 ^a (54,55)	24,8 ^a (83,33) ^a	26,67 ^a (41,67)
Costela extra rudimentar na coluna cervical	11,32 (54,55)	1,53 ^a (9,09)	0,00 (0,00) ^a	2,33 ^a (25,00)	0,00 ^a (0,00) ^a
Costela extra na coluna lombar	50,00 (90,91)	36,64 ^a (90,91)	38,46 (90,91)	24,03 ^{abc} (66,67)	36,67 (41,67)

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos malformados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 250 mg/kg; c \neq 300 mg/kg; d \neq 400 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Tabela 4.1.9: Tipos e frequências de alterações da ossificação da costela induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg, ip)				
	0	250	300	400	500
<i>Fetos vivos (N)</i>	106	131	117	129	60
<i>Ninhadas (N)</i>	11	11	11	12	7
<i>Alterações (%)</i>					
1-13 costelas pobremente calcificadas	3,77 (27,27)	7,63 (45,45)	10,26 (45,45)	38,76 ^{abc} (91,67) ^{abc}	61,67 ^{abcd} (50,00)

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos malformados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 250 mg/kg; c \neq 300 mg/kg; d \neq 400 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Esterno:

A Tabela 4.1.10 mostra as anomalias morfológicas dos ossos do esterno, e a Tabela 4.1.11. apresenta as alterações na ossificação (variações) observadas.

Podemos observar que a exposição à HU aumentou significativamente a incidência de algumas malformações estruturais (esterno deslocado e forma irregular da 1ª esternebra), e diminuiu a incidência de outras que apareceram na 5ª esternebra, quando comparadas às observadas no grupo controle.

Todas as doses de HU aumentaram, de maneira equivalente, os percentuais de fetos com esterno deslocado, enquanto as ocorrências de “forma irregular da 1ª esternebra” aumentaram nas duas maiores doses (400 e 500 mg/kg).

Houve uma diminuição significativa da incidência da 5ª esternebra com forma irregular, na maior dose testada (500 mg/kg), enquanto foram observadas reduções equivalentes (nas doses de 250 a 500 mg/kg) da ocorrência “5ª esternebra menor, que são anomalias classificadas como malformações. As frequências observadas nos controles para essas alterações foram, respectivamente, 51,9% e 36,8%.

A Tabela 4.1.11 mostra que a HU diminuiu significativamente, e de maneira dose-dependente, a proporção de fetos apresentando a 6ª esternebra pobremente calcificada (com 400 e 500 mg/kg), tendo também diminuído a proporção de ninhadas afetadas, quando testada na dose de 500 mg/kg. Dentro do grupo controle, a proporção de fetos apresentando essa anomalia foi altíssima [70,8% (100,00%) para total de fetos e de ninhadas, respectivamente]. Entretanto, a frequência de fetos apresentando “todas” as esternebbras pobremente calcificadas aumentou de modo dose-dependente, a partir de 300 mg/kg.

O NOEL estabelecido, para malformações dos ossos do esterno foi < 250 mg/kg, enquanto que para variações foi de 250 mg/kg.

Tabela 4.1.10: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do esterno induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg, ip)				
	0	250	300	400	500
<i>Fetos vivos (N)</i>	106	131	117	129	60
<i>Ninhadas (N)</i>	11	11	11	12	7
<i>Malformações (%):</i>					
Esterno deslocado	1,89 (18,18)	14,50 ^a (81,82) ^a	15,38 ^a (45,45)	13,95 ^a (67,67) ^a	23,33 ^a (71,43) ^a
Forma irregular da 1 ^a esternebra	0,00 (0,00)	1,53 (9,09)	0,00 (0,00)	6,20 ^{ac} (41,67) ^{ac}	5,00 ^{ac} (28,57)
Forma irregular da 5 ^a esternebra	51,89 (100,00)	44,27 (90,91)	54,70 (100,00)	42,64 (91,67)	21,67 ^{abcd} (71,43)
5 ^a esternebra menor	36,79 (90,91)	16,79 ^a (90,91)	17,09 ^a (100,00)	22,48 ^a (75,00)	21,67 ^a (71,43)

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos malformados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 250 mg/kg; c \neq 300 mg/kg; d \neq 400 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Tabela 4.1.11: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos do esterno induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg, ip)				
	0	250	300	400	500
<i>Fetos vivos (N)</i>	106	131	117	129	60
<i>Ninhadas (N)</i>	11	11	11	12	7
<i>Alterações (%):</i>					
4 ^a esternebra pobremente calcificada	5,66 (36,36)	9,16 (63,64)	14,53 ^a (72,73)	10,85 (66,67)	11,67 (42,86)
6 ^a esternebra pobremente calcificada	70,75 (100,00)	64,89 (100,00)	69,23 (100,00)	53,49 ^{ac} (91,67)	30,00 ^{abcd} (42,86) ^{abcd}
Todas as esternebras pobremente	2,83 (27,27)	5,34 (27,27)	13,68 ^{ab} (54,55)	33,33 ^{abc} (83,33) ^{ab}	56,67 ^{abcd} (71,43)

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos alterados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 250 mg/kg; c \neq 300 mg/kg; d \neq 400 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

4.1.1.2.2 - ESQUELETO APENDICULAR:

4.1.1.2.2.1 – MEMBROS ANTERIORES:

Dos ossos dos membros anteriores, os efeitos teratogênicos da HU atingiram somente as patas dianteiras, e incluíram anomalias classificadas como malformações (ausência, alterações na forma e tamanho) e variações (buraco no osso e alterações na ossificação).

A Tabela 4.1.12 mostra que a maior dose testada de HU (500 mg/kg) provocou aumento significativo das incidências de algumas malformações, incluindo as ocorrências “ausência do processo deltoide”, “processo deltoide menor”, e “falanges proximais do 3º dedo menores”. Além disso, as ocorrências de 5º metacarpo menor aumentaram de maneira dose dependente, a partir da dose de 400 mg/kg.

Por outro lado, a maior dose de HU causou a diminuição das frequências de fetos apresentando buraco no úmero, forma irregular do processo deltoide e falanges proximais do 5º dedo menores, em comparação com os controles. Nesses casos, as frequências espontâneas para essas anomalias, observadas no grupo controle e com 500 mg/kg de HU foram, respectivamente: 20,8% e 8,3%; 11,3% e 1,7%; 34,9% e 11,7%. Com exceção da presença de “buraco” no úmero, e de ossos (falanges) menores, que podem ser classificado como malformação, ou variação, as demais alterações são consideradas malformações (SOLECKI, *et al.*, 2001).

A Tabela 4.1.13 mostra que a HU causou retardo da ossificação de inúmeros ossos das patas dianteiras, em alguns casos de maneira dose-dependente, tendo aumentado as ocorrências de ossos pobremente calcificados e não calcificados, incluindo ossos longos como úmero, ulna e rádio. A mineralização de ossos da cinta peitoral (clavícula e escápula) também foi alterada.

De acordo com a Tabela 4.1.13, aumentos significativos nas proporções de fetos apresentando somente um dos metacarpos pobremente calcificados foram observados com a maior dose. Além disso, as maiores doses de HU aumentaram as incidências de falanges proximais pobremente calcificadas, ou não calcificadas, exceto para as ocorrências de falanges proximais do 2º e 5º dedos pobremente calcificadas. No caso dessas ocorrências, o tratamento com HU diminuiu de uma maneira homogênea, as frequências observadas nos grupos controles, cujas incidências espontâneas foram 67,0% e 81,1%, respectivamente.

O tratamento com as maiores doses de HU causou também, um aumento significativo, e dose-relacionado, de fetos apresentando clavícula, escápula, úmero, ulna e rádio pobremente

calcificados, apesar de não terem sido registrados quaisquer malformações estruturais permanentes nesses ossos.

O NOEL estabelecido, para malformações dos ossos dos membros anteriores foi 250 mg/kg, enquanto para variações foi < 250 mg/kg.

Tabela 4.1.12: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros anteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no dia DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg, <i>ip</i>)				
	0	250	300	400	500
<i>Fetos vivos (N)</i>	106	131	117	129	60
<i>Ninhadas (N)</i>	11	11	11	12	7
<i>Malformações (%):</i>					
Buraco no úmero	20,75 (81,82)	20,61 (81,82)	20,51 (90,91)	17,83 (83,33)	8,33 ^{ab} (42,86) ^c
Ausência do processo deltoide	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	10,00 ^{abcd} (57,14) ^{abcd}
Forma irregular do processo deltoide	11,32 (63,64)	16,79 (54,55)	20,51 (54,55)	10,85 (41,67)	1,67 ^{abcd} (14,29)
Processo deltoide menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,55 (16,67)	6,67 ^{abc} (28,57)
5° Metacarpo menor	0,94 (9,09)	0,00 (0,00)	4,27 ^b (27,27)	12,40 ^{abc} (41,46) ^b	25,00 ^{abcd} (71,43) ^{ab}
Falange proximal do 3° dedo menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	5,00 ^{abc} (28,57)
Falange proximal do 5° dedo menor	34,91 (90,91)	25,19 (100,00)	27,35 (81,82)	41,86 ^{bc} (91,67)	11,67 ^{abcd} (57,14) ^b

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos malformados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 250 mg/kg; c \neq 300 mg/kg; d \neq 400 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Tabela 4.1.13: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos dos membros anteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, DG 11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg, ip)				
	0	250	300	400	500
<i>Fetos vivos (N)</i>	106	131	117	129	60
<i>Ninhadas (N)</i>	11	11	11	12	7
<i>Alterações (%)</i>					
Clavícula pobremente calcificada	2,83 (18,18)	3,82 (27,27)	4,27 (27,27)	23,26 ^{abc} (66,67) ^a	65,00 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Escápula pobremente calcificada	2,83 (18,18)	3,82 (27,27)	4,27 (27,27)	23,26 ^{abc} (66,67) ^a	65,00 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Úmero pobremente calcificado	1,89 (9,09)	3,82 (27,27)	4,27 (27,27)	23,26 ^{abc} (66,67) ^a	65,00 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Ulna pobremente calcificada	1,89 (9,09)	3,82 (27,27)	4,27 (27,27)	23,26 ^{abc} (66,67) ^a	65,00 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Osso rádio pobremente calcificado	1,89 (9,09)	3,82 (27,27)	4,27 (27,27)	23,26 ^{abc} (66,67) ^a	66,67 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Metacarpos pobremente calcificados	0,00 (0,00)	4,58 ^a (27,27)	2,56 (9,09)	19,38 ^{abc} (41,67) ^a	31,67 ^{abc} (71,43) ^{ac}
2º metacarpo pobremente calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	3,10 (25,00)	8,33 ^{abc} (42,86) ^{ab}
3º metacarpo pobremente calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	3,10 (25,00)	8,33 ^{abc} (42,86) ^{ab}
4º metacarpo pobremente calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	3,10 (25,00)	8,33 ^{abc} (42,86) ^{ab}
5º metacarpo pobremente calcificado	4,72 (36,36)	3,05 (27,27)	7,69 (45,45)	6,20 (33,33)	23,33 ^{abcd} (71,43)
Falange proximal do 2º dedo não calcificada	0,94 (9,09)	14,50 ^a (54,55)	17,95 ^a (81,82) ^a	9,30 ^a (58,33) ^a	28,33 ^{abd} (85,71) ^a
Falange proximal do 5º dedo não calcificada	9,43 (72,73)	29,77 ^a (81,82)	29,91 ^a (90,91)	19,38 ^a (75,00)	40,00 ^{ad} (85,71)
Falanges proximais pobremente calcificadas	1,89 (18,18)	4,58 (27,27)	0,85 (9,09)	12,40 ^{abc} (58,33) ^c	11,67 ^{abc} (42,86)
Falange proximal do 2º dedo pobremente calcificada	66,98 (100,00)	56,49 (100,00)	49,57 ^a (90,91)	53,49 ^a (91,67)	41,67 ^a (71,43)
Falange proximal do 3º dedo pobremente calcificada	8,49 (54,55)	17,56 (81,82)	17,95 ^a (81,82)	20,93 ^a (75,00)	43,33 ^{abcd} (85,71)
Falange proximal do 4º dedo pobremente calcificada	9,43 (54,55)	19,85 ^a (72,73)	17,95 (81,82)	20,16 ^a (75,00)	41,67 ^{abcd} (85,71)
Falange proximal do 5º dedo pobremente calcificada	81,13 (100,00)	56,49 ^a (100,00)	55,56 ^a (100,00)	60,47 ^a (91,67)	43,33 ^{ad} (85,71)

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos alterados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 250 mg/kg; c \neq 300 mg/kg; d \neq 400 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

4.1.1.2.2.2 – MEMBROS POSTERIORES:

A Tabela 4.1.14 apresenta os dados de anomalias, classificadas como malformações, registradas no esqueleto apendicular posterior.

De acordo com os dados apresentados nesta tabela, a administração da maior dose de HU (500 mg/kg) causou aumentos significativos das incidências de malformações estruturais permanentes em ossos da cinta pélvica e das patas traseiras, em relação ao grupo controle, como: ísquio torto; tíbia curta; posição irregular da fíbula; ausência do primeiro dedo da(s) pata(s) traseira(s).

Os perfis das curvas dose-resposta da HU, observado para as ocorrências de falanges proximais menores foi variado. Por exemplo, a incidência de falanges proximais do 2º dedo menores aumentou significativamente na dose 400 mg/kg, em relação ao grupo controle, mas diminuiu na dose de 500 mg/kg. Quanto à ocorrência “falange proximal do 3º dedo menor”, houve um aumento da frequência dessa anomalia na menor dose (250 mg/kg), seguido por uma diminuição na dose seguinte, por mais um aumento significativo na dose de 400 mg/kg, e pelo seu completo desaparecimento na maior dose. Já a frequência de falanges proximais do 4º dedo menores aumentou significativamente com 400 mg/kg de HU, em relação ao grupo tratado com 300 mg/kg e ao grupo controle.

A Tabela 4.1.15 mostra o estado de ossificação dos ossos do esqueleto apendicular posterior.

Podemos observar que a HU causou um aumento significativo, e dose-dependente, da frequência de variações, (retardos na ossificação) em ossos longos das patas traseiras, e em ossos do cinturão pélvico. Os aumentos de ossos pobremente calcificados foram detectados em fetos tratados com doses a partir 250 mg/kg (fêmur e fíbula), ou 300 mg/kg (tíbia, ílio, ísquio e púbis).

A HU aumentou de maneira dose-dependente, as incidências do 1º metatarso e de falanges proximais não calcificados, bem como as do 2º ao 5º metatarsos pobremente calcificados (a partir de 400 mg/kg), em relação aos controles. Também foi detectado um aumento significativo da proporção de fetos com “todos” os metatarsos pobremente calcificados, mas apenas nas doses de 250 mg/kg e de 500 mg/kg.

No caso do 1º metatarso pobremente calcificado, podemos observar uma curva dose-resposta negativa: a frequência observada no grupo controle, que já era relativamente alta (27,4%), diminuiu significativamente em todos os grupos tratados, a partir da dose de 250 mg/kg (frequência: 8,4%), porém essas diminuições foram progressivamente menores nas

doses subsequentes (frequências de 17,1%, 25,6% e 21,7%, nas doses de 300, 400 e 500 mg/kg, respectivamente)..

O tratamento com HU aumentou significativamente a proporção de fetos com “todas” as falanges proximais não calcificadas, de modo dose-dependente, a partir de 300 mg/kg, em relação ao controle. Por outro lado, a maior dose testada (500 mg/kg) provocou a diminuição das incidências de “falanges do 5º dedo não calcificadas”, “todas as falanges pobremente calcificadas”, “falanges do 2º dedo pobremente calcificadas”. Além disso, todas as doses de HU testadas provocaram diminuições equivalentes na incidência de falanges do 5º dedo pobremente calcificadas. As frequências de falanges do 3º e 4º dedos pobremente calcificados aumentaram nas doses de 250 mg/kg e 400 mg/kg, em relação aos controles, e uma diminuição significativa na dose de 500 mg/kg, em relação às menores doses de HU. Nos casos em que administração de HU causou algum efeito protetor (aumento da ossificação), as incidências espontâneas dos controles variam entre 6,6% a 45,3%.

O NOEL estabelecido, para malformações e variações dos ossos dos membros posterior foi < 250 mg/kg.

Tabela 4.1.14: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros posteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg, ip)				
	0	250	300	400	500
<i>Fetos vivos (N)</i>	106	131	117	129	60
<i>Ninhadas (N)</i>	11	11	11	12	7
<i>Malformações (%)</i>					
Ísquio torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	11,67 ^{abcd} (42,86) ^{abcd}
Tíbia mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,33 (16,67)	5,00 ^{abc} (28,57)
Posição irregular da fíbula	0,00 (0,00)	0,76 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	11,67 ^{abcd} (28,57)
1º metatarso menor	13,21 (45,45)	8,40 (27,27)	7,69 (36,36)	36,43 ^{abc} (91,67) ^{abc}	23,33 ^{bc} (57,14)
Ausência do 1º dedo da pata traseira	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,10 (16,67)	5,00 ^{abc} (42,86) ^{abc}
Falange proximal do 2º dedo menor	4,72 (18,18)	9,92 (45,45)	5,13 (36,36)	13,18 ^{ac} (50,00)	0,00 ^{bd} (0,00) ^d
Falange proximal do 3º dedo menor	0,00 (0,00)	6,87 ^a (45,45) ^a	1,71 (18,18)	7,75 ^{ac} (41,67) ^a	0,00 ^d (0,00)
Falange proximal do 4º dedo menor	0,94 (9,09)	4,58 (27,27)	0,85 (9,09)	6,20 ^{ac} (41,67)	0,00 (0,00)

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos malformados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 250 mg/kg; c \neq 300 mg/kg; d \neq 400 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Tabela 4.1.15: Tipos e frequências de alterações na ossificação dos ossos dos membros posteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg, ip)				
	0	250	300	400	500
<i>Fetos vivos (N)</i>	106	131	117	129	60
<i>Ninhadas (N)</i>	11	11	11	12	7
<i>Alterações (%):</i>					
Ílio pobremente calcificado	8,49 (45,45)	15,27 (72,73)	19,66 ^a (63,64)	47,29 ^{abc} (91,67) ^a	70,00 ^{abcd} (85,71)
Ísquio pobremente calcificado	8,49 (45,45)	15,27 (72,73)	19,66 ^a (63,64)	47,29 ^{abc} (91,67) ^a	70,00 ^{abcd} (85,71)
Pubis pobremente calcificado	8,49 (45,45)	15,27 (72,73)	19,66 ^a (63,64)	47,29 ^{abc} (91,67) ^a	70,00 ^{abcd} (85,71)
Fêmur pobremente calcificado	8,49 (45,45)	15,27 (72,73)	19,66 ^a (63,64)	47,29 ^{abc} (91,67) ^a	70,00 ^{abcd} (85,71)
Fíbula pobremente calcificada	8,49 (45,45)	15,27 (72,73)	19,66 ^a (63,64)	47,29 ^{abc} (91,67) ^a	70,00 ^{abcd} (85,71)
Tíbia pobremente calcificada	8,49 (45,45)	15,27 (72,73)	19,66 ^a (63,64)	47,29 ^{abc} (91,67) ^a	70,00 ^{abcd} (85,71)
Metatarsos não calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	31,78 ^{abc} (75,00) ^{abc}	0,00 ^d (0,00) ^d
1° metatarso não calcificado	4,72 (45,45)	1,53 (18,18)	11,97 ^b (63,64)	13,95 ^{ab} (83,33) ^b	46,67 ^{abcd} (85,71) ^b
Metatarsos pobremente calcificados	1,89 (9,09)	22,14 ^a (72,73) ^a	6,84 ^b (45,45)	0,00 ^{bc} (0,00) ^{bc}	21,67 ^{acd} (71,43) ^{ad}
1° metatarso pobremente calcificado	27,36 (81,82)	8,40 ^a (36,36)	17,09 ^a (72,73)	25,58 ^{ab} (83,33) ^b	21,67 ^{ab} (71,43)
2° metatarso pobremente calcificado	3,77 (36,36)	0,76 (9,09)	8,55 ^b (54,55)	13,95 ^{ab} (58,33) ^b	51,67 ^{abcd} (85,71) ^b
3° metatarso pobremente calcificado	3,77 (36,36)	0,76 (9,09)	8,55 ^b (54,55)	13,95 ^{ab} (58,33) ^b	51,67 ^{abcd} (85,71) ^b
4° metatarso pobremente calcificado	3,77 (36,36)	0,76 (9,09)	8,55 ^b (54,55)	13,95 ^{ab} (58,33) ^b	51,67 ^{abcd} (85,71) ^b
5° metatarso pobremente calcificado	3,77 (36,36)	0,76 (9,09)	8,55 ^b (54,55)	13,95 ^{ab} (58,33) ^b	51,67 ^{abcd} (85,71) ^b

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos alterados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 250 mg/kg; c \neq 300 mg/kg; d \neq 400 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

(Cont.) Tabela 4.1.15: Tipos e frequências de alterações na ossificação dos ossos dos membros posteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg, ip)				
	0	250	300	400	500
<i>Fetos vivos (N)</i>	106	131	117	129	60
<i>Ninhadas (N)</i>	11	11	11	12	7
<i>Alterações (%):</i>					
Falanges proximais não calcificadas	6,60 (27,27)	13,74 (81,82) ^a	25,64 ^{ab} (81,82) ^a	35,66 ^{ab} (83,33) ^a	61,67 ^{abcd} (85,71) ^a
Falange proximal do 5º dedo não calcificada	35,85 (100,00)	51,91 ^a (100,00)	40,17(81,82)	44,96 (83,33)	13,33 ^{abcd} (42,86)
Falanges proximais pobremente calcificadas	6,60 (45,45)	6,87 (45,45)	2,56 (27,27)	1,55 (16,67)	0,00 ^a (0,00)
Falange proximal do 2º dedo pobremente calcificada	35,85 (81,82)	33,59 (90,91)	27,35 (81,82)	27,13 (91,67)	15,00 ^{ab} (42,86)
Falange proximal do 3º dedo pobremente calcificada	17,92 (81,82)	35,11 ^a (100,00)	24,79 (72,73)	34,11 ^a (75,00)	11,67 ^{bcd} (42,86)
Falange proximal do 4º dedo pobremente calcificada	18,87 (90,91)	35,11 ^a (100,00)	27,35 (81,82)	34,11 ^a (75,00)	11,67 ^{bcd} (42,86)
Falange proximal do 5º dedo pobremente calcificada	45,28 (90,91)	24,43 ^a (63,64)	24,79 ^a (72,73)	17,05 ^a (66,67)	20,00 ^a (28,57)

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos alterados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 250 mg/kg; c \neq 300 mg/kg; d \neq 400 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

4.1.2 - DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE DOSES DE 6-MP ADMINISTRADAS A RATAS NO DG11 E OS EFEITOS EMBRIOTÓXICOS EM RATOS (DG21).

4.1.2.1 – TOXICIDADE MATERNA, PERDAS GESTACIONAIS, PESO DO FETO E DA PLACENTA, E ANORMALIDADES MORFOLÓGICAS DETECTADAS NO EXAME EXTERNO.

O ganho de peso materno durante a gravidez, o peso do útero gravídico no DG21 e o número de sítios de implantação estão mostrados na Tabela 4.1.16. Os parâmetros analisados por ocasião da cesárea, tais como perdas gestacionais pós-implantação (reabsorções e fetos mortos), tamanho das ninhadas, peso das placentas, peso fetal (DG21), e proporção de fetos com malformações detectadas pelo exame externo são mostrados na Tabela 4.1.17.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.1.16, as doses de 12 e 24 mg/kg de 6-MP causaram uma diminuição equivalente do ganho de peso materno no DG 21-11, em relação ao grupo controle, o que também foi observado no DG 21-0 com a maior dose testada. Entretanto não foram detectadas diferenças nos ganhos de peso materno, quando da subtração do peso do útero gravídico do ganho total de peso materno durante a gestação (DG 21-0), indicando que a 6-MP não foi tóxica para a mãe. Além disso, a administração da maior dose de 6-MP (24 mg/kg), causou uma redução considerável (de 46,8%) no peso do útero gravídico, em relação ao grupo controle, o que explica as diminuições dos pesos maternos observadas.

Na tabela 4.1.17 pode ser observado, que as doses de 12 e 24 mg/kg provocaram um aumento dose-dependente na proporção de fetos malformados, e que a maior dose testada aumentou significativamente a proporção de fetos mortos por sítios de implantação. A 6-MP, a partir da menor dose (6 mg/kg), causou uma diminuição dose dependente dos pesos fetais e placentários (indivíduo e ninhada como unidades de análise). Foram também constatadas diminuições significativas das razões entre peso da placenta/peso fetal (indivíduo e ninhada como unidades de análise), nas doses de 6 a 24 mg/kg, em relação à registrada no grupo controle não tratado. A diminuição da relação peso da placenta/peso fetal, indicou que o efeito da 6-MP sobre o peso da placenta foi relativamente maior, do que sobre o peso fetal.

A redução do peso do útero gravídico (Tabela 4.1.16) possivelmente se deveu à redução de peso de fetos e das placentas e ao maior número de fetos mortos por sítios de implantação (perda gestacional).

Em suma, os resultados descritos na Tabela 4.1.16 e 4.1.17 indicaram que a 6-MP, até a maior dose testada (24 mg/kg):

- i) Não causou toxicidade materna.
- ii) Agiu sobre as placentas, reduzindo os seus pesos, o que pode ter contribuído, pelo menos em parte, para diminuição do peso dos embriões.
- iii) Agiu diretamente sobre os embriões, aumentando as taxas de reabsorção, a proporção de fetos mortos e a frequência do aparecimento de malformações fetais visíveis externamente, e diminuindo seus pesos.
- iv) Teve um efeito maior sobre o peso da placenta, do que sobre o peso fetal.
- v) Dentro da faixa de doses testadas, o NOAEL estabelecido para 6-MP para embriotoxicidade foi < 6 mg/kg.

Tabela 4.1.16: Ganho de peso durante a gravidez de ratas tratadas (DG11) com 6-MP.

PARÂMETROS AVALIADOS	6-MP (mg/kg, sc)			
	0	6	12	24
Fêmeas grávidas (N)	11	9	10	11
<i>Reabsorções (N)</i>				
Total (N)	16	5	14	9
Por sítios de implantação (%)	12,12	4,03 ^a	11,86 ^b	7,20
Por implantação por ninhada (%)	9,09 (12,86)	6,25 (7,14)	8,01 (22,69)	0,00 (20,00)
Peso do útero gravídico (g)	75,30 ± 15,58	82,90 ± 7,06	55,84 ± 24,35	40,06 ± 14,54 ^a
<i>Ganho de peso materno (Δg)</i>				
Dia 11-0	40,58 ± 8,76	47,75 ± 7,94	41,19 ± 9,07	35,18 ± 7,51
Dia 13-11	9,48 ± 1,72	9,42 ± 6,57	6,89 ± 5,78	10,97 ± 1,86
Dia 15-11	14,76 ± 5,44	14,17 ± 4,79	16,02 ± 9,72	14,00 ± 2,38
Dia 21-11	80,59 ± 11,45	85,25 ± 6,06	60,34 ± 25,59 ^{ab}	50,36 ± 14,92 ^{ab}
Dia 21-0	119,15 ± 14,73	131,02 ± 9,81	88,66 ± 33,48	79,14 ± 19,08 ^{ab}
Dia 21-0 - (peso do útero)	40,28 ± 7,74	45,57 ± 5,06	40,84 ± 12,15	45,02 ± 5,65

Os dados representados como medianas (Q1-Q3) foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. (Q3-Q1): amplitude interquartílica, calculada pela diferença entre o 3º (Q3) e o 1º quartil (Q1). Os dados representados como médias ± d.p foram analisados por ANOVA seguida por teste de Bonferroni. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ 0 mg/kg; b ≠ 6 mg/kg; c ≠ 12 mg/kg.

Tabela 4.1.17: Efeito embriotóxico do tratamento de ratas grávidas com 6-MP (DG11). Análise dos parâmetros obtidos por ocasião da cesária (DG21).

PARÂMETROS AVALIADOS	6-MP (mg/kg, sc)			
	0	6	12	24
Fêmeas grávidas (N)	11	9	10	11
<i>Sítios de Implantação</i>				
Total (N)	132	124	118	125
Por ninhada	11,00 (3,00)	14,00 (2,00)	12,50 (3,50)	12,00 (4,00)
<i>Reabsorções</i>				
Total (N)	16	5	14	9
Por sítios de implantação (%)	12,12	4,03 ^a	11,86 ^b	7,20
Por implantação por ninhada (%)	9,09 (12,86)	6,25 (7,14)	8,01 (22,69)	0,00 (20,00)
<i>Fetos mortos</i>				
Total (N)	0	0	2	10
Por sítios de implantação (%)	0,00	0,00	1,70	8,00 ^{abc}
Por ninhada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (1,00) ^{ab}
<i>Fetos vivos</i>				
Total (N)	116	119	102	106
Por sítios de implantação (%)	87,88	95,97 ^a	86,44 ^b	84,80 ^b
Por ninhada	10,00 (5,00)	13,00 (2,00)	10,50 (5,25)	11,00 (7,00)
Fetos malformados (%)	0,86	0,00	13,72 ^{ab}	83,01 ^{abc}
<i>Peso fetal</i>				
Individual (média ± d.p.)	4,83 ± 0,38	4,38 ± 0,42 ^a	3,74 ± 0,51 ^{ab}	2,45 ± 0,50 ^{abc}
Por ninhada (média ± d.p.)	4,84 ± 0,15	4,39 ± 0,33 ^a	3,70 ± 0,45 ^{ab}	2,45 ± 0,41 ^{abc}
<i>Peso das placentas (g)</i>				
Individual (média ± d.p.)	0,47 ± 0,08	0,30 ± 0,05 ^a	0,23 ± 0,03 ^{ab}	0,19 ± 0,04 ^{abc}
Por ninhada (média ± d.p.)	0,48 ± 0,06	0,30 ± 0,04 ^a	0,22 ± 0,02 ^{ab}	0,19 ± 0,03 ^{ab}
<i>Peso da placenta/peso fetal (%)</i>				
Individual (média ± d.p.)	9,92 ± 1,80	6,92 ± 0,95 ^a	6,02 ± 0,69 ^{ab}	7,47 ± 1,14 ^{abc}
Por ninhada (média ± d.p.)	10,01 ± 0,99	6,93 ± 0,72 ^a	6,11 ± 0,46 ^a	7,44 ± 0,40 ^a

Os dados representados como medianas (Q1-Q3) foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. (Q3-Q1): amplitude interquartilica, calculada pela diferença entre o 3º (Q3) e o 1º quartil (Q1). Os dados representados como médias ± d.p foram analisados por ANOVA seguida por teste de Bonferroni. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ 0 mg/kg; b ≠ 6 mg/kg; c ≠ 12 mg/kg..

4.1.2.1.1 – ANOMALIAS DETECTADAS NO EXAME EXTERNO:

As malformações visíveis ao exame externo induzidas pela 6-MP, e suas respectivas frequências estão apresentadas na Tabela 4.1.18

A partir de 12 mg/kg, houve um aumento dose-relacionado da frequência de fetos apresentando polidactilia nas patas traseiras e protusão da língua. Além disso, a maior dose de 6-MP (24 mg/kg) aumentou substancialmente a proporção de fetos e de ninhadas apresentando defeitos nas patas traseiras e dianteiras (patas com posicionamento irregular, ausência de um dedo e 1º dedo maior), na cauda (ponta de cauda e cauda curta e encrespada), e na mandíbula (micrognatia).

O NOEL da 6-MP estabelecido para indução de malformações externas fetais foi de 6 mg/kg.

A Figura 4.1 ilustra algumas malformações externas induzidas pela 6-MP.

Tabela 4.1.18: Tipos e frequências de anomalias detectadas pelo exame externo na prole (DG21) de ratas que receberam tratamento 6-MP durante a gravidez (DG11).

PARÂMETROS AVALIADOS	6-MP (mg/kg, sc)			
	0	6	12	24
Fetos vivos (N)	116	119	102	106
Ninhadas (N)	11	9	9	10
<i>Malformações (%)</i> :				
Posição irregular PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	39,62 ^{abc} (90,00) ^{abc}
Posição irregular PDE e/ou PDD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	15,09 ^{abc} (40,00) ^{abc}
Ausência de 1 dedo PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	11,32 ^{abc} (50,00) ^{abc}
Ausência de 1 dedo PDE e/ou PDD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	11,32 ^{abc} (40,00) ^{abc}
Posição irregular do 1º dedo PTs	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,96 (11,11)	4,72 ^b (30,00)
Posição irregular do 2º dedo PTs	0,86 (9,09)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	0,94 (10,00)
Polidactilia PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	11,76 ^{ab} (22,22)	28,30 ^{abc} (100,00) ^{abc}
1º dedo da PTs maior (PTE e/ou PTD)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,92 (11,11)	34,91 ^{abc} (90,00) ^{abc}
Cauda curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,92 (11,11)	4,72 ^b (30,00)
Cauda encrespada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,77 ^b (30,00)
Cauda com ponta curva	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,89 (20,00)
Ponta de cauda	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	7,55 ^{abc} (30,00)
Cauda curta e encrespada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,60 ^{abc} (50,00) ^{abc}
Cauda curta com ponta curva	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,77 ^b (30,00)
Cauda encrespada com ponta curva	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Protusão da língua	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	10,78 ^{ab} (55,56) ^{ab}	80,19 ^{abc} (100,00) ^{abc}
Micrognatia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	28,30 ^{abc} (40,00) ^{ab}
Gastroquise (%)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,72 ^b (30,00)

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos malformados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 6 mg/kg; c \neq 12 mg/kg. PTE e PTD: patas traseiras esquerda e direita, respectivamente; PDE e PDD: patas dianteiras esquerda e direita; PTs: patas traseiras.

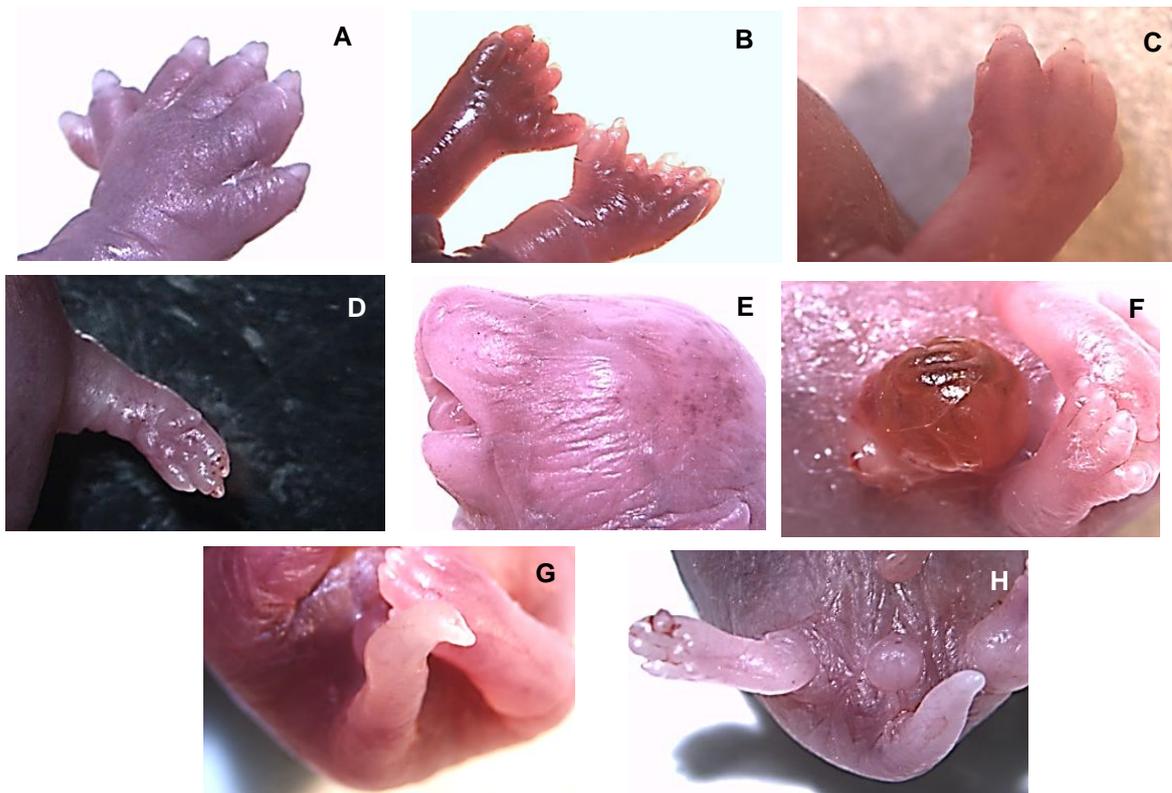


Fig. 4.1: Malformações externas induzidas pela 6-MP (24 mg/kg).

A e B: Polidactilia (pata traseira); **C:** Polidactilia pendular (microdedo); **D:** Ausência de dedo (pata dianteira); **E:** Protusão da língua e micrognatia; **F:** Gastroquise; **G:** Cauda encrespada; **H:** Posição irregular da pata traseira e cauda curta.

4.1.2.2 – ANORMALIDADES DO ESQUELETO FETAL

Foi realizada a avaliação sistemática completa dos esqueletos axial (crânio, coluna vertebral, costelas e esterno) e apendicular (ossos dos cinturões peitoral e pélvico, e dos membros superiores e inferiores) dos fetos, após a diafanização das partes moles e a coloração das estruturas calcificadas com *Alizarina red S*. Os ossos foram classificados, em relação aos seus estados de mineralização (calcificação), entre esponjosos, não calcificados, e pobremente calcificados.

O conjunto completo de com todas as observações registradas é apresentado nos Anexos de 17 a 27.

As informações apresentadas nas tabelas a seguir foram extraídas das tabelas completas, e apresentam os perfis dose-resposta apenas daquelas malformações, cujas incidências diferiram significativamente entre as doses testadas. As Tabelas simplificadas de

4.1.19 a 4.1.30 mostram os tipos e as frequências das malformações esqueléticas de fetos provenientes de mães tratadas com 6-MP, no dia 11 de gestação (GD11), e as alterações do estado de calcificação dos ossos (ossificação), respectivamente.

4.1.2.2.1 – ESQUELETO AXIAL:

Os tipos e as frequências das malformações fetais induzidas pela 6-MP, no esqueleto axial estão descritas nas Tabelas de 4.1.19 a 4.1.26 (Anexos 17 a 23) .

Crânio:

No crânio, foram registrados aumentos das frequências, tanto de anomalias classificadas como malformações (defeitos de forma/tamanho, fusões ósseas, e presença de fissura óssea), como classificadas como variações (ossos incompletos, ossos mais distantes, ossos esponjosos, ou pobremente calcificados) associadas ao retardo do desenvolvimento ósseo.

A Tabela 4.1.19 mostra que a 6-MP provocou aumentos significativos das incidências de osso basoccipital com forma irregular, e de osso timpânico mais curto, e de mandíbula mais curta, observados apenas na maior dose (24 mg/kg) que resultou nas frequências de 4,7%, 8,5% e 28,3%, respectivamente (frequência do grupo controle: 0,0%). Já as proporções da ocorrência “forma irregular do osso exoccipital” aumentaram de maneira dose-dependente, a partir de 12 mg/kg de 6-MP, sendo as frequências observadas nos grupos controle, tratado com 12 mg/kg, e com 24 mg/kg de 0,0%, 4,9% e 43,4%, respectivamente.

De acordo com a Tabela 4.1.19, podemos observar três tipos de fusões envolvendo o osso zigomático, que ocorreram somente na maior dose (24 mg/kg), e com frequências relativamente baixas: fusão do osso zigomático com o processo jugular do maxilar (14,2%), fusão do osso zigomático com o processo jugular do escamoso (8,5%) e fusão do osso zigomático com os processos jugulares do osso escamoso e do maxilar (14,2%).

A Tabela 4.1.19 mostra dois tipos de variações induzidos pelo tratamento com 6-MP, a ocorrência de ossos incompletos, e a de defeitos de fechamento de alguns ossos. Podemos verificar que a maior dose de 6-MP (24 mg/kg) provocou um aumento significativo das frequências de ossos nasal e exoccipital incompletos, e de ossos palatinos mais distantes, enquanto a menor dose (6 mg/kg) provocou aumento das incidências de osso basoccipital e de mandíbula incompletos. Todas as doses de 6-MP aumentaram as proporções de fetos com

osso frontal incompleto, em relação ao grupo controle, porém esses aumentos foram maiores nas doses de 6 e 24 mg/kg. Aumentos dose-dependentes das incidências de ossos parietais e de ossos mandibulares mais distantes foram detectados, a partir de 6 e 12 mg/kg, respectivamente.

A incidência de ossos supraoccipitais incompletos, observada no grupo controle, foi bastante alta (aproximadamente 52,0%), o que corrobora com o caráter transitório dessas anomalias. Entretanto, os aumentos das frequências de ossos frontais incompletos (aproximadamente 63,0% na maior dose) e de ossos parietais mais distantes (aproximadamente 95,0% na maior dose), induzidos pela 6-MP, foram muito mais contundentes, em relação às frequências observadas no grupo controle (6,0 e 4,3, respectivamente), sugerindo que, nesses casos, a perturbação foi mais severa.

Já a ocorrência de retardos no processo de fechamento dos ossos mandibulares ocorreu de maneira dose-dependente, a partir de 12 mg/kg. Durante a avaliação das malformações externas, as incidências de fetos apresentando protusão da língua também aumentaram de maneira dose-dependente, a partir de 12 mg/kg (Tabela 4.1.18). A protusão da língua é uma consequência da ocorrência de alterações ósseas mandibulares, tais como de mandíbula curta (ou micrognatia), que é uma malformação, ou de um maior espaçamento entre os ossos da mandíbula, que é uma variação associada a um retardo no processo de ossificação (fechamento).

A Tabela 4.1.20 apresenta as alterações de ossificação causadas pelo tratamento com 6-MP. De acordo com os dados apresentados nesta tabela, a 6-MP aumentou, significativamente, e de uma maneira claramente dose-dependente, o aparecimento de ossos alterados, a partir da dose de 6 mg/kg (osso nasal, frontal, interparietal, hioide, escamoso, palatino, orbitosfenoide, hamulus, pobremente calcificados; osso supraoccipital esponjoso), ou de 12 mg/kg (ossos parietais, exoccipital, processo jugular do osso escamoso, zigomático, maxilar, processo jugular do maxilar, premaxilar osso lacrimal e lâmina orbital, timpânico, pobremente calcificados).

Em alguns casos, os aumentos das incidências de alterações de ossificação ocorreram apenas com 24 mg/kg. Estes perfis dose-resposta foram detectados para o aparecimento de osso exoccipital esponjoso, e de alguns ossos pobremente calcificados, como o presfenoide, mandíbula. Já a ocorrência de fetos com osso basoesfenoide esponjoso foi registrada apenas na dose de 12 mg/kg. Por outro lado, todas as doses de 6-MP aumentaram as frequências de fetos apresentando os ossos supraoccipital, basoccipital, basoesfenoide e pterigoide pobremente calcificados, em relação ao grupo controle, contudo, as duas maiores doses exibiram frequências equivalentes, que diferiram também, das observadas com 6 mg/kg.

Considerando da faixa de doses testadas o NOELs da 6-MP estabelecidos para malformações e variações foram 6 mg/kg e < 6 mg/kg, respectivamente.

Apesar do estado de calcificação óssea estar associado com “retardo na ossificação”, e da mineralização óssea geralmente ocorrer mais tarde, essas alterações não foram tão frequentes no grupo controle, com exceção das ocorrências espontâneas de ossos basoccipital (10,3%) e supraoccipital (50,9%) pobremente calcificados.

Tabela 4.1.19: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do crânio induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg, sc)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Malformações (%):</i>				
Fusão do osso zigomático com processo jugular do maxilar	4,31 (18,18)	2,52 (33,33)	6,86 (44,44)	14,15 ^{ab} (70,00) ^a
Fusão do osso zigomático com processo jugular do escamoso	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	8,49 ^{abc} (50,00) ^{ab}
Fusão do osso zigomático com os processos jugulares do osso escamoso e do maxilar	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	14,15 ^{abc} (20,00)
Forma irregular do osso exoccipital	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,90 ^{ab} (22,22)	43,40 ^{abc} (80,00) ^{abc}
Forma irregular do osso basoccipital	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,72 ^{ab} (18,18)
Osso nasal incompleto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	20,75 ^{abc} (30,00)
Osso frontal incompleto	6,03 (36,36)	60,50 ^a (77,78)	27,45 ^{ab} (55,56)	63,21 ^{ac} (70,00)
Osso interparietal incompleto	6,03 (45,45)	1,68 (22,22)	2,94 (22,22)	22,64 ^{abc} (50,00)
Osso supraoccipital incompleto	51,72 (81,82)	68,07 ^a (88,89)	75,49 ^a (100,00)	96,23 ^{abc} (100,00)
Osso exoccipital incompleto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	21,70 ^{abc} (40,00) ^a
Osso basoccipital incompleto	0,00 (0,00)	6,72 ^a (11,11)	0,00 ^b (0,00)	0,94 ^b (10,00)
Mandíbula incompleta	0,00 (0,00)	5,04 ^a (11,11)	0,00 ^b (0,00)	0,00 ^b (0,00)
Osso timpânico mais curto	0,00 (0,00)	1,68 (11,11)	0,00 (0,00)	8,49 ^{abc} (20,00)
Mandíbula curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	28,30 ^{abc} (40,00) ^a
Fissura no basoesfenoide	3,45 (27,27)	2,52 (22,22)	5,88 (44,44)	23,58 ^{abc} (60,00)
Ossos parietais mais distantes	4,31 (18,18)	55,46 ^a (77,78) ^a	59,80 ^a (88,89) ^a	92,45 ^{abc} (100,00) ^a
Distância maior entre os ossos palatinos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	12,26 ^{abc} (20,00)
Distância maior entre os ossos da mandíbula	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	29,41 ^{ab} (66,67) ^{ab}	82,08 ^{abc} (100,00) ^{ab}

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos alterados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 6 mg/kg; c \neq 12 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Tabela 4.1.20: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos do crânio induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg, sc)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Alterações (%):</i>				
Osso supraoccipital esponjoso	0,86 (9,09)	12,61 ^a (44,44)	31,37 ^{ab} (88,89) ^a	72,64 ^{abc} (90,00) ^a
Osso exoccipital esponjoso	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,77 ^{abc} (30,00)
Osso basoesfenoide esponjoso	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,88 ^{ab} (11,11)	2,83 ^b (20,00)
Osso nasal pobremente calcificado	0,86 (9,09)	6,72 ^a (33,33)	28,43 ^{ab} (44,44)	87,74 ^{abc} (90,00) ^{ab}
Osso frontal pobremente calcificado	0,86 (9,09)	6,72 ^a (33,33)	28,43 ^{ab} (44,44)	88,68 ^{abc} (90,00) ^{ab}
Osso parietal pobremente calcificado	1,72 (18,18)	7,56 (44,44)	33,33 ^{ab} (55,56)	88,68 ^{abc} (90,00) ^a
Osso interparietal pobremente calcificado	1,72 (18,18)	13,45 ^a (55,56)	29,41 ^{ab} (55,56)	85,85 ^{abc} (90,00) ^a
Osso supraoccipital pobremente calcificado	50,86 (81,82)	81,51 ^a (100,00)	95,10 ^{ab} (100,00)	97,17 ^{ab} (100,00)
Osso exoccipital pobremente calcificado	1,72 (18,18)	4,20 (44,44)	51,96 ^{ab} (88,89) ^a	89,62 ^{abc} (100,00) ^{ab}
Osso basoccipital pobremente calcificado	10,34 (36,36)	71,43 ^a (100,00) ^a	93,14 ^{ab} (100,00) ^a	93,40 ^{ab} (100,00) ^a
Osso timpânico pobremente calcificado	3,45 (36,36)	7,56 (55,56)	11,76 ^a (44,44)	63,21 ^{abc} (80,00)
Osso hioide pobremente calcificado	1,72 (18,18)	12,61 ^a (33,33)	29,41 ^{ab} (44,44)	54,72 ^{abc} (60,00)
Osso escamoso pobremente calcificado	3,45 (27,27)	12,61 ^a (66,67)	48,04 ^{ab} (77,78)	82,08 ^{abc} (100,00) ^a
Processo jugular do osso escamoso pobremente calcificado	3,45 (27,27)	9,24 (55,56)	32,35 ^{ab} (55,56)	76,42 ^{abc} (90,00) ^a

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos alterados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 6 mg/kg; c \neq 12 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

(Cont.) Tabela 4.1.20: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos do crânio induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, GD11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg, sc)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Alterações (%):</i>				
Osso zigomático pobremente calcificado	3,45 (27,27)	9,24 (55,56)	30,39 ^{ab} (55,56)	79,25 ^{abc} (100,00) ^{abc}
Osso maxilar pobremente calcificado	2,59 (27,27)	7,56 (55,56)	22,55 ^{ab} (55,56)	76,42 ^{abc} (90,00) ^a
Processo jugular do maxilar pobremente calcificado	2,59 (27,27)	7,56 (55,56)	21,57 ^{ab} (55,56)	76,42 ^{abc} (80,00) ^a
Osso premaxilar pobremente calcificado	2,59 (27,27)	7,56 (55,56)	21,57 ^{ab} (55,56)	73,58 ^{abc} (80,00) ^a
Osso lacrimal pobremente calcificado	1,72 (18,18)	7,56 (55,56)	15,69 ^a (55,56)	71,70 ^{abc} (70,00)
Lâmina orbital do osso frontal pobremente calcificada	1,72 (18,18)	7,56 (55,56)	15,69 ^a (55,56)	71,70 ^{abc} (70,00)
Osso palatino pobremente calcificado	5,17 (36,36)	45,38 ^a (100,00) ^a	82,35 ^{ab} (100,00) ^a	98,11 ^{abc} (100,00) ^a
Osso presfenoide pobremente calcificado	1,72 (18,18)	0,00 (0,00)	5,88 ^b (22,22)	30,19 ^{abc} (60,00) ^b
Osso orbitoesfenoide pobremente calcificado	2,59 (18,18)	30,25 ^a (55,56)	54,90 ^{ab} (88,89) ^a	92,45 ^{abc} (100,00) ^{ab}
Osso basoesfenoide pobremente calcificado	6,03 (27,27)	47,90 ^a (100,00) ^a	90,20 ^{ab} (100,00) ^a	92,45 ^{ab} (100,00) ^a
Osso hamulus pobremente calcificado	6,03 (27,27)	41,18 ^a (77,78)	57,84 ^{ab} (55,56)	94,34 ^{abc} (90,00) ^a
Osso pterigóide pobremente calcificado	6,03 (27,27)	42,02 ^a (77,78)	88,24 ^{ab} (100,00) ^a	91,51 ^{ab} (100,00) ^a
Mandíbula pobremente calcificada	0,86 (9,09)	1,68 (11,11)	5,88 (33,33)	57,55 ^{abc} (70,00) ^{ab}

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos alterados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 6 mg/kg; c \neq 12 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Coluna:

A Tabela 4.1.21 contem os dados de anomalias induzidas pela 6-MP sobre a coluna vertebral dos fetos, classificadas como malformações, ou variações.

Como podemos notar, na maior dose de 6-MP testada (24 mg/kg) causou um aumento significativo, das frequências de fetos apresentando malformações estruturais, em relação ao grupo controle, incluindo as seguintes ocorrências: “forma irregular do atlas” e “forma irregular de arcos vertebrais torácicos”. As proporções de fetos apresentando “forma irregular do axis” aumentaram de maneira dose-dependente (a partir de 6 mg/kg), em relação ao grupo controle cuja frequência espontânea para esta ocorrência foi relativamente alta (24,1%), sugerindo que este tipo de alteração, não deve ser muito prejudicial para os animais adultos.

As anomalias classificadas como variações relacionadas a retardos do desenvolvimento ósseo, constantes na Tabela 4.1.21, incluem: ossificação incompleta de arcos vertebrais, corpos vertebrais divididos, centros de ossificação de corpos vertebrais em forma de *dumb-bell*, e interrupção do fechamento de corpos vertebrais.

As frequências da ocorrência de centros de ossificação de corpos vertebrais torácicos em forma de *Dumb-bell* aumentaram de maneira dose-dependente, sendo as observadas no grupo controle e na dose de 24 mg/kg, de 4,3% e 37,7%, respectivamente. Por outro lado, esta mesma em corpos vertebrais lombares foi registrada apenas na maior dose, com uma frequência de 17,0%, enquanto no grupo controle a frequência foi de 0,9%. O aumento das incidências de corpos vertebrais torácicos divididos simétrica ou assimetricamente, foram pequenos, e observados somente com 24 mg/kg (frequências dos grupos controle e tratado foram de 0,0% e 6,6%). A classificação das ocorrências “centros de ossificação de corpos vertebrais em forma de *Dumb-bell*” e de “centros de ossificação de corpos vertebrais divididos” em malformações ou variações é discutível, porém estas anomalias tendem a ser classificadas como variações.

A administração de 6-MP induziu um aumento dose-dependente da frequência da variação “ossificação incompleta de arcos vertebrais cervicais”, em relação ao controle, que foi significativo a partir de 12 mg/kg. Foram também registrados aumentos equivalentes da incidência de “interrupção do fechamento corpos vertebrais cervicais”, nas doses de 12 e 24 mg/kg (frequências de 9,8% e 4,7%), em relação às frequências observadas no grupo tratado com 6 mg/kg e ao grupo controle (0,0%). Os aumentos das ocorrências “ossificação incompleta de arcos vertebrais torácicos” e “interrupção do fechamento corpos vertebrais lombares” foram observados apenas com 24 mg/kg.

A Tabela 4.1.22 apresenta as alterações da ossificação dos ossos da coluna (variações), relacionadas ao tratamento com 6-MP.

De acordo com a Tabela 4.1.22, aumentos significativos das incidências de corpos vertebrais cervicais e de vértebras sacrais não calcificados, foram detectados em fetos tratados apenas com a maior dose testada.

O tratamento com 6-MP causou um aumento significativo, e claramente dose-dependente, das frequências de fetos apresentando vértebras cervicais, torácicas, lombares e sacrais pobremente calcificadas, bem como de vértebras caudais não calcificadas, a partir da dose de 6 mg/kg. Foram registrados aumentos equivalentes das incidências de vértebras caudais pobremente calcificadas, nas doses de 6 e 12 mg/kg (com frequências de aproximadamente 74% e 78%), em relação ao grupo controle (frequência espontânea de 35,0%), o que não foi observado na dose de 24 mg/kg (frequência de 37,0%). As incidências de corpos vertebrais cervicais não calcificados, e de vértebras sacrais não calcificadas aumentaram somente na maior dose de 6-MP.

Considerando da faixa de doses testadas o NOEL, estabelecido para as malformações e variações observadas na coluna foi de < 6 mg/kg.

Tabela 4.1.21: Tipos e frequências de anomalias dos ossos da coluna vertebral induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com a 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg, sc)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Malformações (%):</i>				
Forma irregular do atlas	0,86 (9,09)	0,74 (11,11)	1,96 (22,22)	8,49 ^{ab} (50,00)
Forma irregular do axis	24,14 (63,64)	42,02 ^a (100,00)	52,94 ^a (100,00)	76,42 ^{abc} (90,00)
Ossificação incompleta de 1-7 arcos vertebrais cervicais	1,72 (9,09)	5,04 (22,22)	12,75 ^a (55,56) ^a	92,45 ^{abc} (100,00) ^{abc}
Interrupção do processo de fechamento de 1-6 corpos vertebrais cervicais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	9,80 ^{ab} (22,22)	4,72 ^{ab} (10,00)
1-2 corpos vertebrais torácicos divididos assimetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,60 ^{abc} (40,00) ^a
1-2 corpos vertebrais torácicas divididos simetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,60 ^{abc} (30,00)
Centros de ossificação de 1-6 corpos vertebrais torácicos em forma de dumb-bell	4,31 (36,36)	7,56 (33,33)	11,76 ^a (66,67)	37,74 ^{abc} (100,00) ^{ab}
Forma irregular de 1-2 arcos vertebrais torácicos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,72 ^{ab} (10,00)
Ossificação incompleta de 1-2 arcos vertebrais torácicos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,72 ^{ab} (10,00)
Interrupção do processo de fechamento de 1-6 corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,72 ^{ab} (30,00)
Centros de ossificação de 1-6 corpos vertebrais lombares em forma de dumb-bell	0,86 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	16,98 ^{abc} (60,00) ^{abc}

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos malformados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 6 mg/kg; c \neq 12 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Tabela 4.1.22: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos da coluna vertebral induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg, sc)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Alterações (%):</i>				
1-7 corpos vertebrais cervicais não calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	26,42 ^{abc} (40,00) ^a
Todas as 7 vértebras cervicais pobremente calcificadas	0,86 (9,09)	13,45 ^a (66,67) ^a	62,75 ^{ab} (88,89) ^a	93,40 ^{abc} (100,00) ^a
1-13 vértebras torácicas pobremente calcificadas	1,72 (18,18)	16,61 ^a (77,78)	67,65 ^{ab} (88,89)	92,45 ^{abc} (100,00)
1-6 vértebras lombares pobremente calcificadas	3,45 (27,27)	28,27 ^a (88,89)	77,45 ^{ab} (88,89)	97,17 ^{abc} (100,00)
1-4 vértebras sacrais não calcificadas	0,86 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	15,09 ^{abc} (50,00) ^{bc}
1-4 vértebras sacrais pobremente calcificadas	14,66 (63,64)	51,26 ^a (88,89)	80,39 ^{ab} (88,89)	96,23 ^{abc} (100,00)
1-2 vértebras caudais não calcificadas	12,07 (45,45)	30,25 ^a (100,00) ^a	49,02 ^{ab} (100,00) ^a	94,34 ^{abc} (100,00) ^a
1-2 vértebras caudais pobremente calcificadas	35,34 (63,64)	73,95 ^a (100,00)	77,45 ^a (88,89)	36,91 ^{bc} (90,00)

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos alterados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 6 mg/kg; c \neq 12 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Costelas:

A Tabela 4.1.23 mostra que a 6-MP aumentou significativamente, e de maneira dose dependente, a incidência de costelas curtas, a partir de 12 mg/kg. Por outro lado, as doses de 6, 12 e 24 mg/kg diminuíram de maneira equivalente a ocorrência de costelas lombares rudimentares extras (resultando nas frequências de 23,5%, 26,5% e 21,7%), em relação ao grupo controle. Como podemos observar, as incidências dessas duas alterações observadas no grupo controle foram altas (37,0% e 35,0%, respectivamente), o que sugere essas ocorrências não interferem com a saúde do animal, durante a vida pós-natal. O aparecimento de costelas extras rudimentares parece ser um evento comum e transitório, cuja classificação é polêmica. Alguns autores consideram esta ocorrência como uma variação, enquanto outros a classificam como malformação (WICKRAMARATNE, 1988; KHERA, 1981; SOLECKI *et al.*, 2001).

Os dados da Tabela 4.1.24 mostram que, as duas menores doses de 6-MP causaram aumentos significativos e similares das proporções de fetos com costelas pobremente calcificadas (23,5 e 32,4%, respectivamente), em relação às do grupo controle (2,6%), enquanto na dose de 24 mg/kg, essa frequência foi muito mais elevada (73,6%) e diferiu estatisticamente das observadas nos demais grupos experimentais.

Os NOELs estabelecidos para malformações e variações foram 6 mg/kg e < 6 mg/kg, respectivamente.

Tabela 4.1.23: Tipos e frequências de anomalias das costelas induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg, sc)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Malformações (%):</i>				
1 a 13 costelas mais curtas	37,07 (90,91)	26,89 (88,89)	52,94 ^{ab} (100,00)	75,47 ^{abc} (100,00)
Costela extra rudimentar na coluna lombar	34,48 (90,91)	23,53 ^a (100,00)	26,47 ^a (77,78)	21,70 ^a (70,00)

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos malformados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 6 mg/kg; c \neq 12 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Tabela 4.1.24: Tipos e frequências de alterações da ossificação das costelas induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no dia DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg, sc)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Alterações (%):</i>				
1-13 costelas pobremente calcificadas	2,59 (27,27)	23,53 ^a (66,67) ^a	32,35 ^a (55,56) ^a	73,58 ^{abc} (90,00) ^a

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos alterados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 6 mg/kg; c \neq 12 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Esterno:

Os dados sobre as malformações estruturais induzidas nos ossos do esterno pela 6-MP estão descritos mostrados na Tabela 4.1.25.

De acordo com a Tabela 4.1.25, a exposição de ratas grávidas a 24 mg/kg de 6-MP aumentou significativamente as proporções de fetos apresentando esternos deslocados, e defeitos na 2ª, 3ª e 4ª esternebras, tais como esternebras menores ou divididas. Também foram constatadas anomalias na 1ª esternebra (menor ou com forma irregular), mas, neste caso, os aumentos significativos das frequências de fetos afetados foram dose-dependentes, a partir de 12 mg/kg.

A maior dose testada de 6-MP (24 mg/kg) aumentou ligeiramente (de 0% para 4,7%), a incidência de 5ª esternebra ausente, que é uma malformação típica (SOLECKI *et al.*, 2001). Como podemos notar, o tratamento com a dose de 12 mg/kg provocou um pequeno aumento da incidência da 5ª esternebra dividida (de 0,0% para 5,9%). Além disso, para dois tipos de ocorrência, (5ª esternebra com formato irregular, e 5ª esternebra menor), a 6-MP teve um efeito protetor, sendo as incidências registradas na maior dose (3,8% e 17,9%, respectivamente) muito menores do que as observadas nos controles (50,0% e 34,5%). As altas frequências observadas no grupo controle sugerem que, em se tratando da 5ª esternebra, estes tipos de alterações anatômicas, não devem ser tão significativas para o animal, até por que, normalmente, de todas as esternebras, esta é a última a ossificar (CARNEY & KIMMEL, 2007).

A Tabela 4.1.26 mostra os dados sobre o estado de ossificação do esterno (variações). A 6-MP causou retardos na ossificação de todas as esternebras, sobretudo na maior dose testada, evidenciados através de um aumento contundente das proporções de esternebras não calcificadas ou pobremente calcificadas, em relação ao grupo controle.

De acordo com a Tabela 4.1.26, somente na maior dose de 6-MP (24 mg/kg), foram observados aumentos significativos das proporções de fetos apresentando a 1ª, 2ª e 3ª esternebras pobremente, ou não calcificadas, em relação às registradas nos demais grupos experimentais. As doses de 6 e 24 mg/kg causaram aumentos nas frequências de fetos com a 4ª esternebra não ossificada. Por outro lado, incidência da 4ª esternebra pobremente calcificadas aumentou de modo dose-dependente, tendo este aumento atingido proporções significativamente diferentes das observadas no grupo controle, a partir da dose de 12 mg/kg.

As frequências de fetos apresentando a 5ª e a 6ª esternebras não calcificadas aumentaram significativamente com 12 mg/kg (em relação aos controles) e com 24 mg/kg (em relação a todos os grupos experimentais). Além disso, as duas maiores doses testadas

aumentaram de maneira equivalente, as proporções de fetos com “todas” as esternebras pobremente calcificadas, quando comparadas às registradas no controle e na menor dose.

Tabela 4.1.25: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do esterno induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg, sc)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Malformações (%):</i>				
Esterno deslocado	8,62 (45,45)	15,96 (88,89) ^a	18,63 (88,89)	24,53 ^a (80,00)
Forma irregular da 1 ^a esternebra	0,86 (9,09)	1,68 (22,22)	6,86 ^a (44,44)	12,26 ^{ab} (40,00)
1 ^a esternebra menor	1,72 (18,18)	0,00 (0,00)	14,71 ^{ab} (55,56) ^b	34,91 ^{abc} (90,00) ^{ab}
Forma irregular da 2 ^a esternebra	13,79 (81,82)	10,92 (66,67)	31,37 ^{ab} (88,89)	21,70 ^b (90,00)
2 ^a esternebra menor	0,00 (0,00)	0,84 (11,11)	2,94 (33,33)	32,08 ^{abc} (90,00) ^{abc}
3 ^a esternebra menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,72 ^{ab} (30,00)
3 ^a esternebra dividida	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,72 ^{ab} (40,00) ^a
4 ^a esternebra menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	16,04 ^{abc} (80,00) ^{abc}
Forma irregular da 5 ^a esternebra	50,00 (100,00)	55,46 (100,00)	41,18 ^b (88,89)	3,77 ^{abc} (40,00) ^{ab}
Ausência da 5 ^a esternebra	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,72 ^{ab} (10,00)
5 ^a esternebra menor	34,48 (100,00)	33,61 (77,78)	42,16 (100,00)	17,92 ^{abc} (70,00)
5 ^a esternebra dividida	0,00 (0,00)	0,84 (12,50)	5,88 ^a (33,33)	0,94 (10,00)

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos malformados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 6 mg/kg; c \neq 12 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Tabela 4.1.26: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos do esterno induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg, sc)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Alterações (%):</i>				
1 ^a esternebra não calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	10,38 ^{abc} (50,00) ^{abc}
1 ^a esternebra pobremente calcificada	0,86 (9,09)	0,00 (0,00)	4,90 ^b (22,22)	44,34 ^{abc} (80,00) ^{abc}
2 ^a esternebra não calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	8,49 ^{abc} (40,00) ^a
2 ^a esternebra pobremente calcificada	0,86 (9,09)	0,00 (0,00)	5,88 ^b (22,22)	42,45 ^{abc} (80,00) ^{abc}
3 ^a esternebra não calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	7,55 ^{abc} (20,00)
3 ^a esternebra pobremente calcificada	1,72 (18,18)	0,84 (11,11)	6,86 ^b (22,22)	46,23 ^{abc} (80,00) ^{abc}
4 ^a esternebra não calcificada	0,00 (0,00)	6,72 ^a (22,22)	0,00 ^b (0,00)	14,15 ^{ac} (40,00) ^a
4 ^a esternebra pobremente calcificada	5,17 (27,27)	12,61 (44,44)	15,69 ^a (44,44)	58,49 ^{abc} (80,00) ^a
5 ^a esternebra não calcificada	2,59 (18,18)	20,17 ^a (33,33)	7,84 ^b (33,33)	64,15 ^{abc} (100,00) ^{abc}
6 ^a esternebra não calcificada	0,86 (9,09)	28,57 ^a (44,44)	4,90 ^b (22,22)	45,28 ^{abc} (70,00) ^a
Todas as esternebbras pobremente calcificadas	0,00 (0,00)	2,52 (33,33)	12,75 ^{ab} (55,56) ^a	12,26 ^{ab} (60,00) ^a

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos alterados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 6 mg/kg; c \neq 12 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

4.1.2.2.2 - ESQUELETO APENDICULAR:

4.1.2.2.2.1 – MEMBROS ANTERIORES:

As anomalias esqueléticas (malformações e variações) dos membros anteriores estão descritas nas Tabelas 4.1.27 e 4.1.28.

De acordo com a Tabela 4.1.27, os efeitos teratogênicos da 6-MP foram observados apenas, nas patas dianteiras. Nas patas dianteiras, embora apenas na maior dose, a 6-MP, induziu claramente a ocorrência de várias alterações esqueléticas, caracterizadas como malformações, incluindo:

- i) Defeitos em ossos longos: úmero curto; rádio torto; rádio curto; ulna curta; ulna torta (incidências na maior dose variaram de 4,7 a 19,8%; incidência no grupo controle: 0,0%).
- ii) Ausência de ossos: ausência de ulna; ausência de processo deltoide, que apareceram com uma frequência baixa de 5,7% (incidência no grupo controle: 0,0%).
- iii) Fusão entre dedos: fusão entre 3° e 4° dedos apareceu com uma frequência baixa (6,6%); a incidência no grupo controle foi 0,0%.
- iv) Falanges proximais do 3° dedo menores, cujas incidências foram 13,2% (24 mg/kg) e 3,5% (grupo controle).

Além disso, as frequências do aparecimento de animais apresentando a ocorrência “5° metacarpo menor” aumentaram de maneira dose-dependente, a partir de 12 mg/kg, quando no grupo controle a frequência foi de 0,0%.

A 6-MP provocou uma diminuição dose-dependente, da incidência de processos deltoides apresentando forma irregular e de falanges do 5° dedo menor (curva dose-resposta negativa). Nestes casos, as frequências foram diminuindo, com o aumento da dose.

A maior dose de 6-MP (24 mg/kg) também diminuiu significativamente a frequência de buracos no úmero (16,0%), anomalia classificada como variação, com relação à alta incidência registrada no grupo controle (31,0%), e nos demais grupos tratados. Até o presente momento, as causas dessas diminuições são desconhecidas.

A Tabela 4.1.28 mostra as alterações do estado de calcificação dos membros anteriores. Como podemos observar, os ossos das patas dianteiras foram muito mais afetados pela 6-MP, do que os da cinta peitoral.

A 6-MP aumentou de maneira significativa e dose-dependente, as incidências de ossos pobremente calcificados, a partir de 12 mg/kg, incluindo ossos da pata dianteira (úmero, ulna e rádio), e escápula. A proporção de fetos com clavículas pobremente calcificadas aumentou na dose de 12 mg/kg, em relação ao grupo controle, e na dose de 24 mg/kg, em relação a todos os grupos experimentais.

As doses de 6 e 24 mg/kg aumentaram as proporções de fetos com todos os metacarpos pobremente calcificados, em relação ao grupo controle, enquanto apenas a dose de 24 mg/kg aumentou as proporções de fetos apresentando apenas um dos metacarpos pobremente calcificados (do 2º ao 5º) ou não calcificados (5º metacarpo), bem como a de fetos com todas as falanges não calcificadas.

Em algumas situações, o tratamento com 6 mg/kg, e 12 mg/kg de 6-MP causaram diminuições significativas das incidências de falanges alteradas, em relação ao grupo controle, e, com 24 mg/kg essas frequências aumentaram abruptamente, atingindo percentuais maiores ou equivalentes aos registrados nos controles. Este perfil dose-resposta foi observado para as ocorrências de falanges proximais do 2º, 4º e 5º dedos não calcificadas, e de falanges do 3º e 4º dedos pobremente calcificadas. Nesses casos as frequências espontâneas dessas alterações, observadas no grupo controle, foram relativamente altas, variando entre 20,7 e 50,0%, com exceção da ocorrência espontânea de “falanges do 4º dedo não calcificadas”, que foi de 6,0%.

A menor dose de 6-MP (6 mg/kg) causou um aumento das frequências de falanges do 2º e 5º dedos pobremente calcificadas, enquanto as doses subsequentes (12 e 24 mg/kg) provocaram uma diminuição progressiva dessas frequências (efeito protetor), sendo os percentuais registrados na maior dose inferiores aos observados nos demais grupos.

O NOEL estabelecidos para malformações e variações foi de < 6 mg/kg,

Tabela 4.1.27: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros anteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg, sc)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Malformações (%):</i>				
Buraco no úmero	31,03 (90,91)	31,93 (100,00)	32,35 (100,00)	16,04 ^{abc} (50,00) ^{bc}
Ossó úmero mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	15,09 ^{abc} (40,00) ^a
Ossó rádio torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	11,32 ^{abc} (30,00)
Ossó rádio mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	19,81 ^{abc} (30,00)
Ausência da ulna	0,00 (0,00)	0,84 (11,11)	0,00 (0,00)	5,66 ^a (20,00)
Ulna mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	18,87 ^{abc} (40,00) ^a
Ulna torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,72 ^{ab} (20,00)
Ausência do processo deltoide	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,66 ^{abc} (20,00)
Forma irregular do processo deltoide	6,90 (54,55)	27,73 ^a (100,00) ^a	17,65 ^b (66,67)	7,55 ^b (50,00) ^b
5° Metacarpo menor	0,00 (0,00)	2,52 (11,11)	5,88 ^a (44,44) ^a	26,42 ^{abc} (80,00) ^{ab}
Falange proximal do 2° dedo menor	22,69 (63,64)	28,57 (88,89)	15,69 ^b (66,67)	9,43 ^{ab} (50,00)
Falange proximal do 3° dedo menor	3,45 (18,18)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	13,21 ^{abc} (40,00)
Fusão entre 3° e 4° dedos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,60 ^{abc} (20,00)
Falange proximal do 5° dedo menor	12,93 (72,73)	36,13 ^a (100,00)	18,63 ^b (66,67)	13,21 ^b (60,00)

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos malformados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 6 mg/kg; c \neq 12 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Tabela 4.1.28: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos dos membros anteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg, sc)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Alterações (%):</i>				
Escápula pobremente calcificada	0,86 (9,09)	2,52 (11,11)	13,73 ^{ab} (33,33)	81,13 ^{abc} (100,00) ^{abc}
Clavícula pobremente calcificada	0,86 (9,09)	2,52 (11,11)	6,86 ^a (22,22)	72,64 ^{abc} (90,00) ^{abc}
Úmero pobremente calcificado	0,86 (9,09)	2,52 (11,11)	13,73 ^{ab} (33,33)	81,13 ^{abc} (100,00) ^{abc}
Ulna pobremente calcificada	2,59 (18,18)	2,52 (11,11)	13,73 ^{ab} (33,33)	83,96 ^{abc} (100,00) ^{abc}
Ossos rádio pobremente calcificado	2,59 (18,18)	2,52 (11,11)	13,73 ^{ab} (33,33)	81,13 ^{abc} (100,00) ^{abc}
Metacarpos pobremente calcificados	1,72 (9,09)	11,76 ^a (22,22)	5,88 (33,33)	13,21 ^a (30,00)
2º metacarpo pobremente calcificado	0,86 (9,09)	1,68 (11,11)	0,98 (11,11)	24,53 ^{abc} (50,00)
3º metacarpo pobremente calcificado	0,86 (9,09)	1,68 (11,11)	0,98 (11,11)	25,47 ^{abc} (50,00)
4º metacarpo pobremente calcificado	0,86 (18,18)	1,68 (11,11)	0,98 (11,11)	25,47 ^{abc} (50,00)
5º metacarpo pobremente calcificado	4,31 (18,18)	0,84 (11,11)	6,86 ^b (55,56)	30,19 ^{abc} (80,00) ^{ab}
5º metacarpo não calcificado	0,86 (9,09)	0,00 (0,00)	2,94 (11,11)	31,13 ^{abc} (90,00) ^{abc}

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos alterados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 6 mg/kg; c \neq 12 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

(Cont.) Tabela 4.1.28: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos dos membros anteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg, sc)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Alterações (%):</i>				
Falanges proximais não calcificadas	3,45 (27,27)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	25,47 ^{abc} (80,00) ^{abc}
Falange proximal do 2º dedo não calcificada	20,69 (54,55)	6,72 ^a (55,56)	13,73 (66,67)	62,26 ^{abc} (100,00) ^{ab}
Falange proximal do 4º dedo não calcificada	6,03 (27,27)	0,00 ^a (0,00)	0,00 ^a (0,00)	7,55 ^{bc} (30,00)
Falange proximal do 5º dedo não calcificada	50,00 (81,82)	25,21 ^a (77,78)	17,65 ^a (66,67)	64,15 ^{abc} (100,00)
Falange proximal do 2º dedo pobremente calcificada	50,86 (100,00)	65,55 ^a (100,00)	32,35 ^{ab} (77,78)	16,98 ^{abc} (60,00) ^a
Falange proximal do 3º dedo pobremente calcificada	23,28 (72,73)	3,36 ^a (44,44)	8,82 ^a (44,44)	48,11 ^{abc} (80,00)
Falange proximal do 4º dedo pobremente calcificada	35,34 (100,00)	2,52 ^a (33,33) ^a	8,82 ^a (44,44) ^a	42,45 ^{bc} (80,00)
Falange proximal do 5º dedo pobremente calcificada	37,07 (100,00)	61,34 ^a (100,00)	43,14 ^b (66,67)	18,87 ^{abc} (60,00) ^a

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos alterados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 6 mg/kg; c \neq 12 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

4.1.2.2.2 – MEMBROS POSTERIORES:

As Tabelas 4.1.29 e 4.1.30 mostram as alterações dos membros posteriores provocadas pela 6-MP, malformações e variações, tanto nos ossos do cinturão pélvico, como nos ossos da pata traseira.

Conforme os dados da Tabela 4.1.29, a administração da maior dose de 6-MP (24 mg/kg) induziu o aparecimento de vários tipos de malformações, que não foram observadas no grupo controle (incidência espontânea: 0,0%), nem nos grupos tratados com as menores doses (incidências variando de 0,0% a 3,9%), tais como:

- i) Ossos ausentes: púbis, fêmur, tíbia, fíbula, 1º dedo da pata traseira.
- ii) Fusão entre dedos (1º e 2º dedos).
- iii) Ossos malformados: ílio curto; ílio com forma irregular; fêmur curto; constrição no fêmur; tíbia torta; fíbula torta; dedos mais longos; dedos mais curtos; dedos posicionados irregularmente.

A ocorrência “ausência de tíbia” foi também registrada em fetos a termo, provenientes de ratas tratadas com 6-MPr, no DG11, no estudo realizado por CHAHOUD & PAUMGARTEN, 2009.

Além disso, a 6-MP aumentou, de maneira dose-dependente, a proporção de fetos apresentando polidactilia (malformação típica), a partir de 12 mg/kg.

Todas as doses de 6-MP causaram aumentos discretos da frequência de fetos com o 1º metatarso menor, porém, essas frequências diferiram significativamente do grupo controle, nas doses de 6 e 12 mg/kg. Pequenos aumentos (significativos em relação aos controles) nas incidências de falanges proximais menores também foram registrados na menor dose de 6-MP.

A Tabela 4.1.30 mostra os graus de calcificação observados nos ossos dos membros posteriores.

De acordo com esta tabela, a 6-MP aumentou significativamente, e de maneira dose-dependente, as frequências de fetos com ossos pubianos, ílios e ísquios, fêmures, tíbias e fíbulas pobremente calcificados, a partir da dose de 6 mg/kg. No caso dos ossos das patas traseiras, as duas maiores doses (12 e 24 mg/kg) produziram aumentos equivalentes.

Podemos verificar que a administração do fármaco também aumentou, de modo dose-dependente, as proporções de fetos com o 1º metatarso não calcificado, ou pobremente calcificado, a partir de 12 mg/kg. Já as frequências de fetos apresentando todos os metatarsos pobremente calcificados aumentaram significativamente nas doses de 6 mg/kg e de 24 mg/kg,

em relação aos controles. Todas as doses testadas de 6-MP aumentaram as incidências de metatarsos pobremente calcificados (do 2º ao 5º), em relação ao grupo controle, sendo que a maior dose provocou aumentos mais pronunciados, enquanto as menores doses produziram respostas equivalentes.

A maior dose de 6-MP (24 mg/kg) também modificou as frequências de fetos apresentando falanges não calcificadas, ou pobremente calcificadas, em relação ao grupo controle. Podemos observar que a maior dose causou o aumento da proporção de fetos apresentando todas as falanges não calcificadas, em paralelo com uma diminuição da frequência de fetos com todas as falanges pobremente calcificadas. Por outro lado, os percentuais de fetos com apenas uma das falanges não calcificadas, ou pobremente calcificadas, diminuíram significativamente – nestes casos as incidências espontâneas, observadas no grupo controle, foram altas, variando de 7,8% a 49,1%.

O NOEL estabelecido para malformações e variações foi < 6 mg/kg.

Tabela 4.1.29: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros posteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg, sc)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Malformações (%):</i>				
Ausência osso pubiano	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,72 ^{ab} (10,00)
Forma irregular do ílio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	14,15 ^{abc} (30,00)
Ílio mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,60 ^{abc} (10,00)
Ausência de fêmur	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	22,64 ^{abc} (40,00) ^a
Fêmur mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	23,58 ^{abc} (70,00) ^{abc}
Constricção no fêmur	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,60 ^{abc} (20,00)
Ausência de tíbia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	27,36 ^{abc} (50,00) ^{ab}
Tíbia torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,72 ^{ab} (30,00)
Tíbia mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	16,04 ^{abc} (80,00) ^{abc}
Ausência de fíbula	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	12,26 ^{abc} (30,00)
Fíbula torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,60 ^{abc} (30,00)

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos malformados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 6 mg/kg; c \neq 12 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

(Cont.) Tabela 4.1.29: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros posteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg, sc)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Malformações (%):</i>				
1° metatarso menor	6,03 (36,36)	23,53 ^a (44,44)	15,69 ^a (44,44)	12,26 ^b (60,00)
Ausência do 1° dedo da pata traseira	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	10,38 ^{abc} (50,00) ^{abc}
Posição irregular do 1° dedo da pata traseira	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,96 (11,11)	4,72 ^{ab} (30,00)
1° dedo da pata traseira mais longo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,92 (11,11)	34,91 ^{abc} (90,00) ^{abc}
1° dedo da pata traseira mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	12,26 ^{abc} (40,00) ^a
Falange proximal do 3° dedo menor	3,45 (27,27)	8,40 ^a (33,33)	0,00 ^b (0,00)	1,89 ^b (20,00)
Falange proximal do 4° dedo menor	1,72 (9,09)	9,24 ^a (33,33)	1,96 ^b (22,22)	1,89 ^b (20,00)
Fusão entre o 1° e 2° dedos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,60 ^{abc} (40,00) ^a
Polidactilia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	10,78 ^{ab} (22,22)	28,30 ^{abc} (100,00) ^{abc}

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos alterados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 6 mg/kg; c \neq 12 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Tabela 4.1.30: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos dos membros posteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg, sc)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Alterações (%):</i>				
Pubis pobremente calcificado	5,17 (36,36)	56,30 ^a (100,00) ^a	75,49 ^{ab} (77,78)	90,57 ^{abc} (100,00) ^a
Ílio pobremente calcificado	5,17 (36,36)	56,30 ^a (100,00) ^a	75,49 ^{ab} (77,78)	93,40 ^{abc} (100,00) ^a
Ísquio pobremente calcificado	5,17 (36,36)	56,30 ^a (100,00) ^a	75,49 ^{ab} (77,78)	96,23 ^{abc} (100,00) ^a
Fêmur pobremente calcificado	5,17 (36,36)	56,30 ^a (100,00) ^a	75,49 ^{ab} (77,78)	80,19 ^{ab} (100,00) ^a
Tíbia pobremente calcificado	5,17 (36,36)	56,30 ^a (100,00) ^a	75,49 ^{ab} (77,78)	76,42 ^{ab} (100,00) ^a
Fíbula pobremente calcificada	5,17 (36,36)	56,30 ^a (100,00) ^a	75,49 ^{ab} (77,78)	81,13 ^{ab} (90,00) ^a
Metatarsos não calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,77 ^b (10,00)
1° metatarso não calcificado	3,45 (18,18)	10,08 (33,33)	25,49 ^{ab} (77,78) ^a	52,83 ^{abc} (100,00) ^{ab}
Metatarsos pobremente calcificados	4,31 (27,27)	31,09 ^a (66,67)	7,84 ^b (22,22)	21,70 ^{ac} (60,00)
1° metatarso pobremente calcificado	20,69 (63,64)	21,85 (77,78)	35,29 ^{ab} (66,67)	5,66 ^{abc} (40,00)
2° metatarso pobremente calcificado	2,59 (18,18)	11,76 ^a (55,56)	19,61 ^a (55,56)	35,85 ^{abc} (60,00)
3° metatarso pobremente calcificado	3,45 (18,18)	11,76 ^a (55,56)	19,61 ^a (55,56)	35,85 ^{abc} (60,00)
4° metatarso pobremente calcificado	3,45 (18,18)	11,76 ^a (55,56)	19,61 ^a (55,56)	35,85 ^{abc} (60,00)
5° metatarso pobremente calcificado	2,59 (18,18)	11,76 ^a (55,56)	16,67 ^a (55,56)	36,79 ^{abc} (70,00)

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos alterados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 6 mg/kg; c \neq 12 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

(Cont.) Tabela 4.1.30: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos dos membros posteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg, sc)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Alterações (%):</i>				
Falanges proximais não calcificadas	25,00 (63,04)	19,33 (77,78)	28,43 (77,78)	87,74 ^{abc} (100,00)
Falange proximal do 1º dedo não calcificada	7,76 (18,18)	0,00 ^a (0,00)	6,86 ^b (11,11)	0,00 ^{ac} (0,00)
Falange proximal do 2º dedo não calcificada	34,48 (81,82)	26,89 (88,89)	15,69 ^a (66,67)	0,94 ^{abc} (10,00) ^{abc}
Falange proximal do 5º dedo não calcificada	49,14 (90,91)	61,34 (100,00)	38,24 ^b (77,78)	1,89 ^{abc} (20,00) ^{abc}
Falanges proximais pobremente calcificadas	6,90 (45,45)	15,97 ^a (55,56)	14,71 (66,67)	0,00 ^{abc} (0,00) ^{abc}
Falange proximal do 2º dedo pobremente calcificada	28,45 (100,00)	38,66 (100,00)	25,49 ^b (66,67)	0,94 ^{abc} (10,00) ^{abc}
Falange proximal do 3º dedo pobremente calcificada	34,48 (81,82)	57,14 ^a (100,00)	28,43 ^b (66,67)	1,89 ^{abc} (20,00) ^{ab}
Falange proximal do 4º dedo pobremente calcificada	34,48 (81,82)	59,66 ^a (88,89)	31,37 ^b (66,67)	1,89 ^{abc} (20,00) ^{ab}
Falange proximal do 5º dedo pobremente calcificada	10,34 (54,55)	7,56 (55,56)	11,76 (55,56)	0,00 ^{abc} (0,00) ^{abc}

Os números fora dos parênteses indicam a proporção de fetos alterados/total de fetos vivos. Os números entre parêntese indicam a proporção de ninhadas afetadas/total de ninhadas. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq 0 mg/kg; b \neq 6 mg/kg; c \neq 12 mg/kg. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

4.2 - SEGUNDA FASE

4.2.1 – ESTUDO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CONCOMITANTE DE HU E 6-MP SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIOFETAL DE RATOS.

Como mencionado no ítem 3.5, o estudo dos efeitos do tratamento concomitante com HU e 6-MP sobre desenvolvimento embrionário envolveu três grupos de ratas grávidas expostas aos dois fármacos antineoplásicos no DG11 em um de três horários distintos (11:00, 13:00 ou 15:00 hs). Durante esta fase do desenvolvimento embrionário (DG11) do rato, o intervalo de 2 horas corresponde ao tempo médio aproximado de aparecimento de um somito (VICKERS, 1983). Como a “*susceptibilidade aos agentes teratogênicos varia com o estágio de desenvolvimento em que ocorre a exposição*” (Segundo princípio geral da teratologia enunciado por WILSON, 1977) verificamos se diferenças de até 4 horas no horário de tratamento dentro dessa janela de variação do desenvolvimento embrionário modificaria de forma expressiva (qualitativa e/ou quantitativamente) a manifestação do efeito teratogênico dos fármacos utilizados. Como não foi possível identificar modificações dos tipos e frequências de anomalias externas ou esqueléticas (malformações ou variações) entre os diferentes horários de administração, as observações registradas nos três horários foram analisadas conjuntamente. É importante destacar que ratos são animais politóicos e que os diferentes indivíduos de uma mesma ninhada estão em estágios diferentes de desenvolvimento embrionário no DG11 (*i.e.* exibem números diferentes de pares de somitos). Em outras palavras, como já existe uma acentuada variabilidade quanto ao estágio de desenvolvimento entre indivíduos de uma mesma ninhada em um dado horário de administração, a detecção de uma alteração do efeito teratogênico produzida por diferenças de até 4 horas no horário de administração possivelmente exigiria a avaliação de um número de ninhadas maior do que o que foi examinado neste estudo.

As frequências de todas as malformações externas e esqueléticas registradas nos três experimentos são apresentadas nos Anexos de 28 a 35.

4.2.1.1 – TOXICIDADE MATERNA, PERDAS GESTACIONAIS, PESO DO FETO E DA PLACENTA, E ANORMALIDADES MORFOLÓGICAS DETECTADAS NO EXAME EXTERNO.

O ganho de peso materno durante a gravidez, o peso do útero gravídico no DG21 e o número de sítios de implantação são apresentados na Tabela 4.2.1. Os parâmetros analisados por ocasião da cesárea, tais como perdas gestacionais pós-implantação (reabsorções e fetos mortos), tamanho das ninhadas, peso das placentas, peso fetal (DG21), e proporção de fetos com malformações detectadas pelo exame externo são mostrados na Tabela 4.2.2.

Toxicidade materna. Alterações de ganho de peso ao longo da gravidez podem resultar tanto da toxicidade para o organismo materno quanto da toxicidade para o concepto (perdas gestacionais e redução do peso fetal e da placenta). A redução do ganho de peso materno durante toda a gestação (DG 21-0) descontado o peso do útero com todo o seu conteúdo (útero gravídico) ao final da mesma (DG21), entretanto, é um indicador confiável da toxicidade do tratamento para o organismo materno. Como pode ser visto na Tabela 4.2.1, não houve diferenças entre os grupos controle e tratados em relação ao ganho de peso materno subtraído o peso do útero gravídico o que sugere que tanto os dois fármacos (250 mg/kg de HU e 24 mg/kg de 6-MP) administrados isoladamente quanto conjuntamente (HU+6-MP; tratamento concomitante) não causaram toxicidade materna manifesta por diminuição do peso corporal no DG21. Por outro lado, o tratamento com a 6-MP, mas não aquele com a HU, causou redução do peso do útero gravídico o que possivelmente se deveu a redução de peso de fetos e placentas e também ao menor número de fetos por ninhada (perda gestacional). O menor peso do útero gravídico foi notado também no grupo que recebeu o tratamento concomitante HU+6-MP. É importante destacar que, embora não se tenha evidenciado toxicidade materna resultante da administração única de 6-MP (isolada ou com HU) no DG11 ao final da gravidez (DG21), a drástica redução de peso corporal materno nas 24 horas seguintes ao tratamento (DG 12-11) sugere que a 6-MP foi tóxica para a mãe. No DG11 os embriões são muito pequenos, e contribuição do peso deles para o peso total da grávida é mínima e, mesmo havendo perda de conceptos (embriofetividade), estas perdas não explicariam o decréscimo de peso em relação aos grupos controle e tratado com HU apenas. Portanto, os dados indicam que a administração de uma dose única de 6-MP (24 mg/kg) no DG11 foi tóxica para o organismo da mãe, ocorrendo recuperação do peso materno (descontado o peso do útero gravídico) nos dias subsequentes antes do DG21.

Os dados desse experimento da segunda parte do estudo relativos ao tratamento com os dois fármacos isoladamente (HU+NaOH e com 6-MP+Salina, ou vice-versa), reproduziram

o que havia sido observado na primeira parte (curvas dose–efeito), quando as doses de 250 mg/kg de HU e de 24 mg/kg de 6-MP foram testadas (Tabelas 4.1.1 e 4.1.16), *i.e.*, houve um aumento equivalente e significativo de reabsorções por sítios de implantação nos grupos tratados, tanto com 6-MP+Salina, como com e 6-MP+HU, em relação ao grupo que recebeu HU+NaOH, e ao grupo controle não tratado. Além disso, nenhum dos tratamentos produziu toxicidade materna (diminuição do ganho de peso materno – peso do útero) evidenciável no DG21, como já era de se esperar.

De acordo com os resultados descritos na Tabela 4.2.2, podemos afirmar que:

- i) Os tratamentos com 6-MP+Salina e 6-MP+HU, reduziram de forma semelhante à proporção de fetos vivos por sítios de implantação, em relação aos demais grupos experimentais, o que se traduziu por aumento das taxas de reabsorções (perdas pós-implantação). Por outro lado, a administração de 24 mg/kg de 6-MP (grupo 6-MP+Salina) aumentou significativamente a frequência de fetos mortos (por sítios de implantação), o que foi atenuado pelo tratamento concomitante com HU (250 mg/kg), como observado no grupo 6-MP+HU.
- ii) O tratamento com HU (grupo NaOH+HU) não alterou a frequência de fetos malformados (anomalias detectadas pelo exame externo), quando comparada com a observada na prole de ratas controle não tratadas. Já o tratamento com 6-MP causou um aumento substancial da incidência de fetos malformados, que foi atenuado pela administração concomitante de HU.
- iii) No grupo tratado com NaOH+HU, houve uma discreta redução dos pesos dos fetos (fetos individuais como unidade de análise), e dos pesos das placentas (fetos individuais e ninhadas como unidades de análise), em relação ao grupo controle não tratado, que se traduziu na diminuição da razão (%) peso placenta/peso fetal. Este efeito da HU (250 mg/kg) foi de reduzida magnitude, não tendo sido detectado na primeira parte do trabalho (Tabela 4.1.2), possivelmente porque o número de animais observados foi menor.
- iv) O tratamento com 24 mg/kg de 6-MP (grupo 6-MP+Salina) causou reduções significativas dos pesos corporais dos fetos e das placentas, bem como decréscimos da razão peso da placenta/peso fetal (indivíduos e ninhadas como unidades de análise). Os efeitos da 6-MP sobre o peso dos fetos e placentas foram parcialmente antagonizados pela injeção concomitante de HU (grupo 6-MP+HU), e a razão peso da placenta/peso fetal, que traduz a relação entre a magnitude dos efeitos do tratamento sobre ambas as variáveis, foi reduzida

ainda mais. Esta alteração da razão, pela administração concomitante de HU, sugere que a atenuação do efeito da 6-MP sobre o peso do feto foi menor do que a diminuição do efeito da 6-MP sobre o peso da placenta.

5.2.1.1.1 – ANOMALIAS DETECTADAS NO EXAME EXTERNO:

A Tabela 4.2.3 mostra os tipos e as frequências das malformações visíveis ao exame externo registradas nos fetos a termo (DG21).

O tratamento com 6-MP no DG11 aumentou a proporção de fetos apresentando malformações de vários tipos, entre as quais o posicionamento irregular das patas traseiras e dianteiras, polidactilia, 1º dedo das patas maior, bem como um conjunto de defeitos de cauda, sindactilia e micrognatia. Como pode ser visto na Tabela 4.2.3, o aumento da frequência dessas anomalias, causado pela 6-MP, foi antagonizado, total ou parcialmente, pela administração concomitante da HU.

Em síntese, a avaliação do efeito embriotóxico dos antineoplásicos HU e 6-MP, a partir das observações externas feitas por ocasião da cesárea (DG21), indicou que a magnitude da resposta ao tratamento combinado (concomitante) foi menor do que a resposta ao tratamento com 6-MP apenas. Em outras palavras, a HU administrada em dose não-embriotóxica concomitantemente com a 6-MP atenuou as manifestações de embriotoxicidade deste último fármaco na prole exposta, tais como: i) as proporções de fetos mortos e malformados foram menores; ii) os pesos corporais dos fetos à termo (feto individual e ninhada como unidade de análise) aumentaram em relação ao tratamento com 6-MP apenas; iii) os pesos das placentas (placenta individual como unidade de análise) aumentaram em comparação como peso das placentas dos fetos expostos ao 6-MP apenas (a razão peso placenta/peso fetal, entretanto aumentou discretamente); iv) a elevação da frequência de todas as malformações detectadas pelo exame externo foi atenuada.

Tabela 4.2.1: Ganho de peso corporal durante a gravidez de ratas tratadas concomitantemente (DG11) com HU+NaOH, Salina+6-MP ou HU+6MP. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	NaOH+HU ou HU+NaOH	6-MP+Salina ou Salina+6-MP	6-MP+HU ou HU+6-MP
<i>Fêmeas grávidas</i> (N)	17	24	30	29
<i>Reabsorções</i> (N)	11	22	48	41
Por sítios de implantação (%)	5,85	7,53	13,45 ab	12,24 ab
Por implantação por ninhada (%)	7,69 (9,55)	6,91 (11,88)	8,71 (18,75)	9,09 (10,53)
<i>Peso do útero gravídico</i> (g)	74,95 ± 14,58	74,29 ± 14,94	36,76 ± 9,92 ab	41,88 ± 14,21 ab
<i>Ganho de peso materno</i> (Δ g):				
Dia 11-0	50,46 ± 19,06	43,57 ± 9,28	44,55 ± 9,11	43,56 ± 6,03
Dia 12-11	2,99 ± 5,12	2,42 ± 4,63	- 5,12 ± 4,09 ab	- 4,97 ± 5,15 ab
Dia 13-11	9,81 ± 4,67	8,14 ± 4,66	4,80 ± 5,06 a	4,81 ± 4,25 a
Dia 15-11	18,46 ± 5,91	15,94 ± 5,07	13,36 ± 4,42 a	12,66 ± 4,45 a
Dia 21-11	82,54 ± 16,22	81,56 ± 16,89	49,67 ± 10,90 ab	52,23 ± 14,44 ab
Dia 21-0	133,00 ± 23,68	123,20 ± 27,62	94,23 ± 14,72 ab	95,43 ± 19,55 ab
Dia 21-0 - (peso do útero)	58,05 ± 20,04	52,26 ± 11,65	57,46 ± 8,54	53,66 ± 11,68

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. Os dados representados como medianas (Q1-Q3) foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. (Q3-Q1): amplitude interquartilica, calculada pela diferença entre o 3º (Q3) e o 1º quartil (Q1). Os dados representados como média ± d.p foram analisados por ANOVA seguida por teste de Bonferroni. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ NADA; b ≠ NaOH+HU ou HU+NaOH; c ≠ 6-MP+Salina ou Salina+6-MP.

Tabela 4.2.2: Efeito embriotóxico do tratamento concomitante de ratas grávidas com HU+NaOH, Salina+6-MP e HU+6MP (DG11). Análise dos parâmetros obtidos por ocasião da cesárea (DG21). HU: 250 mg/kg ip; 6-MP: 24 mg/kg sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	NaOH+HU ou HU+NaOH	6-MP+Salina ou Salina+6-MP	6-MP+HU ou HU+6-MP
<i>Fêmeas grávidas</i> (N)	17	24	30	29
<i>Sítios de implantação</i> (N)	188	292	357	335
Por ninhada	11,00 (2,00)	12,00 (2,00)	12,00 (1,00)	11,00 (3,00)
<i>Reabsorções</i> (N)	11	22	48	41
Por sítios de implantação (%)	5,85	7,53	13,45 ab	12,24 ab
Por implantação por ninhada (%)	7,69 (9,55)	6,91 (11,88)	8,71 (18,75)	9,09 (10,53)
<i>Fetos mortos</i> (N)	0	0	31	18
Por sítios de implantação (%)	0,00	0,00	8,68 ab	5,57 abc
Por ninhada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,00 (2,00) ab	0,00 (1,00) ab
<i>Fetos vivos</i> (N)	177	270	278	276
Por sítios de implantação (%)	94,15	92,47	77,87 ab	82,39 ab
Por ninhada	11,00 (1,00)	11,50 (2,00)	9,50 (3,00) b	10,00 (5,00)
<i>Fetos malformados</i> (%)	1,12	4,07	68,71 ab	23,19 abc
<i>Peso fetal</i> (g)				
Individual	4,97 ± 0,38	4,70 ± 0,41 a	2,34 ± 0,45 ab	2,85 ± 0,61 abc
Por ninhada (média ± d.p.)	5,00 ± 0,24	4,70 ± 0,27	2,36 ± 0,38 ab	2,79 ± 0,50 abc
<i>Peso das placentas</i> (g)				
Individual	0,49 ± 0,08	0,43 ± 0,07 a	0,17 ± 0,04 ab	0,19 ± 0,04 abc
Por ninhada (média ± d.p.)	0,50 ± 0,05	0,43 ± 0,05 a	0,17 ± 0,03 ab	0,19 ± 0,03 ab
<i>Peso placenta/peso fetal</i> (%)				
Individual	9,98 ± 1,61	9,20 ± 1,41 a	7,47 ± 1,69 ab	6,65 ± 1,36 abc
Por ninhada (média ± d.p.)	10,36 ± 1,18	9,21 ± 0,91 a	7,51 ± 1,08 ab	6,81 ± 0,99 ab

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. Os dados representados como medianas (Q1-Q3) foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. (Q3-Q1): amplitude interquartílica, calculada pela diferença entre o 3º (Q3) e o 1º quartil (Q1). Os dados representados como média ± d.p foram analisados por ANOVA seguida por teste de Bonferroni. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ NADA; b ≠ NaOH+HU ou HU+NaOH; c ≠ 6-MP+Salina ou Salina+6-MP.

Tabela 4.2.3: Tipos e frequências de anomalias detectadas pelo exame externo na prole (DG21) de ratas que receberam tratamento concomitante com HU+NaOH, Salina+6-MP e HU+6MP durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg ip; 6-MP: 24 mg/kg sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	NaOH+HU ou HU+NaOH	6-MP+Salina ou Salina+6-MP	6-MP+HU ou HU+6-MP
Fetos vivos (N)	177	270	278	276
Ninhadas (N)	17	24	29	28
<i>Malformações (%):</i>				
Posição irregular PTE e/ou PTD	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	5,76 ^{ab} (34,48) ^{ab}	0,00 ^c (0,00) ^c
Posição irregular PDE e/ou PDD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,12 ^{ab} (17,24) ^{ab}	0,00 ^c (0,00) ^c
Posição irregular do 2º dedo PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 3º dedo PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 4º dedo PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 5º dedo PTE e/ou PTD	0,56 (5,88)	1,48 (16,67)	0,36 (3,45)	0,36 (3,57)
Polidactilia PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	25,54 ^{ab} (75,86) ^{ab}	3,26 ^{abc} (17,86) ^c
Sindactilia PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,08 (3,45)	0,00 (0,00)
Sindactilia PDE e/ou PDD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,16 ^b (6,90)	0,00 ^c (0,00)
1º dedo da PTE e/ou PTD maior	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	36,69 ^{ab} (79,31) ^{ab}	5,07 ^{abc} (17,86) ^{abc}
Ausência de 1 ou mais dedos na PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
Ausência de 1 ou mais dedos na PDE e/ou PDD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,44 (6,90)	0,00 (0,00)
1º dedo da PTE e/ou PTD maior	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	36,69 ^{ab} (79,31) ^{ab}	5,07 ^{abc} (17,86) ^{abc}

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq NADA; b \neq NaOH+HU ou HU+NaOH; c \neq 6-MP+HU ou HU+6-MP. PTE e PTD: patas traseiras, esquerda e direita.

(Cont.) Tabela 4.2.3: Tipos e frequências de anomalias detectadas pelo exame externo na prole (DG21) de ratas que receberam tratamento concomitante com HU+NaOH, Salina+6-MP e HU+6MP durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg ip; 6-MP: 24 mg/kg sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	NaOH+HU ou HU+NaOH	6-MP+SALINA ou SALINA+6-MP	6-MP+HU ou HU+6-MP
Fetos vivos (N)	177	270	278	276
Ninhadas (N)	17	24	29	28
<i>Malformações (%):</i>				
Cauda curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,16 ^b (13,79)	0,00 ^c (0,00)
Cauda encrespada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,32 ^{ab} (34,48) ^{ab}	0,00 ^c (0,00) ^c
Cauda curta e encrespada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	8,27 ^{ab} (34,48) ^{ab}	0,72 ^c (7,14) ^c
Cauda curta com ponta curva	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,12 ^{ab} (37,93) ^{ab}	0,36 ^c (3,57) ^c
Cauda com ponta curva	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,96 ^{ab} (24,14) ^{ab}	0,00 ^c (0,00) ^c
Cauda curta, encrespada, com ponta curva	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
Ponta de cauda	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,08 (6,90)	0,00 (0,00)
Forma irregular da orelha direita	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,57)
Protusão da língua	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	69,06 ^{ab} (100,00) ^{ab}	28,26 ^{abc} (67,86) ^{abc}
Micrognatia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,16 ^b (10,34)	0,36 (3,57)

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq NADA; b \neq NaOH+HU ou HU+NaOH; c \neq 6-MP+HU ou HU+6-MP.

4.2.1.2 – ANORMALIDADES DO ESQUELETO FETAL

O exame detalhado e sistemático do esqueleto fetal, após a diafanização das partes moles e a coloração das estruturas calcificadas com *Alizarina red S*, constitui uma das abordagens mais sensíveis para evidenciar e quantificar o efeito de agentes teratogênicos como o HU e a 6-MP, em roedores. Como esperado, o registro sistemático de todos os achados em exames de esqueleto fetal (todos os ossos) produziu um grande volume de dados, incluindo alterações geralmente classificadas, para fins de identificação do perigo (*hazard identification*) ou avaliação do risco (*risk assessment*), como “malformações” ou “variações” (CARNEY & KIMMEL, 2007; CHAHOUD & PAUMGARTTEN, 2009). Um quadro completo com todas as observações registradas é apresentado nos Anexos de 36 a 46. Tal como foi feito na seção anterior para as alterações registradas por ocasião da cesárea, as anormalidades do esqueleto fetal foram reunidas e analisadas conjuntamente, *i.e.*, os achados dos experimentos relativos aos 3 horários de tratamento foram reunidos em um conjunto único de dados. Os dados de anormalidades esqueléticas obtidos separadamente nos três estudos realizados (11:00, 13:00 e 15:00 horas) são mostrados nos Anexos de 28 a 35. Nas Tabelas que se seguem, são apresentados apenas os achados (malformações e/ou variações) cujas alterações foram consideradas mais relevantes para os objetivos deste estudo, separadas de acordo com a localização no esqueleto, *i.e.*, regiões do esqueleto axial (Tabelas 4.2.4 a 4.2.11) ou do esqueleto apendicular (Tabelas 4.2.12 a 4.2.15).

5.2.1.2.1 – ESQUELETO AXIAL:

Crânio:

As anormalidades de ossos do crânio registradas no experimento para investigar o efeito da administração concomitante dos dois fármacos são apresentadas na Tabela 4.2.4.

A HU (250 mg/kg), administrada no DG11 causou aumento pequeno, porém significativo da incidência de algumas anomalias geralmente classificadas como malformação (fusão do osso zigomático), e variação (osso exoccipital incompleto; distância maior entre os ossos da mandíbula) em ossos do crânio.

O tratamento com 6-MP (6-MP 24 mg/kg), por outro lado, resultou em acentuado aumento da incidência das anomalias anteriormente mencionadas. Esse efeito da 6-MP sobre os ossos do crânio foi, na maioria dos casos, atenuado pela co-administração de HU (6-MP+HU, concomitante), *i.e.*, a HU antagonizou o aumento da frequências de fusão no osso

zigomático, ossos nasal e exoccipital incompletos, e distância maior entre ossos parietais, palatinos e mandibulares, causados pela 6-MP. Cabe notar que os efeitos atenuadores ocorreram, mesmo com ocorrências para as quais 250 mg/kg de HU estava acima dos respectivos NOAELs.

A prole das ratas tratadas apenas com HU (250 mg/kg; grupo HU+NaOH) não diferiu daquela das ratas do grupo controle não-tratado, quanto à frequência de fetos apresentando ossos timpânicos mais curtos. A 6-MP, por outro lado, causou discreto aumento da frequência desta malformação (3,2%, no grupo 6-MP+Salina), em relação à incidência registrada no grupo controle. Destoando dos demais casos, em relação a esta observação (timpânico mais curto), o tratamento combinado 6-MP+HU (concomitante), levou a uma incidência da anomalia (7,6 %) maior do que aquela que foi registrada na prole exposta apenas a 6-MP. É interessante notar que a curva dose-efeito para a HU (Tabela 4.1.4) indica que a dose de 500 mg/kg deste fármaco administrada no GD11 é capaz de aumentar a incidência desta anomalia (8,49%) em relação ao observado no grupo controle não-tratado (0,0%). As incidências aumentadas (em comparação com o grupo controle não tratado) de fetos com fissura no osso basoesfenoide, ou com osso supraoccipital incompleto, foram equivalentes entre os grupos tratados com 6-MP+Salina e 6-MP+HU.

A Tabela 4.2.5 apresenta observações relativas às frequências de anormalidades (intensidade e homogeneidade) do processo calcificação dos ossos do crânio (*e.g.* ossos esponjosos, pobremente ossificados). Neste aspecto a 6-MP aumentou as incidências de um vasto repertório de ossos cranianos com alteração da intensidade da ossificação (*i.e.*, ossos não calcificados e pobremente calcificados). O tratamento combinado HU+6-MP (concomitante) atenuou os efeitos da 6-MP sobre a ossificação dos ossos do crânio, com exceção das anormalidades descritas como osso exoccipital esponjoso. As incidências dessa anomalia, por exemplo, não foram alteradas significativamente pelo tratamento somente com HU (grupo HU+NaOH), nem pelo tratamento apenas com 6-MP (grupo 6-MP+Salina). Entretanto, na prole exposta conjuntamente a HU e 6-MP houve um expressivo aumento da incidência dessa anomalia, o que sugere uma potenciação de efeitos.

Tabela 4.2.4: Tipos e frequências de anormalidades (malformações) de ossos do crânio induzidas na prole (DG21) de ratas que receberam tratamento concomitante com HU+NaOH, Salina+6-MP e HU+6MP, durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Salina+6-MP ou 6-MP+Salina	HU+6MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas (N)</i>	17	24	29	28
<i>Malformações (%):</i>				
Fusão do osso zigomático com processo jugular do maxilar	0,56 (5,88)	5,56 ^a (33,33)	29,50 ^{ab} (79,31) ^{ab}	14,13 ^{abc} (71,43) ^{ab}
Osso nasal incompleto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	67,27 ^{ab} (100,00) ^{ab}	47,83 ^{abc} (96,43) ^{ab}
Osso frontal incompleto	2,26 (11,76)	2,59 (12,50)	88,13 ^{ab} (100,00) ^{ab}	81,16 ^{ab} (96,43) ^{ab}
Osso exoccipital incompleto	0,00 (0,00)	3,33 ^a (25,00) ^a	61,87 ^{ab} (96,55) ^{ab}	51,09 ^{abc} (96,43) ^{ab}
Osso timpânico mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,24 ^{ab} (17,24)	7,61 ^{abc} (33,33) ^{ab}
Fissura no basoesfenoide	2,26 (23,53)	2,59 (20,83)	22,30 ^{ab} (79,31) ^{ab}	22,10 ^{ab} (78,57) ^{ab}
Distância maior entre os ossos parietais	0,56 (5,88)	1,85 (16,67)	84,53 ^{ab} (96,55) ^{ab}	60,14 ^{abc} (67,86) ^{abc}
Distância maior entre os ossos palatinos	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	19,78 ^{ab} (48,28) ^{ab}	7,61 ^{abc} (32,14) ^{ab}
Distância maior entre os ossos da mandíbula	0,00 (0,00)	6,67 ^a (25,00) ^a	78,42 ^{ab} (100,00) ^{ab}	50,00 ^{abc} (82,14) ^{abc}

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq NADA; b \neq NaOH+HU ou HU+NaOH; c \neq 6-MP+HU ou HU+6-MP. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Tabela 4.2.5: Tipos e frequências de anormalidades (variações) de ossos do crânio induzidas na prole (DG21) de ratas que receberam tratamento concomitante com HU+NaOH, Salina+6-MP e HU+6MP, durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg ip; 6-MP: 24 mg/kg sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Salina+6-MP ou 6-MP+Salina	HU+6MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas (N)</i>	17	24	29	28
<i>Alterações (%):</i>				
Osso nasal esponjoso	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,04 ^{ab} (6,90)	0,00 ^c (0,00)
Osso interparietal esponjoso	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	4,68 ^{ab} (17,24)	0,00 ^c (0,00)
Osso supraoccipital esponjoso	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	72,66 ^{ab} (96,55) ^{ab}	40,58 ^{abc} (60,71) ^{abc}
Osso exoccipital esponjoso	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,80 (6,90)	21,38 ^{abc} (28,57) ^{abc}
Osso escamoso esponjoso	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,47 ^{ab} (37,93) ^{ab}	0,36 ^c (3,57) ^c
Osso nasal pobremente calcificado	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	98,56 ^{ab} (100,00) ^{ab}	80,80 ^{abc} (96,43) ^{ab}
Osso frontal pobremente calcificado	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	99,28 ^{ab} (100,00) ^{ab}	81,16 ^{abc} (96,43) ^{ab}
Osso parietal pobremente calcificado	1,13 (11,76)	0,00 (0,00)	99,28 ^{ab} (100,00) ^{ab}	83,70 ^{abc} (96,43) ^{ab}
Osso interparietal pobremente calcificado	2,82 (29,41)	2,59 (25,00)	96,40 ^{ab} (100,00) ^{ab}	86,96 ^{abc} (96,43) ^{ab}
Osso supraoccipital não calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,04 ^{ab} (27,59) ^{ab}	1,09 ^c (7,14) ^c

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ NADA; b ≠ NaOH+HU ou HU+NaOH; c ≠ 6-MP+HU ou HU+6-MP. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

(Cont.) Tabela 4.2.5: Tipos e frequências de anormalidades (variações) de ossos do crânio induzidas na prole (DG21) de ratas que receberam tratamento concomitante com HU+NaOH, Salina+6-MP e HU+6MP, durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Salina+6-MP ou 6-MP+Salina	HU+6MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas (N)</i>	17	24	29	28
<i>Alterações (%):</i>				
Osso timpânico pobremente calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	84,89 ^{ab} (100,00) ^{ab}	63,41 ^{abc} (100,00) ^{ab}
Osso gonialo pobremente calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	78,06 ^{ab} (100,00) ^{ab}	50,36 ^{abc} (100,00) ^{ab}
Osso escamoso pobremente calcificado	1,13 (11,76)	1,85 (20,83)	98,20 ^{ab} (100,00) ^{ab}	95,29 ^{abc} (100,00) ^{ab}
Processo jugular do osso escamoso pobremente calcificado	0,56 (5,88)	1,48 (16,67)	97,84 ^{ab} (100,00) ^{ab}	92,03 ^{abc} (100,00) ^{ab}
Osso zigomático pobremente calcificado	0,56 (5,88)	1,48 (16,67)	97,48 ^{ab} (100,00) ^{ab}	92,39 ^{abc} (100,00) ^{ab}
Osso maxilar pobremente calcificado	0,56 (5,88)	0,74 (8,33)	97,84 ^{ab} (100,00) ^{ab}	88,77 ^{abc} (100,00) ^{ab}
Processo jugular do maxilar pobremente calcificado	0,56 (5,88)	0,74 (8,33)	97,84 ^{ab} (100,00) ^{ab}	88,77 ^{abc} (100,00) ^{ab}
Osso premaxilar pobremente calcificado	0,56 (5,88)	0,74 (8,33)	97,84 ^{ab} (100,00) ^{ab}	88,13 ^{abc} (100,00) ^{ab}
Osso lacrimal pobremente calcificado	0,56 (5,88)	0,74 (8,33)	97,84 ^{ab} (100,00) ^{ab}	86,59 ^{abc} (100,00) ^{ab}
Lâmina orbital do osso frontal pobremente calcificada	0,56 (5,88)	0,74 (8,33)	97,84 ^{ab} (100,00) ^{ab}	86,96 ^{abc} (100,00) ^{ab}
Osso vômer pobremente calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	43,17 ^{ab} (72,41) ^{ab}	25,36 ^{abc} (42,86) ^{abc}
Osso palatino pobremente calcificado	3,39 (29,41)	4,07 (41,67)	98,20 ^{ab} (100,00) ^{ab}	89,49 ^{abc} (100,00) ^{ab}
Osso presfenoide não calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	8,99 ^{ab} (37,93) ^{ab}	1,09 ^c (7,14) ^c
Osso orbitoesfenoide pobremente calcificado	3,39 (29,41)	5,56 (37,50)	94,24 ^{ab} (96,55) ^{ab}	85,14 ^{abc} (100,00) ^{ab}
Mandíbula pobremente calcificada	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	93,53 ^{ab} (100,00) ^{ab}	69,57 ^{abc} (100,00) ^{ab}

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq NADA; b \neq NaOH+HU ou HU+NaOH; c \neq 6-MP+HU ou HU+6-MP. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Coluna vertebral:

A incidência de anormalidades de ossos da coluna vertebral de fetos a termo (DG21) expostos aos antineoplásicos no DG11 é apresentada nas Tabelas 4.2.6 e 4.2.7.

Como indicado na Tabela 4.2.6 a administração conjunta de HU e 6-MP diminuiu, significativamente, as frequências de várias anomalias classificadas como malformações ou variações, em relação às frequências registradas após o tratamento com 6-MP apenas (grupo 6-MP+Salina). Neste sentido, há uma clara redução da ocorrência de corpos vertebrais lombares desalinhados, corpos vertebrais sacrais com forma irregular, arcos vertebrais cervicais pouco ossificados, centro de ossificação com forma tipo “*dumb-bell*” em corpos vertebrais torácicos, e interrupção do fechamento de corpos vertebrais lombares e sacrais. A administração concomitante de HU, entretanto, não interferiu com os efeitos da 6-MP sobre a frequência de corpos vertebrais lombares com forma irregular, ou com centros de ossificação com forma tipo “*dumb-bell*” em corpos vertebrais torácicos.

As anormalidades de intensidade de calcificação são mostradas na Tabela 4.2.7. Neste aspecto, via de regra, os aumentos das proporções de ossos pouco ou não ossificados, causados pela 6-MP, também foram atenuados pela administração conjunta de HU e 6-MP (concomitante).

Costelas:

As anormalidades das costelas, registradas no experimento de administração conjunta e concomitante de HU e 6-MP, são mostradas nas Tabelas 4.2.8 e 4.2.9. A HU também atenuou os efeitos da 6-MP sobre a morfologia dos ossos da costela, ou seja, reduziu o aumento da incidência de malformações e de retardos de ossificação (variações) provocado pela 6-MP.

Esterno:

As Tabelas 4.2.10 e 4.2.11 mostram as incidências de anormalidades do esterno registradas no DG21, após a administração de HU e 6-MP no DG11. De forma análoga ao constatado no crânio e costelas, a administração conjunta HU+6-MP atenuou os aumentos das incidências de todas as anomalias (malformações e alterações de ossificação) induzidas pela 6-MP, com exceção da observação “todas as esternibras pobremente calcificadas” (Tabela 4.2.11). Neste último caso, o tratamento conjunto com HU+6-MP (concomitante) resultou em aumento da frequência registrada, em relação à administração apenas de 6-MP ou de HU, consistente com uma potenciação de efeitos.

Tabela 4.2.6: Tipos e frequências de anormalidades (malformações) de ossos da coluna vertebral induzidas na prole (DG21) de ratas que receberam tratamento concomitante com HU+NaOH, Salina+6-MP e HU+6MP, durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Salina+6-MP ou 6-MP+Salina	HU+6MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	270	278	278
<i>Ninhadas (N)</i>	17	24	29	28
<i>Malformações (%):</i>				
Ossificação incompleta de 1-todos arcos vertebrais cervicais	1,69 (11,76)	1,11 (12,50)	77,77 ^{ab} (93,10) ^{ab}	57,61 ^{ab} (92,86) ^{ab}
Centros de ossificação de 1-6 corpos vertebrais torácicos em forma de <i>dumb-bell</i>	4,52 (29,41)	2,22 (25,00)	20,37 ^{ab} (68,97) ^{ab}	10,14 ^{abc} (46,43)
Forma irregular de 1-6 corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	1,48 (16,67)	7,04 ^{ab} (37,93) ^a	5,43 ^{ab} (39,29) ^a
Interrupção do processo de fechamento de 1-todos os corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	0,74 (8,33)	26,62 ^{ab} (62,07) ^{ab}	10,87 ^{abc} (50,00) ^{ab}
Centros de ossificação de 1-6 corpos vertebrais lombares em forma de <i>dumb-bell</i>	1,69 (11,76)	2,22 (20,83)	10,74 ^{ab} (37,93)	11,96 ^{ab} (60,71)
1-6 corpos vertebrais lombares desalinhados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	9,26 ^{ab} (44,83) ^{ab}	3,99 ^{abc} (25,00) ^{ab}
Forma irregular de 1-todos corpos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	18,35 ^{ab} (51,72) ^{ab}	6,16 ^{abc} (39,29) ^{ab}
Interrupção do processo de fechamento de 1-todos corpos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	18,35 ^{ab} (51,72) ^{ab}	7,97 ^{abc} (39,29) ^{ab}

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq NADA; b \neq NaOH+HU ou HU+NaOH; c \neq 6-MP+HU ou HU+6-MP. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Tabela 4.2.7: Tipos e frequências de anormalidades (variações) de ossos da coluna vertebral induzidas na prole (DG21) de ratas que receberam tratamento concomitante com HU+NaOH, Salina+6-MP e HU+6MP, durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Salina+6-MP ou 6-MP+Salina	HU+6MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas (N)</i>	17	24	29	28
<i>Alterações (%):</i>				
1-7 corpos vertebrais cervicais não calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	47,84 ^{ab} (86,21) ^{ab}	21,71 ^{abc} (53,57) ^{ab}
Todas as 7 vértebras cervicais pobremente calcificadas	1,69 (17,65)	1,48 (16,67)	98,56 ^{ab} (100,00) ^{ab}	86,96 ^{abc} (100,00) ^{ab}
1-13 vértebras torácicas pobremente calcificadas	18,18 (17,65)	1,48 (16,67)	98,56 ^{ab} (100,00) ^{ab}	90,22 ^{abc} (100,00) ^{ab}
1-6 vértebras lombares pobremente calcificadas	2,26 (17,65)	2,59 (29,17)	98,56 ^{ab} (100,00) ^{ab}	92,75 ^{abc} (100,00) ^{ab}
1-4 vértebras sacrais não calcificadas	0,00 (0,00)	1,11 (4,17)	15,47 ^{ab} (44,83)	0,36 ^c (3,57) ^c
1-4 corpos vertebrais sacrais não calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,24 ^{ab} (10,34)	0,00 ^c (0,00)
1-4 vértebras sacrais pobremente calcificadas	3,39 (29,41)	4,81 (41,67)	96,76 ^{ab} (100,00) ^{ab}	97,10 ^{ab} (100,00) ^{ab}
1-2 vértebras caudais não calcificadas	2,82 (29,41)	0,37 (4,17)	64,39 ^{ab} (96,55) ^{ab}	40,94 ^{abc} (75,00) ^{ab}
1-2 arcos vertebrais caudais não calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	16,55 ^{ab} (58,62) ^{ab}	29,35 ^{abc} (46,43) ^{abc}
1-2 vértebras caudais pobremente calcificadas	22,60 (64,71)	15,19 (66,67)	31,29 (68,62)	80,80 ^{abc} (96,43) ^{abc}
1-2 arcos vertebrais caudais pobremente calcificados	0,56 (5,88)	0,37 (4,17)	18,71 ^{ab} (37,93) ^{ab}	0,00 ^c (0,00) ^c

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq NADA; b \neq NaOH+HU ou HU+NaOH; c \neq 6-MP+HU ou HU+6-MP. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Tabela 4.2.8: Tipos e frequências de anormalidades (malformações) de ossos da costela induzidas na prole (DG21) de ratas que receberam tratamento concomitante com HU+NaOH, Salina+6-MP e HU+6MP, durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Salina+6-MP ou 6-MP+Salina	HU+6MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas (N)</i>	17	24	29	28
<i>Malformações (%)</i> :				
1 a 13 costelas mais curtas	15,82 (76,47)	25,56 ^a (87,50) ^a	87,05 ^{ab} (96,55) ^b	75,00 ^{abc} (100,00) ^a

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq NADA; b \neq NaOH+HU ou HU+NaOH; c \neq 6-MP+HU ou HU+6-MP. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Tabela 4.2.9: Tipos e frequências de anormalidades (variações) de ossos da costela induzidas na prole (DG21) de ratas que receberam tratamento concomitante com HU+NaOH, Salina+6-MP e HU+6MP, durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Salina+6-MP ou 6-MP+Salina	HU+6MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas (N)</i>	17	24	29	28
<i>Alterações (%):</i>				
1-13 costelas pobremente calcificadas	1,11 (5,88)	6,30 ^a (33,33)	96,76 ^{ab} (100,00) ^{ab}	90,22 ^{abc} (100,00) ^{ab}

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq NADA; b \neq NaOH+HU ou HU+NaOH; c \neq 6-MP+HU ou HU+6-MP. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Tabela 4.2.10: Tipos e frequências de anormalidades (malformações) de ossos do esterno induzidas na prole (DG21) de ratas que receberam tratamento concomitante com HU+NaOH, Salina+6-MP e HU+6MP, durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg ip; 6-MP: 24 mg/kg sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Salina+6-MP ou 6-MP+Salina	HU+6MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas (N)</i>	17	24	29	28
<i>Malformações (%):</i>				
Forma irregular da 1ª esternebra	1,13 (11,76)	2,96 (25,00)	16,55 ^{ab} (55,17) ^{ab}	8,70 ^{abc} (57,14) ^{ab}
1ª esternebra menor	0,56 (5,88)	0,37 (4,17)	33,81 ^{ab} (89,66) ^{ab}	10,87 ^{abc} (46,43) ^{abc}
2ª esternebra menor	1,69 (11,76)	0,74 (8,33)	28,06 ^{ab} (82,76) ^{ab}	17,03 ^{abc} (67,86) ^{ab}
2ª esternebra dividida	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	10,43 ^{ab} (58,62) ^{ab}	0,72 ^c (7,14) ^c
3ª esternebra menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,40 ^{ab} (34,48) ^{ab}	1,09 ^c (7,14) ^c
3ª esternebra dividida	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	12,59 ^{ab} (48,28) ^{ab}	1,45 ^c (14,29) ^c
4ª esternebra menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	13,31 ^{ab} (62,07) ^{ab}	9,78 ^{ab} (50,00) ^{ab}
4ª esternebra dividida	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	15,11 ^{ab} (65,52) ^{ab}	6,88 ^{abc} (42,86) ^{ab}

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq NADA; b \neq NaOH+HU ou HU+NaOH; c \neq 6-MP+HU ou HU+6-MP. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Tabela 4.2.11: Tipos e frequências de anormalidades (variações) de ossos do esterno induzidas na prole (DG21) de ratas que receberam tratamento concomitante com HU+NaOH, Salina+6-MP e HU+6MP, durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg ip; 6-MP: 24 mg/kg sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Salina+6-MP ou 6-MP+Salina	HU+6MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas (N)</i>	17	24	29	28
<i>Alterações (%):</i>				
1 ^a esternebra não calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	8,63 ^{ab} (41,38) ^{ab}	0,00 ^c (0,00) ^c
1 ^a esternebra pobremente calcificada	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	75,90 ^{ab} (100,00) ^{ab}	57,25 ^{abc} (89,29) ^{ab}
2 ^a esternebra não calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	14,03 ^{ab} (58,62) ^{ab}	3,26 ^{abc} (25,00) ^{abc}
2 ^a esternebra pobremente calcificada	0,00 (0,00)	0,74 (8,33)	71,22 ^{ab} (100,00) ^{ab}	53,99 ^{abc} (89,29) ^{ab}
4 ^a esternebra não calcificada	0,00 (0,00)	1,11 (12,50)	16,55 ^{ab} (62,07) ^{ab}	5,43 ^{abc} (28,57) ^{ac}
Todas as esternebbras não calcificadas	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	7,55 ^{ab} (37,93) ^{ab}	2,17 ^{bc} (14,29)
Todas as esternebbras pobremente calcificadas	1,13 (11,76)	2,22 (16,67)	3,96 (31,03)	23,91 ^{abc} (64,29) ^{abc}

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq NADA; b \neq NaOH+HU ou HU+NaOH; c \neq 6-MP+HU ou HU+6-MP. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

4.2.1.2.2 - ESQUELETO APENDICULAR:

4.2.1.2.2.1 – MEMBROS ANTERIORES:

As Tabelas 4.2.12 e 4.2.13 mostram as anormalidades registradas nos ossos da cinta peitoral e das patas dianteiras.

A administração conjunta HU+6-MP atenuou os aumentos das incidências de malformações estruturais severas, tais como defeitos de forma, alterações no tamanho e fusões entre dedos causados pela 6-MP. As frequências de fetos com processo deltoide irregular e 5º metacarpo menor, todavia, foram semelhantes nos grupos tratados com 6-MP+Salina e 6-MP+HU. A administração apenas de 6-MP diminuiu a incidência de falange do 2º dedo menor, em comparação ao registrado no grupo controle não tratado, enquanto no grupo exposto conjuntamente a 6-MP/HU (concomitante), houve uma reversão deste aparente efeito protetor.

A Tabela 4.2.13 mostra as frequências de fetos com alterações na intensidade da calcificação de ossos dos membros anteriores. Em alguns casos, o aumento das incidências de ossos com diminuição da intensidade de calcificação (pobrememente calcificados), induzido pela 6-MP (grupo 6-MP+Salina), foi atenuado pelo tratamento concomitante com HU (6-MP+HU). Neste sentido, a HU diminuiu as proporções de fetos expostos a 6-MP com todas as falanges não calcificadas, com metacarpos pobrememente calcificados (2º, 3º e 4º metacarpos) e não calcificados (5º metacarpo).

O tratamento concomitante com 6MP+HU, por outro lado, aumentou a frequência de alguns registros de alterações de intensidade de calcificação, em relação ao tratamento com 6-MP. Neste sentido, é plausível supor que:

- i) Em relação aos registros de “todos” os metacarpos, e do 5º metacarpo pobrememente ossificados, os aumentos observados seriam compatíveis com uma adição dos efeitos da HU e da 6-MP, uma vez que as frequências registradas nos grupos HU+NaOH, 6-MP+Salina e 6-MP+HU foram de 10,0%, 48,0% e 62,0% para a primeira anomalia, e de 4,0%, 7,6% e 11,6%, para a segunda.
- ii) Em relação aos registros de falanges do 4º dedo e do 2º metacarpo não calcificadas, os aumentos observados no grupo 6-MP+HU não seriam explicados por adição de efeitos, e, nestes casos, há uma aparente potenciação desses efeitos.

As incidências de fetos apresentando os ossos da ulna, úmero, clavícula e escápula pobremente calcificadas, e as falanges do 2° e 3° dedos não calcificadas, não diferiram entre os grupos 6-MP+Salina e 6-MP+HU.

Tabela 4.2.12: Tipos e frequências de anormalidades (malformações) dos ossos dos membros anteriores registradas na prole (DG21) de ratas tratadas concomitantemente com HU+NaOH, Salina+6MP e HU+6-MP, durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg ip; 6-MP: 24 mg/kg sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Salina+6-MP ou 6-MP+Salina	HU+6MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas (N)</i>	17	24	29	28
<i>Malformações (%):</i>				
Ulna mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,40 ^{ab} (17,24)	0,72 ^c (3,57)
Ulna torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,32 ^{ab} (27,59) ^{ab}	0,00 ^c (0,00) ^c
Osso rádio torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,96 ^{ab} (17,24)	0,00 ^c (0,00)
Osso rádio mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,24 ^{ab} (17,24)	0,00 ^c (0,00)
Forma irregular do processo deltoide	23,16 (82,35)	19,63 (75,00)	4,68 ^{ab} (24,14) ^{ab}	5,07 ^{ab} (25,00) ^{ab}
Falange proximal do 2° dedo menor	25,42 (82,35)	18,52 (70,83)	3,24 ^{ab} (10,34) ^{ab}	10,87 ^{abc} (35,71) ^{abc}
Falange proximal do 3° dedo menor	2,26 (23,53)	3,33 (33,33)	26,62 ^{ab} (79,31) ^{ab}	11,59 ^{abc} (57,14) ^a
Falange proximal do 4° dedo menor	10,17 (58,82)	10,00 (50,00)	22,30 ^{ab} (68,97)	7,61 ^{ac} (42,86)
Fusão entre 2° e 3° + 3° e 4° dedos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,16 ^b (6,90)	0,00 ^c (0,00)
5° Metacarpo menor	0,00 (0,00)	0,74 (8,33)	34,89 ^{ab} (72,41) ^{ab}	35,87 ^{ab} (85,71) ^{ab}

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq NADA; b \neq NaOH+HU ou HU+NaOH; c \neq 6-MP+HU ou HU+6-MP. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Tabela 4.2.13: Tipos e frequências de anormalidades (variações) dos ossos dos membros anteriores registradas na prole (DG21) de ratas tratadas concomitantemente com HU+NaOH, Salina+6MP e HU+6-MP, durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg ip; 6-MP: 24 mg/kg sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Salina+6-MP ou 6-MP+Salina	HU+6MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas (N)</i>	17	24	29	28
<i>Alterações (%):</i>				
Clavícula pobremente calcificada	0,56 (5,88)	4,81 ^a (33,33)	96,76 ^{ab} (100,00) ^{ab}	86,23 ^{abc} (100,00) ^{ab}
Escápula pobremente calcificada	0,56 (5,88)	5,19 ^a (37,50) ^a	96,40 ^{ab} (100,00) ^{ab}	86,23 ^{ab} (100,00) ^{ab}
Úmero pobremente calcificado	0,56 (5,88)	5,19 ^a (37,50) ^a	97,48 ^{ab} (100,00) ^{ab}	86,96 ^{ab} (100,00) ^{ab}
Ulna pobremente calcificada	0,56 (5,88)	5,56 ^a (37,50) ^a	96,76 ^{ab} (100,00) ^{ab}	87,32 ^{abc} (100,00) ^{ab}
Ossos rádio pobremente calcificado	0,56 (5,88)	5,19 ^a (37,50) ^a	97,48 ^{ab} (100,00) ^{ab}	87,32 ^{ab} (100,00) ^{ab}
Metacarpos pobremente calcificados	0,56 (5,88)	10,00 ^a (62,50) ^a	47,84 ^{ab} (96,55) ^{ab}	61,96 ^{abc} (89,29) ^{ab}
2º metacarpo pobremente calcificado	0,56 (5,88)	4,81 ^a (12,50)	48,56 ^{ab} (93,10) ^{ab}	25,72 ^{abc} (82,14) ^{ab}
3º metacarpo pobremente calcificado	0,56 (5,88)	2,96 (12,50)	49,28 ^{ab} (93,10) ^{ab}	26,45 ^{abc} (82,14) ^{ab}
4º metacarpo pobremente calcificado	0,56 (5,88)	2,96 (12,50)	48,20 ^{ab} (93,10) ^{ab}	25,72 ^{abc} (82,14) ^{ab}
5º metacarpo pobremente calcificado	1,69 (11,76)	4,07 (4,17)	7,55 ^a (51,72) ^{ab}	11,59 ^{ab} (46,43) ^{ab}
2º metacarpo não calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,54 ^{abc} (6,45)
5º metacarpo não calcificado	0,56 (5,88)	3,33 (4,17)	45,32 ^{ab} (82,76) ^{ab}	26,45 ^{abc} (71,43) ^{ab}
Falanges proximais não calcificadas	1,13 (5,88)	1,11 (8,33)	33,45 ^{ab} (79,31) ^{ab}	11,23 ^{abc} (46,43) ^{abc}
Falange proximal do 2º dedo não calcificada	16,38 (70,59)	15,93 (58,33)	63,31 ^{ab} (89,66) ^b	67,75 ^{ab} (96,43) ^{ab}
Falange proximal do 3º dedo não calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,16 ^b (13,79)	4,35 ^{ab} (32,14) ^{ab}
Falange proximal do 4º dedo não calcificada	1,69 (17,65)	1,85 (20,83)	7,91 ^{ab} (48,28) ^b	30,43 ^{abc} (67,86) ^{ab}

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ NADA; b ≠ NaOH+HU ou HU+NaOH; c ≠ 6-MP+HU ou HU+6-MP. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

4.2.1.2.2.2 – MEMBROS POSTERIORES:

As frequências de fetos com registros de anormalidades nos ossos da cinta pélvica e das patas traseiras são apresentadas nas Tabelas 4.2.14 e 4.2.15.

De forma semelhante ao constatado no exame do esqueleto axial e dos membros anteriores, a administração conjunta de HU e 6-MP (concomitante) antagonizou também, o aumento de anormalidades de ossos dos membros posteriores causado pela 6-MP. Neste sentido, a HU antagonizou o aumento da incidência de anormalidades de ossos longos da pata traseira, tais como: tíbia torta ou mais curta, ausência de fêmur, fêmur mais curto, constrição do fêmur, e polidactilia. A HU também atenuou o aumento da incidência de dedos mais longos induzido pela 6-MP. (Tabela 4.2.14).

Em relação à ocorrência de falanges menores, cujas incidências foram relativamente altas, e similares nos grupos controle e tratado com HU+NaOH, as frequências foram significativamente menores no grupo tratado com 6-MP+Salina. Neste caso, no grupo tratado concomitantemente com os dois fármacos, a incidência de “falanges menores” aumentou em relação ao registrado no grupo que recebeu 6-MP+Salina, mas foi menor do que a frequência registrada no grupo controle não-tratado e tratado apenas com HU. Esse comportamento indica que o aparente efeito “protetor” da 6-MP, em relação ao aparecimento desta anormalidade (falanges menores), foi atenuado pelo tratamento concomitante com HU.

Os dados apresentados na Tabela 4.2.15 mostram que o tratamento combinado HU+6-MP (concomitante) antagonizou o aumento da frequência de “púbis não calcificado”, notado no grupo exposto a 6-MP (grupo 6-MP+salina), o que não ocorreu para as observações de “ossos pobremente calcificados (ossificados)”, relativas aos fêmures, fíbulas, tíbias, ílios, púbis e ísquios. As incidências dessas diminuições de intensidade de ossificação, em comparação com o grupo controle não-tratado, não foram alteradas pela exposição a HU apenas.

A observação “2º metatarso não calcificado”, cuja incidência foi aumentada pelo tratamento com 6-MP (6-MP e veículo), não foi registrada no grupo exposto concomitantemente aos dois fármacos. Por outro lado, a elevação das incidências de “4º e 5º metatarsos pobremente calcificados”, não foram modificadas pela exposição combinada HU+6-MP, a qual, no entanto, resultou em discreto aumento na frequência do “1º metacarpo não calcificado” que poderia ser interpretado como devido à adição de efeitos.

Em síntese, a administração combinada e concomitante HU+6-MP resultou em aumentos ou em diminuições das incidências de falanges com alterações de intensidade de ossificação. Em ambos os casos, a modificação do efeito observado com a administração dos

fármacos HU e 6-MP isoladamente (monotratamento), indica que a HU antagonizou o efeito da 6-MP, quer ele tenha sido “protetor” (diminuição da incidência espontânea) quer tenha sido “adverso” (aumento da frequência registrada no grupo controle não-tratado).

Tabela 4.2.14: Tipos e frequências de anormalidades (malformações) dos ossos dos membros posteriores registradas na prole (DG21) de ratas tratadas concomitantemente com HU+NaOH, Salina+6MP e HU+6-MP, durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Salina+6-MP ou 6-MP+Salina	HU+6MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas (N)</i>	17	24	29	28
<i>Malformações:</i>				
Tíbia torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,52 ^{ab} (13,79)	0,00 ^c (0,00)
Tíbia mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,88 ^{ab} (20,69) ^b	0,00 ^c (0,00) ^c
Ausência de fêmur	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,24 ^{ab} (17,24)	0,00 ^c (0,00)
Fêmur mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	8,99 ^{ab} (37,93) ^{ab}	0,00 ^c (0,00) ^c
Constrição no fêmur	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,68 ^{ab} (24,14) ^{ab}	0,00 ^c (0,00) ^c
1° dedo mais longo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	36,69 ^{ab} (79,31) ^{ab}	5,07 ^{abc} (17,86) ^c
Falange proximal do 2° dedo menor	19,21 (82,35)	13,70 (58,33)	0,00 ^{ab} (0,00) ^{ab}	2,90 ^{abc} (21,43) ^{abc}
Falange proximal do 3° dedo menor	11,30 (52,94)	15,56 (75,00)	0,72 ^{ab} (6,90) ^{ab}	4,35 ^{abc} (25,00) ^{ab}
Falange proximal do 4° dedo menor	8,47 (52,94)	11,11 (58,33)	0,72 ^{ab} (6,90) ^{ab}	3,99 ^{bc} (21,43) ^b
Falange proximal do 5° dedo menor	9,04 (47,06)	8,15 (41,67)	0,00 ^{ab} (0,00) ^{ab}	2,90 ^{abc} (10,71) ^{ab}
1° metatarso menor	3,95 (23,53)	16,30 ^a (54,17)	5,04 (31,03)	15,22 ^{ac} (46,43)
5° metatarso menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,52 ^{ab} (17,24)	0,36 (3,57)
Polidactilia	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	25,54 ^{ab} (75,86) ^{ab}	3,26 ^{abc} (17,86) ^c

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq NADA; b \neq NaOH+HU ou HU+NaOH; c \neq 6-MP+HU ou HU+6-MP. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Tabela 4.2.15: Tipos e frequências de anormalidades (variações) dos ossos dos membros posteriores registradas na prole (DG21) de ratas tratadas concomitantemente com HU+NaOH, Salina+6MP e HU+6-MP, durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Salina+6-MP ou 6-MP+Salina	HU+6MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas (N)</i>	17	24	29	28
<i>Alterações (%):</i>				
Púbis não calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,16 ^b (17,24)	0,00 ^c (0,00)
Ílio pobremente calcificado	1,69 (17,65)	7,78 ^a (50,00) ^a	98,20 ^{ab} (100,00) ^{ab}	96,74 ^{ab} (100,00) ^{ab}
Ísquio pobremente calcificado	1,69 (17,65)	7,78 ^a (50,00) ^a	97,12 ^{ab} (100,00) ^{ab}	96,74 ^{ab} (100,00) ^{ab}
Púbis pobremente calcificado	1,69 (17,65)	7,78 ^a (50,00) ^a	96,40 ^{ab} (100,00) ^{ab}	96,74 ^{ab} (100,00) ^{ab}
Fêmur pobremente calcificado	1,69 (17,65)	7,78 ^a (50,00) ^a	92,45 ^{ab} (100,00) ^{ab}	96,74 ^{ab} (100,00) ^{ab}
Fíbula pobremente calcificada	1,69 (17,65)	7,78 ^a (50,00) ^a	98,20 ^{ab} (100,00) ^{ab}	96,74 ^{ab} (100,00) ^{ab}
Tíbia pobremente calcificada	1,69 (17,65)	7,78 ^a (50,00) ^a	97,84 ^{ab} (100,00) ^{ab}	96,38 ^{ab} (100,00) ^{ab}
1º metatarso não calcificado	4,52 (35,29)	6,30 (37,50)	55,76 ^{ab} (82,76) ^{ab}	77,54 ^{abc} (100,00) ^{ab}
2º metatarso não calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	20,86 ^{ab} (31,03) ^{ab}	0,00 ^c (0,00) ^c
2º metatarso pobremente calcificado	5,65 (29,41)	4,44 (33,33)	76,26 ^{ab} (96,55)	78,62 ^{ab} (96,43) ^{ab}
3º metatarso pobremente calcificado	6,21 (29,41)	6,30 (37,50)	73,38 ^{ab} (93,10)	78,62 ^{ab} (96,43) ^{ab}

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq NADA; b \neq NaOH+HU ou HU+NaOH; c \neq 6-MP+HU ou HU+6-MP. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

(Cont.) Tabela 4.2.15: Tipos e frequências de anormalidades (variações) dos ossos dos membros posteriores registradas na prole (DG21) de ratas tratadas concomitantemente com HU+NaOH, Salina+6MP e HU+6-MP, durante a gravidez (DG11). HU: 250 mg/kg ip; 6-MP: 24 mg/kg sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Salina+6-MP ou 6-MP+Salina	HU+6MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas (N)</i>	17	24	29	28
<i>Alterações (%)::</i>				
4° metatarso pobremente calcificado	6,78 (29,41)	6,30 (37,50)	76,62 ^{ab} (96,55)	78,62 ^{ab} (96,43) ^{ab}
5° metatarso pobremente calcificado	4,52 (29,41)	5,56 (33,33)	71,58 ^{ab} (96,55)	75,72 ^{ab} (96,43) ^{ab}
Falanges proximais não calcificadas	12,43 (52,94)	21,48 ^a (66,67)	98,56 ^{ab} (100,00) ^{ab}	88,77 ^{abc} (96,43) ^{ab}
Falange proximal do 2° dedo não calcificada	24,29 (82,35)	22,96 (79,17)	0,72 ^{ab} (6,90) ^{ab}	4,71 ^{abc} (25,00) ^{ab}
Falange proximal do 5° dedo não calcificada	51,98 (94,12)	45,19 (91,67)	1,08 ^{ab} (10,34) ^{ab}	8,70 ^{abc} (28,57) ^{ab}
Falanges proximais pobremente calcificadas	7,91 (41,18)	21,85 ^a (54,17)	0,00 ^{ab} (0,00) ^{ab}	4,35 ^{bc} (17,86) ^{bc}
Falange proximal do 2° dedo pobremente calcificada	31,64 (88,24)	28,89 (91,67)	0,36 ^{ab} (3,45) ^{ab}	5,43 ^{abc} (25,00) ^{ab}
Falange proximal do 5° dedo pobremente calcificada	22,60 (70,59)	10,00 ^a (54,17)	0,00 ^{ab} (0,00) ^{ab}	0,36 ^{ab} (3,57) ^{ab}

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ NADA; b ≠ NaOH+HU ou HU+NaOH; c ≠ 6-MP+HU ou HU+6-MP. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

4.2.2 – EFEITO DO TRATAMENTO SEQUENCIAL COM OS FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS HU E 6-MP NO DG11 SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE RATOS.

O estudo dos efeitos das exposições sequenciais ao HU e 6-MP envolveu duas ordens de administração dos fármacos antineoplásicos, *i.e.*, HU seguido da 6-MP e a ordem inversa (*i.e.*, HU→6-MP ou 6-MP→HU). Em ambas as ordens de administração, foram investigados dois intervalos entre as injeções de HU e 6-MP (ou vice-versa), 2 e 4 horas. Esses intervalos correspondem ao tempo médio aproximado (2 horas) para aparecimento de mais um par (ou dois somitos), durante o dia de desenvolvimento embrionário em que foi feito o tratamento (GD11). (VICKERS, 1983). O primeiro fármaco da sequência foi administrado sempre às 11:00 hs do DG11.

Para análise dos efeitos da administração sequencial dos dois fármacos antineoplásicos, selecionamos um conjunto de anomalias do esqueleto fetal, que exibiam claramente respostas dose-relacionadas ao tratamento com doses únicas de HU e/ou 6-MP, no DG11. A dependência da resposta (frequência de fetos com a anormalidade do esqueleto) à dose de 6-MP foi identificada na primeira parte deste estudo, e confirmada posteriormente nos experimentos utilizando exposições combinadas concomitantes. As anomalias de ossos do esqueleto do feto a termo, selecionadas para a investigação do efeito de administração sequenciais foram:

- i) Ossos do crânio: fusão entre o osso zigomático e o maxilar, e malformações da mandíbula. Examinamos também a ocorrência “distância maior entre os ossos da mandíbula” (observação geralmente classificada como “variação”) com a finalidade de confirmar as proporções de fetos apresentando a observação “protusão da língua”, diagnosticada por ocasião do exame externo do feto a fresco.
- ii) Anomalias da coluna vertebral.
- iii) Ossos dos membros anteriores: malformações estruturais observadas nos ossos do cinturão peitoral (clavícula e escápula), nos ossos longos das patas dianteiras (úmero, ulna e rádio), e a ocorrência de “processo deltoide com forma irregular”.
- iv) Ossos dos membros posteriores: malformações observadas nos ossos do cinturão pélvico (púbis, ílio e ísquio), e nos ossos longos das patas traseiras (fêmur, tíbia e fíbula).

As malformações ósseas e as alterações da intensidade de ossificação do esqueleto (geralmente classificadas como “variações” sugestivas de retardos do crescimento pré-natal) que apareceram com elevada frequência no grupo controle não tratado não foram selecionadas, com exceção de algumas observações tais como interrupções do fechamento de corpos vertebrais e centros de ossificação de corpos de vértebra com forma de “*dumb-bell*”.

O conjunto completo da frequência de fetos com anormalidades de ossos do esqueleto fetal, registrado no estudo do efeito de administrações sequenciais dos dois antineoplásicos, é apresentado nas Tabelas que constam dos Anexos de 47 a 57.

4.2.2.1 – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SEQUENCIAL DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO EMBRIÃO: INTERVALO DE 2 HORAS ENTRE AS INJEÇÕES (HU→6-MP) NO DG11.

4.2.2.1.1 – TOXICIDADE MATERNA, PERDAS GESTACIONAIS, PESO DO FETO E DA PLACENTA, E ANORMALIDADES MORFOLÓGICAS DETECTADAS NO EXAME EXTERNO.

O ganho de peso materno durante a gravidez após o tratamento sequencial com os fármacos HU→6-MP no DG11 (intervalo de 2 horas) é apresentado nas tabelas 4.2.16 e 4.2.17.

Os dados de ganho de peso materno durante toda a gravidez (DG 21 – 0) descontado o peso do útero gravídico, não diferiu entre os grupos controle não-tratado, tratado apenas com HU ou 6-MP (monotratamento), e tratado sequencialmente (2 horas de intervalo) com os dois fármacos (Tabela 4.2.16). O peso do útero gravídico das ratas do grupo tratado somente com HU não diferiu do peso do útero gravídico das ratas do grupo controle não tratado. O peso do útero gravídico das fêmeas dos grupos tratados com 6-MP (monotratamento ou tratamento combinado), entretanto foram menores do que o peso uterino registrado no grupo controle, o que indica efeito embriotóxico (menor peso de placenta/fetos e/ou maior número de perdas gestacionais). A acentuada diminuição do ganho de peso materno dos grupos tratados com 6-MP nos dois dias seguintes ao tratamento (DG 12-11 e DG 13-11), ganho de peso este menor do que os registrados nos grupos controle e tratado apenas com HU, sugere que a 6-MP foi tóxica para o organismo materno (embora tenha havido recuperação posterior), porque a contribuição do peso total de embriões e placentas para o peso da mãe é desprezível nesse dia da gravidez. É interessante notar que o tratamento combinado aparentemente agravou o efeito adverso transitório da 6-MP sobre o ganho de peso materno, o que torna-se particularmente evidente pela análise das diferenças de ganho de peso entre os DG11 e DG13 (Tabela 4.2.16).

A administração de 6-MP (monotratamento e tratamento combinado), no DG11, aumentou a proporção de fetos mortos e reduziu a proporção de fetos vivos por sítio de implantação (feto individual como unidade de análise), no DG21 (Tabela 4.2.17). A proporção maior de fetos mortos por sítio de implantação no grupo que recebeu o tratamento combinado, em comparação com o que recebeu monotratamento com 6-MP, sugere que a HU pode ter agravado o efeito letal da 6-MP (Tabela 4.2.17), o que seria consistente com a maior toxicidade materna registrada com o tratamento combinado (em comparação com o

monotratamento com 6-MP) nas 48 horas que se seguiram ao tratamento (menor ganho de peso DG 13-11) (Tabela 4.2.16).

A administração da HU (250 mg/kg), 2 horas antes da 6-MP (24 mg/kg), diminuiu a incidência de malformações fetais induzidas pela 6-MP (proporção de fetos malformados, feto individual como unidade de análise) (Tabela 4.2.17).

O peso corporal do feto a termo (DG21) foi reduzido discretamente pelo monotratamento com HU (diminuição de aproximadamente 5,0% em comparação com o grupo controle), e drasticamente pelo monotratamento com 6-MP (redução de 50,0%) e tratamento combinado (HU→6-MP; diminuição de 50%), no DG11. (Tabela 4.2.17). De modo análogo ao peso fetal, o peso das placentas foi reduzido pelos monotratamentos com HU (aproximadamente 10,0% menor do que as placentas do grupo controle) e com 6-MP (aproximadamente 62,0% menor), e com o tratamento sequencial HU→6-MP (cerca de 62,0% menor). As razões entre o peso da placenta e o peso fetal também foram reduzidas pelo tratamento com 6-MP (monotratamento e administração sequencial, 29,0% e 26,0% de decréscimo em relação ao controle, respectivamente, ninhada como unidade de análise), o que é consistente com a maior magnitude de redução do peso placentário em relação à diminuição do peso corporal do feto. O monotratamento com HU (250 mg/kg) causou discreta redução da razão peso placenta/feto (aproximadamente 11% menor do que as placentas dos controles não tratados). (Tabela 4.2.17).

5.2.2.1.1.1 – ANOMALIAS DETECTADAS NO EXAME EXTERNO

As anormalidades morfológicas detectadas no exame externo do feto a termo (DG21), e suas frequências nos grupos controle e tratados com antineoplásicos, são apresentadas na Tabela 4.2.18.

A exposição a 6-MP no DG11 (monotratamento e administração sequencial) aumentou - em relação ao grupo controle - a proporção de fetos com anormalidades (malformações) nas patas traseiras (polidactilia e 1º dedo maior) e na cauda (cauda curta; cauda curta e encrespada), bem como a incidência de observações de “protusão da língua”. Dentre estas anomalias visíveis ao exame externo, a única em que a incidência no grupo que recebeu tratamento sequencial (HU→6-MP) foi menor do que a incidência no grupo tratado apenas com 6-MP, foi “protusão da língua”.

Em síntese, o tratamento sequencial com a administração de HU antecedendo em 2 horas a injeção de 6-MP no DG11, não modificou a frequência de efeitos embriotóxicos

associados a 6-MP, exceto por uma redução expressiva das observações de “protusão da língua”, em comparação com a incidência registrada no grupo que recebeu o monotratoamento (Tabela 4.2.18).

Tabela 4.2.16: Ganho de peso corporal durante a gravidez de ratas tratadas sequencialmente (DG11) com HU→NaOH, Salina→6-MP e HU→6MP, com um intervalo de 2 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg ip; 6-MP: 24 mg/kg sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU→NaOH	Salina→6-MP	HU→6-MP
<i>Fêmeas grávidas (N)</i>	17	11	10	10
<i>Reabsorções (N)</i>	11	8	13	10
Por sítios de implantação (%)	5,85	6,02	10,48	8,62
Por implantação por ninhada (%)	7,69 (9,55)	0,00 (13,33)	9,17 (9,29)	7,96 (13,10)
<i>Peso do útero gravídico (g)</i>	74,95 ± 14,58	75,59 ± 13,85	41,58 ± 7,93 ab	40,00 ± 9,04 ab
<i>Ganho de peso materno (Δg):</i>				
Dia 11-0	50,46 ± 19,06	49,28 ± 6,79	46,06 ± 5,74	50,51 ± 6,65
Dia 12-11	2,99 ± 5,12	1,30 ± 2,04	- 5,20 ± 2,56 ab	- 11,35 ± 5,28 ab
Dia 13-11	9,81 ± 4,67	4,67 ± 2,25	5,72 ± 3,57	- 1,36 ± 7,15 abc
Dia 15-11	18,46 ± 5,91	15,72 ± 3,65	15,92 ± 3,17	12,20 ± 8,31 a
Dia 21-11	82,54 ± 16,62	84,83 ± 16,13	53,57 ± 9,65 ab	50,56 ± 11,22 ab
Dia 21-0	133,00 ± 23,68	134,11 ± 20,36	99,64 ± 11,74 ab	101,07 ± 12,79 ab
Dia 21-0 - (peso do útero)	58,05 ± 20,04	56,95 ± 12,52	58,06 ± 10,90	61,07 ± 10,95

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. Os dados representados como medianas (Q1-Q3) foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. (Q3-Q1): amplitude interquartilica, calculada pela diferença entre o 3º (Q3) e o 1º quartil (Q1). Os dados representados como média ± d.p foram analisados por ANOVA seguida por teste de Bonferroni. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ NADA; b ≠ HU→NaOH; c ≠ Salina→6-MP.

Tabela 4.2.17: Efeito embriotóxico do tratamento sequencial de ratas grávidas com HU→NaOH, Salina→6-MP e HU→6MP (DG11), com um intervalo de 2 horas entre as injeções: Análise dos parâmetros obtidos por ocasião da cesária (DG21). HU: 250 mg/kg ip; 6-MP: 24 mg/kg sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRETAMENTO			
	NADA	HU→NaOH	Salina→6-MP	HU→6-MP
<i>Fêmeas grávidas</i> (N)	17	11	10	10
<i>Sítios de implantação</i> (N)	188	133	124	116
Por ninhada	11,00 (3,00)	12,00 (1,00)	13,00 (2,25)	12,00 (2,50)
<i>Reabsorções</i> (N)	11	8	13	10
Por sítios de implantação (%)	5,85	6,02	10,48	8,62
Por implantação por ninhada (%)	7,69 (9,55)	0,00 (13,33)	9,17 (9,29)	7,96 (13,10)
<i>Fetos mortos</i> (N)	0	1	9	17
Por sítios de implantação (%)	0,00	0,76	7,26 ^a	14,66 ^{abc}
Por ninhada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (1,50)	1,50 (3,00) ^{ab}
<i>Fetos vivos</i> (N)	177	124	102	89
Por sítios de implantação (%)	94,15	93,23	82,26 ^{ab}	76,72 ^{ab}
Por ninhada	11,00 (3,00)	12,00 (3,00)	11,00 (3,25)	9,50 (4,25)
<i>Fetos malformados</i> (%)	1,12	0,00	71,57 ^{ab}	41,19 ^{abc}
<i>Peso fetal</i> (g)				
Individual	4,97 ± 0,38	4,76 ± 0,17 ^a	2,49 ± 0,49 ^{ab}	2,57 ± 0,58 ^{ab}
Por ninhada (média ± d.p.)	5,00 ± 0,24	4,76 ± 0,17 ^a	2,49 ± 0,38 ^{ab}	2,52 ± 0,45 ^{ab}
<i>Peso das placentas</i> (g)				
Individual	0,49 ± 0,08	0,44 ± 0,08 ^a	0,18 ± 0,05 ^{ab}	0,19 ± 0,07 ^{ab}
Por ninhada (média ± d.p.)	0,50 ± 0,05	0,44 ± 0,07	0,19 ± 0,04 ^{ab}	0,19 ± 0,06 ^{ab}
<i>Peso placenta/peso fetal</i> (%)				
Individual	9,98 ± 1,61	9,23 ± 1,53 ^a	7,24 ± 1,78 ^{ab}	7,66 ± 3,09 ^{ab}
Por ninhada (média ± d.p.)	10,36 ± 1,18	9,24 ± 1,16	7,39 ± 0,93 ^{ab}	7,71 ± 1,95 ^{ab}

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. Os dados representados como medianas (Q1-Q3) foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. (Q3-Q1): amplitude interquartilica, calculada pela diferença entre o 3º (Q3) e o 1º quartil (Q1). Os dados representados como média ± d.p foram analisados por ANOVA seguida por teste de Bonferroni. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ NADA; b ≠ HU→NaOH; c ≠ Salina→6-MP.

Tabela 4.2.18: Tipos e frequências de anomalias detectadas pelo exame externo na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com HU→NaOH, Salina→6-MP e HU→6MP durante a gravidez (DG11), em que houve intervalo de 2 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU→NaOH	Salina→6-MP	HU→6-MP
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	124	102	89
<i>Ninhadas (N)</i>	17	11	10	10
<i>Malformações (%):</i>				
Posição irregular PTE e/ou PTD	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	1,96 (10,00)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 2º dedo da PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,96 (20,00)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 5º dedo da PDE e/ou PDD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (10,00)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 5º dedo da PTE e/ou PTD	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Polidactilia PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	16,67 ^{ab} (70,00) ^{ab}	17,98 ^{ab} (30,00) ^a
Sindactilia entre dedos 3 e 4 da PDE e/ou PDD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (10,00)	2,25 (10,00)
1º dedo da PTE e/ou PTD maior	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	12,75 ^{ab} (60,00) ^{ab}	16,85 ^{ab} (50,00) ^a
Projeção de tecido no meio da planta da PTE	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (10,00)	0,00 (0,00)
Cauda curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,90 ^{ab} (30,00) ^a	0,00 (0,00)
Cauda encrespada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (10,00)
Cauda curta e encrespada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (10,00)	2,25 (10,00)
Cauda curta com ponta curva	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,94 ^a (30,00) ^a	0,00 (0,00)
Protusão da língua	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	78,43 ^{ab} (100,00) ^{ab}	48,31 ^{abc} (100,00) ^{ab}
Micrognatia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (10,00)

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq NADA; b \neq HU→NaOH; c \neq Salina→6-MP. PTE e PTD: patas traseiras, esquerda e direita.

4.2.2.1.2 – ANORMALIDADES DO ESQUELETO FETAL

A administração da 6-MP no DG11 (grupo Salina→6-MP) aumentou a incidência de fusões do osso zigomático com o maxilar, em comparação com as incidências registradas, tanto no grupo controle não tratado, quanto naquele que recebeu apenas HU (HU→NaOH) (Tabela 4.2.19). O tratamento sequencial com os dois fármacos, com injeção de HU 2 horas antes da administração de 6-MP, aparentemente diminuiu discretamente esta frequência em relação ao observado com monoterapia com 6-MP, mas esta redução não foi detectada pela análise estatística. O aumento da frequência de anormalidades dos ossos da coluna vertebral induzido pela 6-MP (monoterapia), também não foi modificado pela exposição prévia à HU, exceto em relação a duas observações: “interrupção do fechamento de corpos vertebrais lombares”, e “corpos vertebrais lombares desalinhados”. Nesses dois casos o tratamento com HU, 2 horas antes da injeção de 6-MP, potencializou o efeito deste último fármaco, elevando ainda mais a incidência de fetos com anormalidades da coluna vertebral.

A Tabela 4.2.20 apresenta os dados relativos às anormalidades do esqueleto apendicular (membros anteriores e posteriores). Os grupos tratados com 6-MP no DG11 exibiram aumentos das incidências de anomalias das patas traseiras, e diminuição da frequência de fetos com “processo deltoide com forma irregular” (patas dianteiras), o que é consistente com o efeito desta dose de 6-MP que foi constatado na curva dose-resposta deste antineoplásico (Tabelas 4.1.2.7 e 4.1.2.9), determinada na etapa anterior do estudo. O tratamento prévio (2 horas) com HU não alterou esses efeitos da 6-MP. O tratamento sequencial HU→6-MP, entretanto, aumentou discretamente a frequência de fetos exibindo anormalidades do osso ulnas, em comparação com as incidências registradas nos grupos tratados apenas com um dos dois fármacos, e no grupo controle não tratado.

O conjunto completo das anormalidades de esqueleto fetal registradas nesse experimento de administração sequencial e suas respectivas incidências constam dos Anexos de 47 a 49.

Tabela 4.2.19: Tipos e frequências de anormalidades do esqueleto axial do feto induzidas na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com HU→NaOH, Salina→6-MP e HU→6MP durante a gravidez (DG11), em que houve um intervalo de 2 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg ip; 6-MP: 24 mg/kg sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU→NaOH	Salina→6-MP	HU→6-MP
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	124	102	89
<i>Ninhadas (N)</i>	17	11	10	10
<i>Malformações (%):</i>				
CRÂNIO:				
Fusão do osso zigomático com processo jugular do maxilar	0,56 (5,88)	2,42 (27,27)	23,53 ^{ab} (90,00) ^{ab}	13,48 ^{ab} (60,00) ^a
COLUNA VERTEBRAL:				
Forma irregular de 1-2 corpos vertebrais torácicos	0,00 (0,00)	0,81 (9,09)	0,98 (10,00)	3,37 ^a (30,00)
Interrupção do processo de fechamento de 1-6 corpos vertebrais torácicos	0,00 (0,00)	9,68 ^a (27,27)	9,80 ^a (70,00) ^a	11,24 ^a (50,00) ^a
Centros de ossificação de 1-6 corpos vertebrais torácicos em forma de <i>dumb-bell</i>	4,52 (29,41)	0,81 (9,09)	14,71 ^{ab} (60,00) ^b	12,36 ^{ab} (60,00) ^b
Forma irregular de 1-6 corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	1,61 (18,18)	11,76 ^{ab} (90,00) ^{ab}	14,61 ^{ab} (70,00) ^{ab}
Interrupção do processo de fechamento de 1-6 corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	4,03 ^a (18,18)	14,71 ^{ab} (90,00) ^{ab}	30,34 ^{abc} (40,00) ^a
1-6 corpos vertebrais lombares desalinhados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,88 ^{ab} (30,00) ^a	19,10 ^{abc} (60,00) ^{ab}
Forma irregular de 1-4 corpos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	0,81 (9,09)	22,55 ^{ab} (80,00) ^{ab}	23,60 ^{ab} (40,00) ^a
Interrupção do processo de fechamento de 1-4 corpos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	2,42 (27,27)	27,45 ^{ab} (70,00) ^a	30,34 ^{ab} (60,00) ^a

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ NADA; b ≠ HU→NaOH; c ≠ Salina→6-MP. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Tabela 4.2.20: Tipos e frequências de anormalidades de ossos dos membros anteriores e posteriores induzidas na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com HU→NaOH, Salina→6-MP e HU→6MP durante a gravidez (DG11), em que houve um intervalo de 2 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU→NaOH	Salina→6-MP	HU→6-MP
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	124	102	89
<i>Ninhadas (N)</i>	17	11	10	10
<i>Malformações (%):</i>				
MEMBROS ANTERIORES:				
Ulna torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (10,00)	3,37 ^a (10,00)
Ulna mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,37 ^a (10,00)
Forma irregular do processo deltoide	23,16 (82,35)	37,10 ^a (90,91)	5,88 ^{ab} (50,00)	6,74 ^{ab} (40,00) ^{ab}
MEMBROS POSTERIORES:				
1º dedo mais longo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	12,75 ^{ab} (60,00) ^{ab}	16,85 ^{ab} (50,00) ^{ab}
Polidactilia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	16,67 ^{ab} (70,00) ^{ab}	17,98 ^{ab} (30,00) ^a

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq NADA; b \neq HU→NaOH; c \neq Salina→6-MP. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

4.2.2.2- EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SEQUENCIAL DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO EMBRIÃO: INTERVALO DE 2 HORAS ENTRE AS INJEÇÕES (6-MP→HU) NO DG11.

4.2.2.2.1 – TOXICIDADE MATERNA, PERDAS GESTACIONAIS, PESO DO FETO E DA PLACENTA, E ANORMALIDADES MORFOLÓGICAS DETECTADAS NO EXAME EXTERNO.

Os impactos da administração sequencial de 6-MP→HU (intervalo de 2 horas, DG11) sobre o ganho de peso materno, peso fetal e da placenta, e número de fetos vivos e mortos, reabsorções e fetos com malformações detectadas no exame externo (DG21) são mostrados nas Tabelas 4.2.21 e 4.2.22, respectivamente.

O tratamento com 6-MP (24 mg/kg *sc*) diminuiu o peso do útero gravídico de forma equivalente nos grupos tratado apenas com 6-MP (6-MP→Salina) e tratado com os dois fármacos (6-MP→HU). O tratamento apenas com HU não alterou o peso do útero gravídico. Estes resultados indicam que a administração posterior de HU (2 horas depois) não modificou o efeito da 6-MP.

O ganho de peso materno durante as 48 horas seguintes ao tratamento (GD 12-11 e GD 13-11), foi menor nos grupos que receberam 6-MP, mas não diferiu do grupo controle no caso das ratas grávidas que receberam apenas com HU (Tabela 4.2.21). Por outro lado o ganho de peso materno durante toda a gravidez (GD 21-0) descontado o peso do útero gravídico, não diferiu entre os grupos controle (não tratado) e tratados com os antineoplásicos. Esses resultados indicam que a 6-MP (24 mg/kg *sc*), mas não a HU (250 mg/kg *ip*), foi tóxica para o organismo materno (o peso total de embriões e placentas é mínimo - comparado ao materno - no GD 11) e que, com a continuidade da gravidez, houve recuperação da perda de peso materno (4.2.21).

Em resumo, os resultados (Tabela 4.2.22) mostraram que:

- i. A 6-MP aumentou de forma discreta, mas significativa, a proporção de fetos mortos, em comparação como grupo tratado apenas com HU (NaOH→HU) e com grupo controle não tratado.
- ii. A administração sequencial de HU, 2 horas após a 6-MP (6-MP→HU) elevou a proporção de fetos mortos, em comparação com o registrado no grupo que recebeu apenas 6-MP (6-MP→Salina).
- iii. A 6-MP aumentou a proporção de fetos com anormalidades morfológicas detectadas pelo exame externo (6-MP→Salina), mas o tratamento sequencial

com os dois antineoplásicos (6-MP→HU) não modificou a magnitude deste efeito.

- iv. A administração de HU, 2 horas depois da injeção de 6-MP, atenuou discretamente a redução do peso fetal notada no grupo tratado apenas com 6-MP.
- v. O peso da placenta (DG21) foi reduzido nos grupos tratados (DG11) apenas com HU (8% menor que o peso médio das placentas do grupo controle) ou com 6-MP (64% menor), e naquele que recebeu o tratamento sequencial com os dois fármacos (6-MP→HU) (60% menor). Embora os dois antineoplásicos administrados isoladamente tenham reduzido o peso da placenta, o efeito do tratamento sequencial foi aparentemente (numericamente menor, mas as diferenças não foram detectadas pelo teste estatístico) atenuado pelo tratamento com 6-MP apenas.
- vi. A razão peso placenta: peso fetal foi reduzida - em relação aos grupos controle e tratado apenas com HU - nos dois grupos tratados com 6-MP (monotratamento e tratamento sequencial 6-MP→HU).

4.2.2.2.1.1 – ANOMALIAS DETECTADAS NO EXAME EXTERNO

Os tipos de anomalias e as frequências de fetos com anomalias, detectadas pelo exame externo (DG21), são apresentadas na Tabela 4.2.23. A 6-MP administrada isoladamente ou 2 horas antes da injeção de HU (6-MP→HU), no DG11, aumentou a incidência de observações tais como “posição irregular”, “1º dedo maior” e “polidactilia” de patas traseiras, e “protusão da língua”. A administração posterior de HU (2 horas depois) não alterou a magnitude do aumento de incidência provocado pela 6-MP, exceto no caso da observação “1º dedo maior”, que diminuiu com o tratamento sequencial.

Tabela 4.2.21: Ganho de peso corporal durante a gravidez de ratas tratadas sequencialmente (DG11) com NaOH→HU, 6-MP→Salina e 6-MP→HU, em que houve um intervalo de 2 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg ip; 6-MP: 24 mg/kg sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	NaOH→HU	6-MP→Salina	6-MP→HU
<i>Fêmeas grávidas</i> (N)	17	10	10	10
<i>Reabsorções</i> (N)	11	10	7	11
Por sítios de implantação (%)	5,85	9,01	5,51	8,59
Por implantação por ninhada (%)	7,69 (9,55)	3,85 (25,57)	7,18 (8,75)	8,01 (15,38)
<i>Peso do útero gravídico</i> (g)	74,95 ± 14,58	68,95 ± 20,21	47,69 ± 12,31 ^a	51,95 ± 12,76 ^a
<i>Ganho de peso materno</i> (Δg):				
Dia 11-0	50,46 ± 19,06	45,40 ± 7,75	47,79 ± 7,50	49,92 ± 10,19
Dia 12-11	2,99 ± 5,12	1,61 ± 2,53	- 1,68 ± 5,65	- 5,22 ± 3,77 ^{ab}
Dia 13-11	9,81 ± 4,67	6,32 ± 4,45	8,22 ± 7,24	1,94 ± 5,42 ^a
Dia 15-11	18,46 ± 5,91	15,65 ± 5,63	17,34 ± 6,46	13,54 ± 3,18
Dia 21-11	82,54 ± 16,62	80,00 ± 19,28	62,58 ± 15,95 ^a	61,93 ± 10,44 ^a
Dia 21-0	133,00 ± 23,68	125,38 ± 21,44	110,37 ± 17,66	111,85 ± 17,42
Dia 21-0 - (peso do útero)	58,05 ± 20,04	56,45 ± 7,37	62,68 ± 9,04	59,00 ± 12,42

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. Os dados representados como medianas (Q1-Q3) foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. (Q3-Q1): amplitude interquartílica, calculada pela diferença entre o 3º (Q3) e o 1º quartil (Q1). Os dados representados como média ± d.p foram analisados por ANOVA seguida por teste de Bonferroni. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ NADA; b ≠ NaOH→HU; c ≠ 6-MP→Salina.

Tabela 4.2.22: Efeito embriotóxico do tratamento sequencial de ratas grávidas com NaOH→HU, 6-MP→Salina e 6-MP→HU (DG11), com um intervalo de 2 horas entre as injeções: Análise dos parâmetros obtidos por ocasião da cesária (DG21). HU: 250 mg/kg ip; 6-MP: 24 mg/kg sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRETAMENTO			
	NADA	NaOH→HU	6-MP→Salina	6-MP→HU
<i>Fêmeas grávidas</i> (N)	17	10	10	10
<i>Sítios de implantação</i> (N)	188	111	127	128
Por ninhada	11,00 (3,00)	11,50 (4,25)	13,00 (2,25)	13,00 (2,00)
<i>Reabsorções</i> (N)	11	10	7	11
Por sítios de implantação (%)	5,85	6,02	5,51	8,59
Por implantação por ninhada (%)	7,69 (9,55)	3,85 (25,57)	7,18 (8,75)	8,01 (15,38)
<i>Fetos mortos</i> (N)	0	0	2	6
Por sítios de implantação (%)	0,00	0,00	1,57 ^a	4,69 ^{ab}
Por ninhada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,25)	0,00 (1,25)
<i>Fetos vivos</i> (N)	177	101	118	111
Por sítios de implantação (%)	94,15	90,99	92,91	86,72
Por ninhada	11,00 (3,00)	10,50 (5,50)	11,50 (2,25)	11,50 (6,00)
<i>Fetos malformados</i> (%)	1,12	2,97	62,71 ^{ab}	51,35 ^{ab}
<i>Peso fetal</i> (g)				
Individual	4,97 ± 0,38	4,73 ± 0,47 ^a	2,70 ± 0,57 ^{ab}	3,13 ± 0,50 ^{abc}
Por ninhada (média ± d.p.)	5,00 ± 0,24	4,70 ± 0,30	2,65 ± 0,48 ^{ab}	3,09 ± 0,33 ^{abc}
<i>Peso das placentas</i> (g)				
Individual	0,49 ± 0,08	0,45 ± 0,06 ^a	0,18 ± 0,05 ^{ab}	0,20 ± 0,04 ^{ab}
Por ninhada (média ± d.p.)	0,50 ± 0,05	0,46 ± 0,04	0,18 ± 0,04 ^{ab}	0,20 ± 0,03 ^{ab}
<i>Peso placenta/peso fetal</i> (%)				
Individual	9,98 ± 1,61	9,59 ± 1,88	6,80 ± 1,21 ^{ab}	6,55 ± 1,34 ^{ab}
Por ninhada (média ± d.p.)	10,36 ± 1,18	9,86 ± 1,35	6,83 ± 0,66 ^{ab}	6,58 ± 0,94 ^{ab}

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. %. Os dados representados como medianas (Q1-Q3) foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. (Q3-Q1): amplitude interquartilica, calculada pela diferença entre o 3° (Q3) e o 1° quartil (Q1). Os dados representados como média ± d.p foram analisados por ANOVA seguida por teste de Bonferroni. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ NADA; b ≠ NaOH→HU; c ≠ 6-MP→Salina.

Tabela 4.2.23: Tipos e frequências de anomalias detectadas pelo exame externo na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com NaOH→HU, 6-MP→Salina e 6-MP→HU durante a gravidez (DG11), em que houve um intervalo de 2 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	NaOH→HU	6-MP→Salina	6-MP→HU
Fetos vivos (N)	177	101	118	111
Ninhadas (N)	17	10	10	10
Malformações (%):				
Posição irregular PTE e/ou PTD	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	4,24 ^a (10,00)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 1º dedo PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (10,00)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 2º dedo PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,69 (10,00)	0,90 (10,00)
Posição irregular do 3º dedo PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	0,92 (9,09)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 4º dedo PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,60 ^a (20,00)
Posição irregular do 5º dedo PTE e/ou PTD	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,85 (10,00)	0,90 (10,00)
Polidactilia PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	12,71 ^{ab} (40,00) ^{ab}	10,81 ^{ab} (40,00) ^{ab}
Sindactilia PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
1º dedo da PTE e/ou PTD maior	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	12,71 ^{ab} (50,00) ^{ab}	4,50 ^{ac} (30,00) ^a
1º dedo da PTE e/ou PTD menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (10,00)	0,00 (0,00)
Cauda curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (10,00)	0,00 (0,00)
Cauda encrespada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,80 (20,00)
Cauda curta com ponta curva	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,69 (10,00)	0,00 (0,00)
Cauda com ponta curva	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	0,85 (10,00)	0,00 (0,00)
Protusão da língua	0,00 (0,00)	4,95 ^a (30,00)	67,80 ^{ab} (100,00) ^{ab}	50,00 ^{ab} (100,00) ^{ab}
Micrognatia	0,00 (0,00)	1,69 (120,00)	0,00 (0,00)	0,85 (10,00)

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ NADA; b ≠ NaOH→HU; c ≠ 6-MP→Salina. PTE e PTD: patas traseiras, esquerda e direita.

4.2.2.2.2 – ANORMALIDADES DO ESQUELETO FETAL

A administração de 6-MP apenas elevou a incidência da observação “fusão do osso zigomático com o maxilar”, em comparação com a frequência registrada nos grupos controle e tratado apenas com HU (NaOH→HU). A exposição ao HU, 2 horas depois da injeção de 6-MP (6-MP→HU) atenuou o aumento da frequência desta observação causado pela administração de 6-MP no DG11 (4.2.24).

A administração de 6-MP elevou a incidência de centros de ossificação com forma “*dumb-bell*” em corpos de vertebrae torácicas (em relação ao controle não tratado e ao grupo tratado apenas com HU), aumento este que foi atenuado no grupo que recebeu o tratamento posterior com HU (6-MP→HU). A frequência das demais anormalidades de ossos da coluna vertebral (4.2.24) não foi alterada pelo co-tratamento sequencial com os dois fármacos.

A administração de 6-MP (DG11) aumentou a incidência de anomalias das patas traseiras, e diminuiu a frequência da observação “processo deltoide com forma irregular” (Tabela 4.2.25). A incidência dessas observações no grupo tratado apenas com HU, não diferiu daquela registrada no grupo controle não tratado. O tratamento sequencial com HU, 2 horas depois da injeção de 6-MP, aumentou a frequência da observação “processo deltoide com forma irregular”, diminuiu a de “patas traseiras com o 1º dedo maior”, mas não alterou a de polidactilia, em relação às frequências registradas no grupo tratado somente com 6-MP.

Em síntese, a administração da HU (250 mg/kg *ip*), 2 horas após o tratamento com 6-MP resultou, dependendo do desfecho avaliado, em uma de duas possibilidades: ou não modificou, ou antagonizou os efeitos embriotóxicos (teratogênicos) da 6-MP (24 mg/kg *sc*).

Tabela 4.2.24: Tipos e frequências de anormalidades do esqueleto axial do feto induzidas na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com NaOH→HU, 6-MP→Salina e 6-MP→HU durante a gravidez (DG11), em que houve um intervalo de 2 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	NaOH→HU	6-MP→Salina	6-MP→HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	124	102	89
<i>Ninhadas (N)</i>	17	11	10	10
<i>Malformações (%):</i>				
CRÂNIO:				
Fusão do osso zigomático com processo jugular do maxilar	0,56 (5,88)	6,93 ^a (60,00) ^a	34,75 ^{ab} (100,00) ^a	20,72 ^{abc} (90,00) ^a
COLUNA VERTEBRAL:				
Forma irregular de 1-2 corpos vertebrais torácicos	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	5,08 ^a (50,00) ^a	3,60 ^a (30,00) ^a
Interrupção do processo de fechamento de 1-6 corpos vertebrais torácicos	0,00 (0,00)	7,92 ^a (40,00)	12,71 ^a (80,00)	9,01 ^a (60,00)
Centros de ossificação de 1-2 corpos vertebrais torácicos em forma de <i>dumb-bell</i>	4,52 (29,41)	1,98 (20,00)	18,64 ^{ab} (50,00)	4,50 ^c (50,00)
Forma irregular de 1-2 corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,54 (30,00) ^a	0,90 (10,00)
Interrupção do processo de fechamento do corpo de 1-2 vertebrais lombares	0,00 (0,00)	2,97 (20,00)	4,24 ^a (20,00)	0,90 (10,00)
Interrupção do processo de fechamento de 1-2 corpos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	1,98 (20,00)	5,93 ^a (20,00)	1,80 (20,00)

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ NADA; b ≠ NaOH→HU; c ≠ 6-MP→Salina. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Tabela 4.2.25: Tipos e frequências de anormalidades de ossos dos membros anteriores e posteriores induzidas na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com NaOH→HU, 6-MP→Salina e 6-MP→HU durante a gravidez (DG11), em que houve um intervalo de 2 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	NaOH→HU	6-MP→Salina	6-MP→HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	124	102	89
<i>Ninhadas (N)</i>	17	11	10	10
<i>Malformações (%):</i>				
MEMBROS ANTERIORES:				
Forma irregular do processo deltoide	23,16 (82,35)	27,78 (60,00)	10,17 ^{ab} (60,00)	19,82 ^c (100,00)
MEMBROS POSTERIORES:				
1º dedo mais longo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	12,71 ^{ab} (60,00) ^{ab}	4,50 ^{ac} (50,00) ^a
Polidactilia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	12,71 ^{ab} (70,00) ^a	10,81 ^{ab} (30,00) ^a

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq NADA; b \neq NaOH→HU; c \neq 6-MP→Salina. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

4.2.2.3 – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SEQUENCIAL DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO EMBRIÃO: INTERVALO DE 4 HORAS ENTRE AS INJEÇÕES (HU→ 6-MP) NO DG11.

4.2.2.3.1 – TOXICIDADE MATERNA, PERDAS GESTACIONAIS, PESO DO FETO E DA PLACENTA, E ANORMALIDADES MORFOLÓGICAS EVIDENCIADAS NO EXAME EXTERNO

Os dados relativos ao ganho de peso materno, peso do útero gravídico e proporção de reabsorções por sítios de implantação e reabsorções são apresentados na Tabela 4.2.26, enquanto o número de fetos vivos e mortos, peso do feto e placenta e proporção de fetos com malformações evidenciadas pelo exame externo, são mostrados na Tabela 4.2.27.

A administração de 6-MP (quer isoladamente ou após o tratamento com HU) diminuiu o peso do útero gravídico em comparação com o peso do útero gravídico registrado nos grupos controle não tratado e tratado apenas com HU. O peso do útero gravídico das ratas tratadas somente com HU não diferiu do peso do útero das ratas do grupo controle (Tabela 4.2.26). O peso do útero das ratas que receberam sequencialmente os dois fármacos não diferiu do peso do órgão das ratas tratadas apenas com 6-MP. Esses resultados sugerem que a 6-MP, mas não a HU, causou redução do número e/ou do peso médio de placentas e fetos no DG21. A redução de ganho de peso materno nas 48 horas seguintes ao tratamento (DG 12-11 e DG 13-11), dias de gestação em que o peso total dos conceptos é mínimo comparado ao peso corporal da grávida, indica que a administração de 6-MP (isoladamente, ou após a HU), mas não a de HU apenas, foi tóxica para o organismo da mãe. O fato do ganho de peso durante toda a gravidez, descontado o peso do útero gravídico, não ter diferido entre os grupos controle (não tratado) e tratado com antineoplásicos, indica que a perda de peso materno causada pela 6-MP foi transitória, havendo recuperação antes do término da gravidez (Tabela 4.2.26).

Em síntese, os resultados (Tabela 4.2.27) relativos aos fetos, placentas e reabsorções, evidenciados por ocasião da cesárea (DG21) indicam que:

- i) A administração de 6-MP (isoladamente ou após HU) aumentou a proporção de fetos mortos por sítio de implantação, em comparação com os grupos controle e tratado apenas com HU. A proporção de fetos mortos por implantações foi maior, no grupo tratado com os dois fármacos (HU→6-MP), do que naquele que recebeu somente 6-MP.

- ii) A HU (grupo HU→NaOH) diminuiu a proporção de fetos vivos, devido ao aumento do número de reabsorções provocado pelo tratamento, uma vez que este não foi embrioletal. Uma diminuição equivalente da frequência de fetos vivos pode ser observada no grupo tratado com HU→6-MP, indicando que este efeito deveu-se ao tratamento com HU, considerando que a 6-MP não alterou esta proporção (grupo Salina→6-MP).
- iii) Houve um aumento também equivalente da frequência de fetos malformados nos grupos tratados com Salina→6-MP e HU→6-MP, indicando que o tratamento prévio com HU não interferiu nas ações teratogênicas da 6-MP.
- iv) A administração de HU, 4 horas antes da 6-MP, não alterou as reduções dos pesos fetais e placentários provocadas pela 6-MP. Entretanto, a diminuição da relação peso da placenta/peso fetal, observada no grupo HU→6-MP foi estatisticamente significativa.

4.2.2.3.1.1 – ANOMALIAS DETECTADAS NO EXAME EXTERNO

A Tabela 4.2.28 mostra os tipos e as frequências de malformações externas fetais registradas logo após a cesariana (DG21). Podemos observar que o tratamento com 6-MP (grupo Salina→6-MP) induziu a ocorrência de anomalias externas, incluindo 1º dedo maior e polidactilia (patas traseiras), cauda curta, cauda curta com ponta curva, e protusão da língua, cujas frequências permaneceram inalteradas, quando a HU foi administrada 4 horas antes (grupo HU→6-MP). É interessante notar, que a ocorrência de cauda curta e encrespada só foi registrada, no grupo tratado com ambos os fármacos.

Tabela 4.2.26: Ganho de peso corporal durante a gravidez de ratas tratadas sequencialmente (DG11) com HU→NaOH, Salina→6-MP e HU→6MP, em que houve um intervalo de 4 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg ip; 6-MP: 24 mg/kg sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU→NaOH	Salina→6-MP	HU→6-MP
<i>Fêmeas grávidas</i> (N)	17	12	11	10
<i>Reabsorções</i> (N)	11	14	3	7
Por sítios de implantação (%)	5,85	9,33	2,59 ^b	5,98
Por implantação por ninhada (%)	7,69 (9,55)	6,91 (19,39)	0,00 (9,09)	0,00 (17,50)
<i>Peso do útero gravídico</i> (g)	74,95 ± 14,58	74,92 ± 13,64	40,31 ± 7,27 ^{ab}	40,81 ± 7,99 ^{ab}
<i>Ganho de peso materno</i> (Δg):				
Dia 11-0	50,46 ± 19,06	51,80 ± 8,46	46,35 ± 16,52	54,30 ± 12,46
Dia 12-11	2,99 ± 5,12	1,44 ± 4,14	- 6,10 ± 5,63 ^{ab}	- 9,95 ± 6,80 ^{ab}
Dia 13-11	9,81 ± 4,67	7,54 ± 4,10	1,68 ± 4,72 ^a	- 0,63 ± 7,33 ^{ab}
Dia 15-11	18,46 ± 5,91	11,94 ± 3,01	9,66 ± 6,18 ^a	9,32 ± 6,06 ^a
Dia 21-11	82,54 ± 16,22	83,65 ± 3,01	53,44 ± 9,49 ^{ab}	49,47 ± 9,39 ^{ab}
Dia 21-0	133,00 ± 23,68	135,45 ± 17,94	89,17 ± 30,83 ^{ab}	103,76 ± 17,36 ^a
Dia 21-0 - (peso do útero)	58,05 ± 20,04	60,53 ± 11,66	55,93 ± 17,44	62,95 ± 13,77

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. Os dados representados como medianas (Q1-Q3) foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. (Q3-Q1): amplitude interquartilica, calculada pela diferença entre o 3º (Q3) e o 1º quartil (Q1). Os dados representados como média ± d.p foram analisados por ANOVA seguida por teste de Bonferroni. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ NADA; b ≠ HU→NaOH; c ≠ Salina→6-MP.

Tabela 4.2.27: Efeito embriotóxico do tratamento sequencial de ratas grávidas com HU→NaOH, Salina→6-MP e HU→6MP (DG11), com um intervalo de 4 horas entre as injeções: Análise dos parâmetros obtidos por ocasião da cesária (DG21). HU: 250 mg/kg ip; 6-MP: 24 mg/kg sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU→NaOH	Salina→6-MP	HU→6-MP
<i>Fêmeas grávidas</i> (N)	17	12	11	10
<i>Sítios de implantação</i> (N)	188	150	116	117
Por ninhada (%)	11,00 (3,00)	12,50 (3,75)	10,00 (2,00)	12,00 (3,25)
<i>Reabsorções</i> (N)	11	14	3	7
Por sítios de implantação (%)	5,85	9,33	2,59 ^b	5,98 ^b
Por implantação por ninhada (%)	7,69 (9,55)	6,91 (19,39)	0,00 (9,09)	0,00 (17,50)
<i>Fetos mortos</i> (N)	0	0	3	10
Por sítios de implantação (%)	0,00	0,00	2,59 ^{ab}	8,55 ^{ab}
Por ninhada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (2,00) ^{ab}
<i>Fetos vivos</i> (N)	177	136	110	100
Por sítios de implantação (%)	94,15	90,67	94,83	85,47 ^{ac}
Por ninhada	11,00 (3,00)	11,00 (3,75)	10,00 (3,00)	10,00 (4,25)
<i>Fetos malformados</i> (%)	1,12	0,00	52,73 ^{ab}	53,00 ^{ab}
<i>Peso fetal</i> (g)				
Individual	4,97 ± 0,38	4,61 ± 0,36 ^a	2,64 ± 0,43 ^{ab}	2,66 ± 0,46 ^{ab}
Por ninhada (média ± d.p.)	5,00 ± 0,24	4,80 ± 0,23	2,54 ± 0,35 ^{ab}	2,57 ± 0,41 ^{ab}
<i>Peso das placentas</i> (g)				
Individual	0,49 ± 0,08	0,45 ± 0,05 ^a	0,19 ± 0,03 ^{ab}	0,17 ± 0,04 ^{ab}
Por ninhada (média ± d.p.)	0,50 ± 0,05	0,46 ± 0,06	0,20 ± 0,02 ^{ab}	0,17 ± 0,03 ^{ab}
<i>Peso placenta/peso fetal</i> (%)				
Individual	9,98 ± 1,61	9,15 ± 2,05 ^a	7,37 ± 1,72 ^{ab}	6,42 ± 1,16 ^{abc}
Por ninhada (média ± d.p.)	10,36 ± 1,18	9,16 ± 1,61	7,51 ± 1,07 ^{ab}	6,58 ± 0,56 ^{ab}

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. Os dados representados como medianas (Q1-Q3) foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. (Q3-Q1): amplitude interquartilica, calculada pela diferença entre o 3º (Q3) e o 1º quartil (Q1). Os dados representados como média ± d.p foram analisados por ANOVA seguida por teste de Bonferroni. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ NADA; b ≠ HU→NaOH; c ≠ Salina→6-MP.

Tabela 4.2.28: Tipos e frequências de anomalias detectadas pelo exame externo na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com HU→NaOH, Salina→6-MP e HU→6MP durante a gravidez (DG11), em que houve um intervalo de 4 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU→NaOH	Salina→6-MP	HU→6-MP
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	136	110	100
<i>Ninhadas (N)</i>	17	12	11	10
<i>Malformações (%):</i>				
Posição irregular PTE e/ou PTD	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	1,81 (18,18)	6,00 ^{ab} (10,00)
Posição irregular PDE e/ou PDD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,91 (9,09)	6,00 ^{ab} (10,00)
Ausência de 1 dedo PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ausência de 1 dedo PDE e/ou PDD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,00 (10,00)
Posição irregular do 1º dedo PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,91 (9,09)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 5º dedo PTE e/ou PTD	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Polidactilia PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	11,82 ^{ab} (63,64) ^{ab}	16,00 ^{ab} (50,00) ^{ab}
Sindactilia entre dedos 1 e 3 da PDE e/ou PDD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,00 ^{ab} (20,00)
1º dedo da PTE e/ou PTD maior	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	12,73 ^{ab} (81,82) ^{ab}	19,00 ^{ab} (80,00) ^{ab}
Cauda curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,45 ^{ab} (27,27) ^{ab}	4,00 ^{ab} (20,00)
Cauda encrespada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,91 (9,09)	2,00 (20,00)
Ponta de cauda	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,00 (10,00)
Cauda curta e encrespada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	11,00 ^{abc} (40,00) ^{abc}
Cauda curta com ponta curva	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,73 ^a (18,18)	3,00 ^{ab} (20,00)
Cauda curta, encrespada com ponta curva	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,00 (10,00)
Protusão da língua	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	57,27 ^{ab} (100,00) ^{ab}	45,00 ^{ab} (90,00) ^{ab}

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ NADA; b ≠ HU→NaOH; c ≠ Salina→6-MP. PTE e PTD: patas traseiras, esquerda e direita.

4.2.2.3.2 – ANORMALIDADES DO ESQUELETO FETAL

A administração de 6-MP (isoladamente ou após a injeção de HU) aumentou a incidência da observação “fusão do osso zigomático com o maxilar”. A frequência desta observação, entretanto, não foi alterada pela administração de HU 4 horas antes. (Tabela 4.2.29).

O tratamento sequencial com os dois fármacos (HU→6-MP) elevou a frequência de várias outras anormalidades do esqueleto fetal, em comparação com as incidências registradas no grupo controle e nos demais grupos tratados com os antineoplásicos (Tabelas 4.2.29-4.2.31).

Como as frequências no grupo que recebeu os dois antineoplásicos foram maiores do que a soma das frequências registradas nos grupos que receberam apenas um dos fármacos, estes resultados podem ser descritos como uma potenciação de efeitos pelo tratamento sequencial aplicado. Este tipo de interação ocorreu para as seguintes observações:

- i) Forma irregular de corpos vertebrais lombares e sacrais;
- ii) Fusão entre corpos vertebrais lombares;
- iii) Interrupção do processo de fechamento de corpos vertebrais lombares e sacrais;
- iv) Corpos vertebrais lombares e sacrais divididos simetricamente;
- v) Corpos vertebrais da coluna lombar desalinhados.

A frequência da observação “interrupção do fechamento de corpos vertebrais torácicos” também aumentou no grupo exposto sequencialmente aos dois antineoplásicos (HU →6-MP), em comparação as incidências registradas nos demais grupos. Todavia, neste caso, a incidência observada (20%) com o tratamento duplo sequencial, correspondeu à adição das frequências registradas nos grupos tratados com apenas um antineoplásico, *i.e.*, HU→NaOH (11,7%) e Salina→6-MP (9,1%).

As incidências de centros de ossificação com forma “*dumb-bell*” em corpos vertebrais torácicos, e de centros de ossificação de corpos vertebrais lombares assimétricos, causados pelo tratamento com 6-MP (24 mg/kg *sc*), não diferiram entre os que receberam apenas 6-MP, e os tratados sequencialmente com os dois fármacos (HU→6-MP).

A Tabela 4.2.30 as frequências de anomalias de ossos dos membros anteriores e cinta peitoral (esqueleto apendicular), geralmente classificadas como malformações. As frequências dessas anormalidades do esqueleto fetal, na prole de ratas que receberam tratamento sequencial com os dois fármacos (HU → 6-MP), não diferiram das incidências registradas no grupo tratado com somente 6-MP (Salina→6-MP), exceto no caso das observações: “processo

deltoide com forma irregular”, e “osso ulna torto”. O tratamento com 6-MP apenas diminuiu a frequência de “processo deltoide com forma irregular”, efeito este que foi parcialmente revertido pela administração prévia de HU. A incidência da observação “osso ulna torto”, registrada apenas na prole de ratas tratadas com 6-MP, foi consideravelmente mais elevada na prole de ratas tratadas com os dois fármacos (HU→6-MP).

As anormalidades de ossos dos membros posteriores e cinta pélvica são mostradas na Tabela 4.2.31. Como pode ser visto nesta tabela, a administração da HU 4 horas antes da injeção de 6-MP, não alterou as incidências de anormalidades desses ossos, exceto no caso da observação “fêmur mais curto”, cuja incidência foi maior na prole de ratas tratadas com os dois antineoplásicos (HU→6-MP).

O conjunto completo de dados obtidos a partir das avaliações esqueléticas fetais são mostrados nos Anexos 52 a 54.

Tabela 4.2.29: Tipos e frequências de anormalidades do esqueleto axial do feto induzidas na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com HU→NaOH, Salina→6-MP e HU→6MP durante a gravidez (DG11), em que houve um intervalo de 4 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg ip; 6-MP: 24 mg/kg sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU→NaOH	Salina→6-MP	HU→6-MP
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	136	110	100
<i>Ninhadas (N)</i>	17	12	11	10
<i>Malformações (%):</i>				
CRÂNIO:				
Fusão do osso zigomático com processo jugular do maxilar	0,56 (5,88)	6,62 ^a (41,67) ^a	32,73 ^{ab} (90,91) ^{ab}	24,00 ^{ab} (80,00) ^{ab}
COLUNA VERTEBRAL:				
Forma irregular de 1-2 corpos vertebrais torácicos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,64 ^a (36,36) ^{ab}	1,00 (10,00)
Interrupção do processo de fechamento de 1-6 corpos vertebrais torácicos	0,00 (0,00)	11,76 ^a (75,00) ^a	9,09 ^a (45,54) ^a	20,00 ^{ac} (70,00) ^a
Centros de ossificação de 1-2 corpos vertebrais torácicos em forma de <i>dumb-bell</i>	4,52 (29,41)	2,21 (35,00)	10,91 ^{ab} (63,64) ^b	8,00 ^b (40,00)
Forma irregular de 1-6 corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	1,47 (16,67)	8,18 ^{ab} (63,64) ^{ab}	40,00 ^{abc} (80,00) ^{ab}
Fusão entre 1-2 corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,00 ^{abc} (20,00)
Interrupção do processo de fechamento de 1-6 corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	2,21 ^a (33,33) ^a	21,82 ^{ab} (81,82) ^{ab}	56,00 ^{abc} (90,00) ^{ab}
1-2 corpos vertebrais lombares divididos simetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,00 ^{abc} (40,00) ^{abc}
1-2 corpos vertebrais lombares divididos assimetricamente	0,00 (0,00)	0,74 (8,33)	0,00 (0,00)	3,00 ^a (10,00)
1-6 corpos vertebrais lombares desalinados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	7,27 ^{ab} (27,27) ^{ab}	22,00 ^{abc} (70,00) ^{ab}
Forma irregular de 1-4 corpos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	0,74 (8,33)	7,27 ^{ab} (45,45) ^{ab}	42,00 ^{abc} (70,00) ^{ab}
Interrupção do processo de fechamento de 1-4 corpos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	1,47 (16,67)	18,18 ^{ab} (81,82) ^{ab}	59,00 ^{abc} (80,00) ^{ab}
1-4 corpos vertebrais sacrais divididos simetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	10,00 ^{abc} (30,00) ^{abc}

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ NADA; b ≠ HU→NaOH; c ≠ Salina→6-MP. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Tabela 4.2.30: Tipos e frequências de anormalidades de ossos dos membros anteriores induzidas na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com HU→NaOH, Salina→6-MP e HU→6MP durante a gravidez (DG11), em que houve um intervalo de 4 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU→NaOH	Salina→6-MP	HU→6-MP
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	136	110	100
<i>Ninhadas (N)</i>	17	12	11	10
<i>Malformações (%):</i>				
Ulna torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,82 (18,18)	8,00 ^{abc} (30,00) ^a
Ulna mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,73 ^a (18,18)	8,00 ^{ab} (20,00)
Constricção na ulna	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,00 ^{ab} (10,00)
Ossos rádio torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,91 (9,09)	4,00 ^{ab} (20,00)
Ossos rádio mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,00 (10,00)
Forma irregular do processo deltoide	23,16 (82,35)	29,41 (83,33)	1,82 ^{ab} (18,18) ^{ab}	14,00 ^{abc} (50,00) ^a
Fusão entre 2º e 3º dedo (com ou sem fusão de metacarpos)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,00 ^{ab} (20,00)

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ NADA; b ≠ HU→NaOH; c ≠ Salina→6-MP. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Tabela 4.2.31: Tipos e frequências de anormalidades de ossos dos membros posteriores induzidas na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com HU→NaOH, Salina→6-MP e HU→6MP durante a gravidez (DG11), em que houve um intervalo de 4 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU→NaOH	Salina→6-MP	HU→6-MP
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	136	110	100
<i>Ninhadas (N)</i>	17	12	11	10
<i>Malformações (%):</i>				
Forma irregular do ílio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,82 (18,18)	4,00 ^{ab} (20,00)
Constricção no ílio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,00 ^{ab} (20,00)
Fêmur mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,82 (18,18)	10,00 ^{abc} (30,00) ^{ab}
Constricção no fêmur	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,82 (18,18)	5,00 ^{ab} (20,00)
1º dedo mais longo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	12,73 ^{ab} (81,82) ^{ab}	19,00 ^{ab} (80,00) ^{ab}
Polidactilia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	11,82 ^{ab} (63,64) ^{ab}	16,00 ^{ab} (50,00) ^{ab}

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ NADA; b ≠ HU→NaOH; c ≠ Salina→6-MP. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

4.2.2.4 – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SEQUENCIAL DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO EMBRIÃO: INTERVALO DE 4 HORAS ENTRE AS INJEÇÕES (6-MP→ HU) NO DG11.

4.2.2.4.1 – TOXICIDADE MATERNA, PERDAS GESTACIONAIS, PESO DO FETO E DA PLACENTA, E ANORMALIDADES MORFOLÓGICAS EVIDENCIADAS NO EXAME EXTERNO.

Os efeitos do tratamento com os dois antineoplásicos isoladamente, e da administração dupla sequencial (6-MP→HU; intervalo de 4 horas entre as injeções), no DG11, sobre o ganho de peso das mães durante a gravidez, é apresentado na Tabela 4.2.32. O menor ganho de peso dos grupos que receberam 6-MP, nas 48 horas seguintes ao tratamento (DG 12-11 e DG 13-11), indica que este foi tóxico para o organismo materno. A diminuição do peso do útero gravídico no DG21 mostra que a administração da 6-MP (24 mg/kg sc), no DG11, foi também embriotóxica, resultando em diminuição de peso de fetos e/ou placentas e/ou perdas gestacionais. O ganho de peso materno durante toda a gestação, descontado o peso do útero gravídico, não foi alterado por nenhum dos tratamentos realizados no DG11, o que indica que, no caso da 6-MP, houve recuperação do peso materno antes do final da gestação. O tratamento apenas com HU (250 mg/kg *ip*) no DG11, não alterou, nem o ganho de peso materno, nem o peso do útero gravídico (Tabela 4.2.32).

O tratamento com os antineoplásicos isoladamente e a administração sequencial dos mesmos, diminuiram o peso corporal de fetos e peso das placentas (Tabela 4.2.33). A magnitude do efeito da HU (250 mg/kg *ip*) sobre os pesos de fetos e placentas foi menor do que a magnitude do efeito da 6-MP (24 mg/kg *sc*). Embora os dois fármacos tenham reduzido os pesos fetais e placentários, o tratamento sequencial com ambos resultou em alteração menor do que a causada pela 6-MP isoladamente, o que é consistente com a interpretação de que HU atenuou os efeitos da 6-MP. A razão peso da placenta/peso do feto foi reduzida pelo tratamento com 6-MP, mas não pela injeção de HU, efeito este atenuado no caso da administração sequencial dos dois antineoplásicos.

A administração de 6-MP no DG11 elevou a proporção de fetos com anormalidades morfológicas detectadas pelo exame externo no DG21 (feto individual como unidade de análise), efeito este exacerbado na prole de mães que receberam o tratamento duplo sequencial (Tabela 4.2.33). O tratamento com 6-MP (mas não com HU) aumentou a proporção de fetos mortos por sítios de implantação (fetos individuais como unidade de análise), e o número médio de fetos por ninhada. A proporção de fetos vivos por sítios de

implantação decresceu nos grupos tratados com 6-MP, mas não naquele que recebeu apenas HU (Tabela 4.2.33). A menor proporção de fetos mortos e maior de fetos vivos por sítios de implantação, no grupo exposto sequencialmente (6-MP→HU), em comparação ao que recebeu apenas 6-MP, é consistente com a interpretação de que a administração de HU após 6-MP atenuou o efeito embriotal deste último fármaco (Tabela 4.2.33).

4.2.2.4.1.1 – ANOMALIAS EVIDENCIADAS PELO EXAME EXTERNO:

Os tipos e incidências de anomalias detectadas pelo exame externo são mostrados na Tabela 4.2.34. A administração de 6-MP, mas não de HU, no DG11, aumentou a frequência de anomalias notadas após exame externo dos fetos, em comparação ao que foi registrado para o grupo controle não tratado. O tratamento sequencial com HU (6-MP→HU) aumentou a proporção da observação “polidactia nas patas traseiras” e diminuiu a ocorrência de algumas anomalias na cauda (cauda curta, e ponta de cauda), em comparação com o monotratoamento com 6-MP. Exceto por esses casos, as incidências de anomalias visíveis no exame externo não diferiram entre o monotratoamento com 6-MP e o tratamento sequencial com os dois antineoplásicos (6-MP→HU).

Tabela 4.2.32: Ganho de peso corporal durante a gravidez de ratas tratadas sequencialmente (DG11) com NaOH→HU, 6-MP→Salina e 6-MP→HU, em que houve um intervalo de 4 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg ip; 6-MP: 24 mg/kg sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	NaOH→HU	6-MP→Salina	6-MP→HU
<i>Fêmeas grávidas (N)</i>	17	9	11	14
<i>Reabsorções (N)</i>	11	5	13	11
Por sítios de implantação (%)	5,85	4,67	9,42	6,92
Por implantação por ninhada (%)	7,69 (9,55)	0,00 (8,01)	9,09 (14,29)	4,17 (18,64)
<i>Peso do útero gravídico (g)</i>	74,95 ± 14,58	78,45 ± 18,94	42,57 ± 11,55 ab	43,91 ± 13,59 ab
<i>Ganho de peso materno (Δg):</i>				
Dia 11-0	50,46 ± 19,06	49,16 ± 7,18	50,66 ± 4,88	48,16 ± 6,83
Dia 12-11	2,99 ± 5,12	0,51 ± 4,13	- 6,52 ± 3,78 ab	- 4,15 ± 3,28 a
Dia 13-11	9,81 ± 4,67	1,41 ± 4,12 a	4,82 ± 3,20 a	2,48 ± 3,30 a
Dia 15-11	18,46 ± 5,91	14,21 ± 4,30	13,37 ± 3,36	11,70 ± 4,14 a
Dia 21-11	82,54 ± 16,22	87,32 ± 16,10	54,56 ± 11,29 ab	55,72 ± 13,08 ab
Dia 21-0	133,00 ± 23,68	136,48 ± 19,09	105,22 ± 13,41 a	103,88 ± 15,90 a
Dia 21-0 - (peso do útero)	58,05 ± 20,04	58,04 ± 8,85	62,65 ± 8,16	59,97 ± 6,53

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. Os dados representados como medianas (Q1-Q3) foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. (Q3-Q1): amplitude interquartilica, calculada pela diferença entre o 3º (Q3) e o 1º quartil (Q1). Os dados representados como média ± d.p foram analisados por ANOVA seguida por teste de Bonferroni. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ NADA; b ≠ NaOH→HU; c ≠ 6-MP→Salina.

Tabela 4.2.33: Efeito embriotóxico do tratamento sequencial de ratas grávidas com NaOH→HU, 6-MP→Salina e 6-MP→HU (DG11), com um intervalo de 2 horas entre as injeções: Análise dos parâmetros obtidos por ocasião da cesária (DG21). HU: 250 mg/kg ip; 6-MP: 24 mg/kg sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRETAMENTO			
	NADA	NaOH→HU	6-MP→Salina	6-MP→HU
<i>Fêmeas grávidas</i> (N)	17	9	11	14
<i>Sítios de implantação</i> (N)	188	107	138	159
Por ninhada (%)	11,00 (3,00)	13,00 (1,00)	13,00 (3,00)	11,50 (4,00)
<i>Reabsorções</i> (N)	11	5	13	11
Por sítios de implantação (%)	5,85	4,67	9,42	6,92
Por implantação por ninhada (%)	7,69 (9,55)	0,00 (8,01)	9,09 (14,29)	4,17 (18,64)
<i>Fetos mortos</i> (N)	0	0	16	8
Por sítios de implantação (%)	0,00	0,00	11,59 ab	5,03 abc
Por ninhada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,00 (3,00) ab	0,00 (1,25)
<i>Fetos vivos</i> (N)	177	102	109	140
Por sítios de implantação (%)	94,15	95,33	78,99 ab	88,05 c
Por ninhada	11,00 (3,00)	12,00 (1,50)	10,00 (6,00)	10,50 (4,50)
<i>Fetos malformados</i> (%)	1,12	0,00	78,90 ab	92,14 abc
<i>Peso fetal</i> (g)				
Individual	4,97 ± 0,38	4,78 ± 0,36 a	2,47 ± 0,54 ab	2,78 ± 0,50 abc
Por ninhada (média ± d.p.)	5,00 ± 0,24	4,81 ± 0,26	2,40 ± 0,47 ab	2,79 ± 0,32 abc
<i>Peso das placentas</i> (g)				
Individual	0,49 ± 0,08	0,44 ± 0,08 a	0,18 ± 0,04 ab	0,18 ± 0,04 ab
Por ninhada (média ± d.p.)	0,50 ± 0,05	0,45 ± 0,07	0,19 ± 0,02 ab	0,19 ± 0,03 ab
<i>Peso placenta/peso fetal</i> (%)				
Individual	9,98 ± 1,61	9,23 ± 1,32	7,70 ± 2,03 ab	6,58 ± 1,49 abc
Por ninhada (média ± d.p.)	10,36 ± 1,18	9,38 ± 1,13	7,95 ± 1,57 a	6,71 ± 0,98 ab

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. Os dados representados como medianas (Q1-Q3) foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. (Q3-Q1): amplitude interquartilica, calculada pela diferença entre o 3º (Q3) e o 1º quartil (Q1). Os dados representados como média ± d.p foram analisados por ANOVA seguida por teste de Bonferroni. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ NADA; b ≠ NaOH→HU; c ≠ 6-MP→Salina.

Tabela 4.2.34: Tipos e frequências de anomalias detectadas pelo exame externo na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com NaOH→HU, 6-MP→Salina e 6-MP→HU durante a gravidez (DG11), em que houve um intervalo de 4 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg ip; 6-MP: 24 mg/kg sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	NaOH→HU	6-MP→Salina	6-MP→HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	102	109	140
<i>Ninhadas (N)</i>	17	9	11	14
<i>Malformações (%):</i>				
Posição irregular PDE e/ou PDD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,83 (9,09)	0,00 (0,00)
Posição irregular PTE e/ou PTD	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	13,76 ^{ab} (27,27)	10,71 ^{ab} (35,71) ^a
Ausência de 1 ou mais dedos na PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,75 (9,09)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 5º dedo PTE e/ou PTD	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Polidactilia PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	23,85 ^{ab} (63,64) ^{ab}	59,29 ^{abc} (85,71) ^{ab}
Fusão entre dois dedos PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,75 (9,09)	0,71 (7,14)
1º dedo da PTE e/ou PTD maior	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	28,44 ^{ab} (27,27) ^a	22,86 ^{ab} (64,69) ^{ab}
1º dedo da PTE e/ou PTD menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,83 (9,09)	0,00 (0,00)
Presença de microdedo na PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,83 (18,18)	0,00 (0,00)
Projeção de tecido no centro da planta da PTE	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,71 (7,14)
Cauda curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,59 ^{ab} (18,18)	0,00 ^c (0,00)
Cauda encrespada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,92 (9,09)	0,71 (7,14)
Ponta de cauda	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,67 ^a (9,09)	0,00 ^c (0,00)
Cauda curta e encrespada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,67 ^a (27,27) ^a	0,71 (7,14)
Cauda curta com ponta curva	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,67 ^a (27,27) ^a	1,43 (14,29)
Cauda com ponta curva	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,67 ^a (27,27) ^a	5,00 ^{ab} (21,43) ^a
Protusão da língua	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	63,30 ^{ab} (100,00) ^{ab}	49,29 ^{ab} (100,00) ^{ab}
Micrognatia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,42 ^{ab} (18,18)	0,00 (0,00)

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ NADA; b ≠ NaOH→HU; c ≠ 6-MP→Salina. PTE e PTD: patas traseiras, esquerda e direita.

4.2.2.4.2 – ANORMALIDADES DO ESQUELETO FETAL.

As anormalidades do esqueleto axial fetal, encontradas na prole de ratas controles e tratadas com os fármacos antineoplásicos no DG11, são apresentadas na Tabela 4.2.35.

A administração de 6-MP, mas não a de HU, elevou consideravelmente a incidência da observação “fusão do osso zigomático com o processo jugular do maxilar”. As incidências desta observação não diferiram entre o grupo tratado apenas com 6-MP e aquele tratado sequencialmente com os dois fármacos (6-MP→HU). Por outro lado, a observação “mandíbula curta” ou “micrognatia”, foi registrada na prole de ratas tratadas, apenas com 6-MP.

As administrações apenas de 6-MP ou HU, aumentaram a incidência de algumas anormalidades (malformações) de ossos da coluna vertebral (grupos 6-MP→Salina e HU→Salina), sendo o efeito da primeira (6-MP) mais evidente (Tabela 4.2.35). O tratamento sequencial (6-MP→HU), entretanto, resultou em respostas variadas em comparação com o monotratoamento.

Os efeitos do tratamento sequencial, em comparação com o monotratoamento no DG11, podem ser sintetizados como se segue:

- i) As freqüências das observações “interrupção do fechamento de corpos vertebrais torácicos e sacrais”, e de “corpos vertebrais lombares e sacrais com forma irregular”, não foram alteradas pelo tratamento posterior com HU.
- ii) As incidências das observações “corpos vertebrais torácicos com forma irregular” e “interrupção do fechamento de corpos vertebrais lombares” foram atenuadas pelo tratamento posterior com HU.
- iii) A maior incidência da observação “interrupção do fechamento de corpos vertebrais torácicos”, no grupo que recebeu tratamento duplo sequencial (24,29%), corresponde aproximadamente à soma das freqüências registradas com os monotratoamentos (6-MP→Salina e 6-MP→HU), que foram, 7,84% e 15,60%, respectivamente.
- iv) As observações “centros de ossificação com a forma *dumb-bell* em corpos vertebrais lombares”, “interrupção do fechamento de corpos vertebrais sacrais”, e “forma irregular de corpos vertebrais caudais” foram maiores nos grupos que receberam tratamento duplo e sequencial.

As anormalidades de ossos dos membros anteriores são mostradas na Tabela 4.2.36. O tratamento com 6-MP (mas não aquele com HU) aumentou a incidência das observações “osso ulna mais curto”, “osso rádio curto” e “osso rádio torto”. Esses efeitos da 6-MP foram antagonizados pela administração sequencial da HU, 4 horas depois da injeção de 6-MP. A frequência espontânea (grupo controle não tratado) da observação “Processo deltoide com forma irregular” foi alta (23,2%). A HU aumentou a frequência desta observação (38,2%) em relação ao registrado no grupo controle, enquanto o tratamento com 6-MP apenas reduziu drasticamente a frequência registrada na prole de ratas do grupo controle. Neste caso o tratamento sequencial posterior (4 horas) com HU, elevou a frequência da observação, em comparação com o que foi registrado com o monotratoamento com 6-MP (Tabela 4.2.36).

As anormalidades de membros posteriores e cinta pélvica e respectivas incidências são apresentadas na Tabela 4.2.37. A administração de HU, 4 horas depois da 6-MP, diminuiu a frequência das observações “forma irregular do ílio” e “fêmur curto”, em comparação com o registrado na prole de ratas tratadas apenas com 6-MP, e aumentou a frequência de polidactilia. As frequências de fetos com as observações “tíbia torta”, “tíbia curta”, “tíbia ausente” e “1º dedo mais longo”, foram equivalentes nos grupos que receberam apenas 6-MP (6-MP→Salina) e o tratamento duplo sequencial (6-MP→HU).

Tabela 4.2.35: Tipos e frequências de anormalidades do esqueleto axial do feto induzidas na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com NaOH→HU, 6-MP→Salina e 6-MP→HU durante a gravidez (DG11), em que houve um intervalo de 4 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg ip; 6-MP: 24 mg/kg sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	NaOH→HU	6-MP→Salina	6-MP→HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	102	109	140
<i>Ninhadas (N)</i>	17	9	11	14
<i>Malformações (%):</i>				
CRÂNIO:				
Fusão do osso zigomático com processo jugular do maxilar	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	35,78 ^{ab} (90,91) ^{ab}	31,43 ^{ab} (85,71) ^{ab}
Mandíbula curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,42 ^{ab} (18,18) ^{ab}	0,00 ^c (0,00) ^c
COLUNA VERTEBRAL:				
Forma irregular de 1-2 corpos vertebrais torácicos	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	6,42 ^{ab} (54,55) ^{ab}	0,71 ^c (7,14) ^c
Interrupção do processo de fechamento de 1-6 corpos vertebrais torácicos	0,00 (0,00)	7,84 ^a (77,78) ^a	15,60 ^{ab} (63,64) ^a	24,29 ^{ab} (50,00) ^a
Forma irregular de 1-2 corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	2,94 ^a (33,33) ^a	3,67 ^a (27,27) ^a	2,14 (21,43) ^a
Interrupção do processo de fechamento de 1-6 corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	1,96 (22,22) ^a	16,51 ^{ab} (45,45) ^a	8,57 ^{abc} (28,57) ^a
Centros de ossificação de 1-2 corpos vertebrais lombares em forma de <i>dumb-bell</i>	1,69 (11,76)	0,00 (0,00) ^a	0,92 (9,09) ^a	6,63 ^{abc} (50,00) ^{abc}
Forma irregular de 1-4 corpos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	10,09 ^{ab} (27,27) ^a	13,57 ^{ab} (42,86) ^a
Interrupção do processo de fechamento de 1-4 corpos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	1,96 (22,22) ^a	18,35 ^{ab} (54,55) ^a	27,86 ^{ab} (57,14) ^a
Forma irregular de 1-2 corpos vertebrais caudais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,57 ^a (7,14)
Interrupção do processo de fechamento de 1-2 corpos vertebrais caudais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,29 ^{abc} (7,14)

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ NADA; b ≠ NaOH→HU; c ≠ 6-MP→Salina. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Tabela 4.2.36: Tipos e frequências de anormalidades de ossos dos membros anteriores induzidas na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com NaOH→HU, 6-MP→Salina e 6-MP→HU durante a gravidez (DG11), em que houve um intervalo de 4 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	NaOH→HU	6-MP→Salina	6-MP→HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	102	109	140
<i>Ninhadas (N)</i>	17	9	11	14
<i>Malformações (%):</i>				
Ulna mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,59 ^{ab} (9,09)	0,00 ^c (0,00)
Ossos rádio torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,67 ^{ab} (9,09)	0,00 ^c (0,00)
Ossos rádio mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,67 ^{ab} (9,09)	0,00 ^c (0,00)
Forma irregular do processo deltoide	23,16 (82,35)	38,24 ^a (100,00)	3,67 ^{ab} (27,27) ^{ab}	5,71 ^{ab} (35,71) ^{ab}

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a ≠ NADA; b ≠ NaOH→HU; c ≠ 6-MP→Salina. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

Tabela 4.2.37: Tipos e frequências de anormalidades de ossos dos membros posteriores induzidas na prole (DG21) de ratas tratadas sequencialmente com NaOH→HU, 6-MP→Salina e 6-MP→HU durante a gravidez (DG11), em que houve um intervalo de 4 horas entre as injeções. HU: 250 mg/kg *ip*; 6-MP: 24 mg/kg *sc*.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	NaOH→HU	6-MP→Salina	6-MP→HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	102	109	140
<i>Ninhadas (N)</i>	17	9	11	14
<i>Malformações (%):</i>				
Forma irregular do ílio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,50 ^{ab} (27,27) ^a	0,00 ^c (0,00) ^c
Fêmur mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	15,60 ^{ab} (36,36) ^{ab}	0,71 ^c (7,14) ^c
Ausência de tíbia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,59 ^{ab} (27,27) ^a	1,43 (14,29)
Tíbia torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,67 ^a (18,18)	1,43 (14,29)
Tíbia mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	7,34 ^{ab} (18,18)	8,57 ^{ab} (14,29)
1° dedo da pata traseira mais longo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	28,44 ^{ab} (27,27) ^a	22,86 ^{ab} (64,29) ^{ab}
Polidactília	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	23,85 ^{ab} (63,64) ^{ab}	59,29 ^{abc} (85,71) ^{ab}

Os veículos da 6-MP e HU foram e NaOH 0,05N, pH 8,0 e salina 0,9%. As proporções foram analisadas pelo teste do Chi-Quadrado ou probabilidade exata de Fisher. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram indicadas por letras sobrescritas, da seguinte maneira: a \neq NADA; b \neq NaOH→HU; c \neq 6-MP→Salina. As alterações registradas apareceram uni e/ou bilateralmente.

4.2.3 – SÍNTESE DOS EFEITOS EMBRIOTÓXICOS RESULTANTES DAS ADMINISTRAÇÕES CONCOMITANTE E SEQUENCIAL DE HU E 6-MP EM RATOS.

A administração concomitante de 6-MP (dose teratogênica, 24 mg/kg *sc*) e HU (NOAEL para embriotoxicidade, 250 mg/kg *ip*) resultou em efeito embriotóxico de menor magnitude do que é observado após o tratamento com 6-MP apenas. Essa interpretação tem apoio nas seguintes alterações do efeito embriotóxico da 6-MP (monotratamento) quando as ratas são tratadas concomitantemente com 6-MP e HU (tratamento combinado):

- i)** Diminuição das proporções de fetos mortos e malformados.
- ii)** Atenuação da redução dos pesos corporais dos fetos a termo (feto individual e ninhada como unidade de análise).
- iii)** Atenuação da diminuição dos pesos das placentas (individual como unidade de análise).
- iv)** Atenuação dos aumentos das incidências de várias anormalidades detectadas no exame externo e anomalias do esqueleto fetal (malformações e variações).

Os efeitos da administração concomitante de HU e 6-MP em comparação com o monotratamento (anomalias selecionadas mostradas nas Figuras 4.2.3.1 e 4.2.3.2) são apresentados sob a forma de gráficos (histogramas) nas Figuras 4.2.3.3 e 4.2.3.4. A administração concomitante de HU (250 mg/kg) antagonizou parcialmente os efeitos da 6-MP, como se uma dose inferior a 24 mg/kg de 6-MP tivesse sido injetada. Para algumas ocorrências observadas nas patas dianteiras, como “ulna mais curta”, “osso rádio torto” e “osso rádio mais curto”, os efeitos teratogênicos da 6-MP foram completamente abolidos pelo tratamento concomitante com HU (Figura 4.2.3.4).

A) CRÂNIO:



B) COLUNA VERTEBRAL:

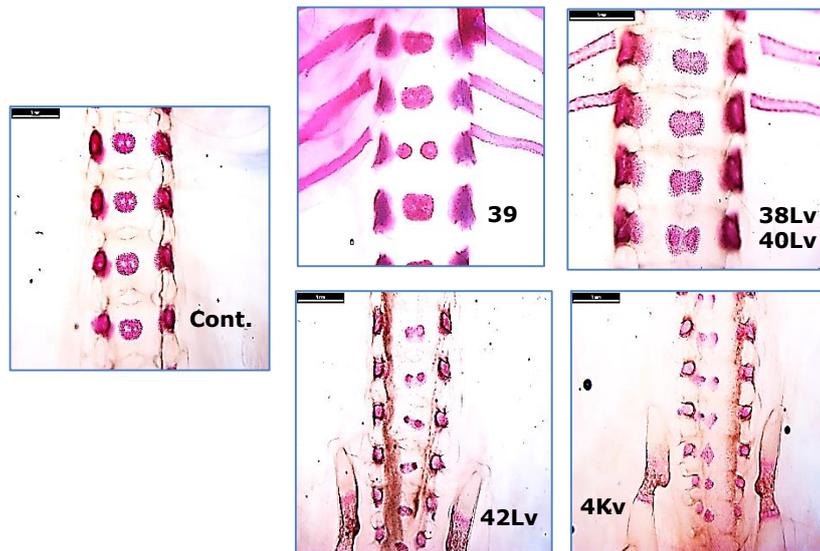
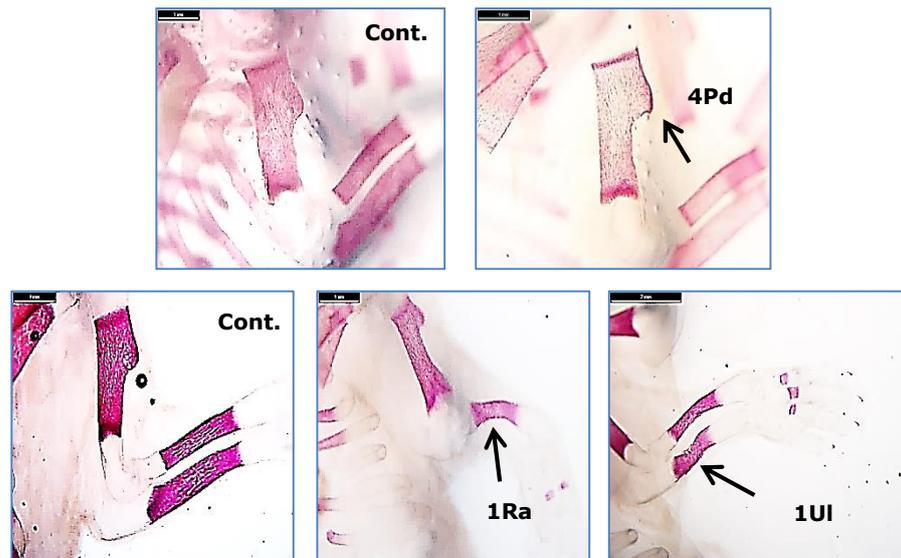


Fig. 4.2.3.1: Malformações do esqueleto axial induzidas pela 6-MP, cujas incidências foram modificadas pela administração concomitante ou sequencial de HU.

A) Crânio: Cont.: controle; 140: Fusão do osso zigomático com o processo jugular do maxilar. **B) Coluna vertebral:** Cont.: controle; 38Lv: Interrupção do fechamento de corpos vertebrais lombares; 39: Corpos vertebrais divididos simetricamente 40Lv: Dumb-bell em corpos vertebrais torácicos; 42Lv: corpos vertebrais lombares desalinhados; 4Kv: Forma irregular de corpos vertebrais sacrais.

A) PATAS DIANTEIRAS:



B) PATAS TRASEIRAS:

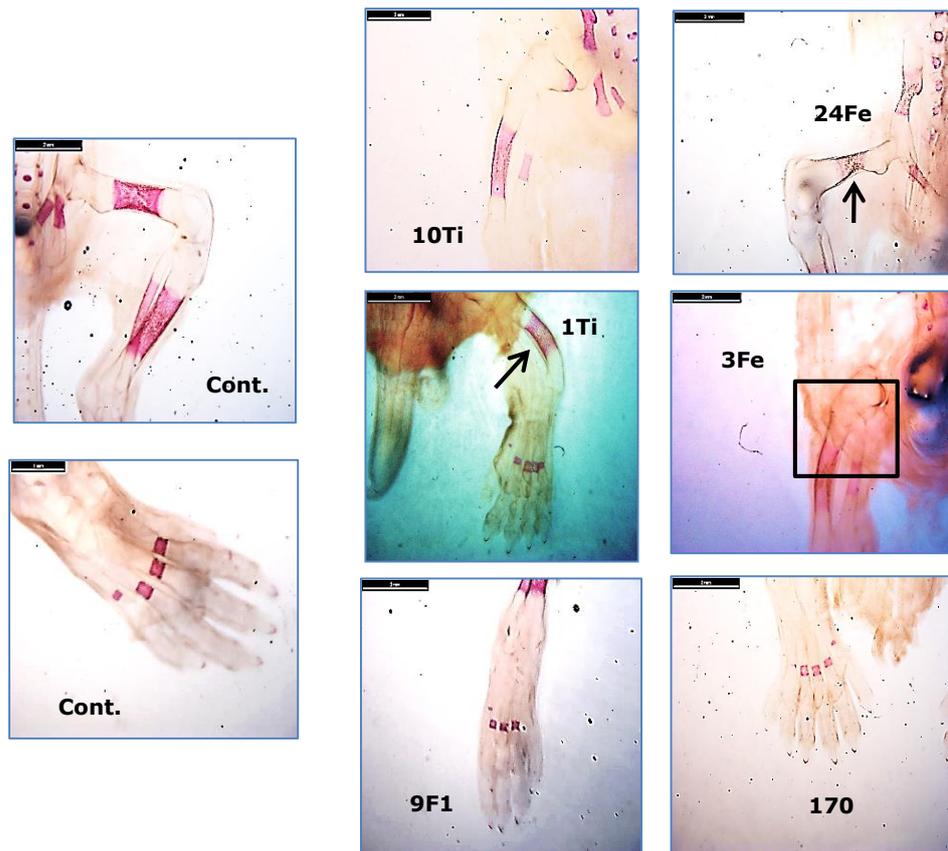


Fig. 4.2.3.2: Malformações dos membros anteriores e posteriores induzidas pela 6-MP, cujas incidências foram modificadas pela administração concomitante ou sequencial de HU.

A) Patas dianteiras: 4Pd: Forma irregular do processo deltoide; 1UI: Ulna torta; 10UI: Ulna mais curta; 1Ra: Rádio torto; 10Ra: Rádio mais curto. **B) Patas traseiras:** 1Ti: Tíibia torta; 10Ti: Tíibia mais curta; 3Fe: Ausência de fêmur; 10Fe: fêmur mais curto; 24Fe: constrição do fêmur; 9F1: 1º dedo mais longo; 170: polidactília.

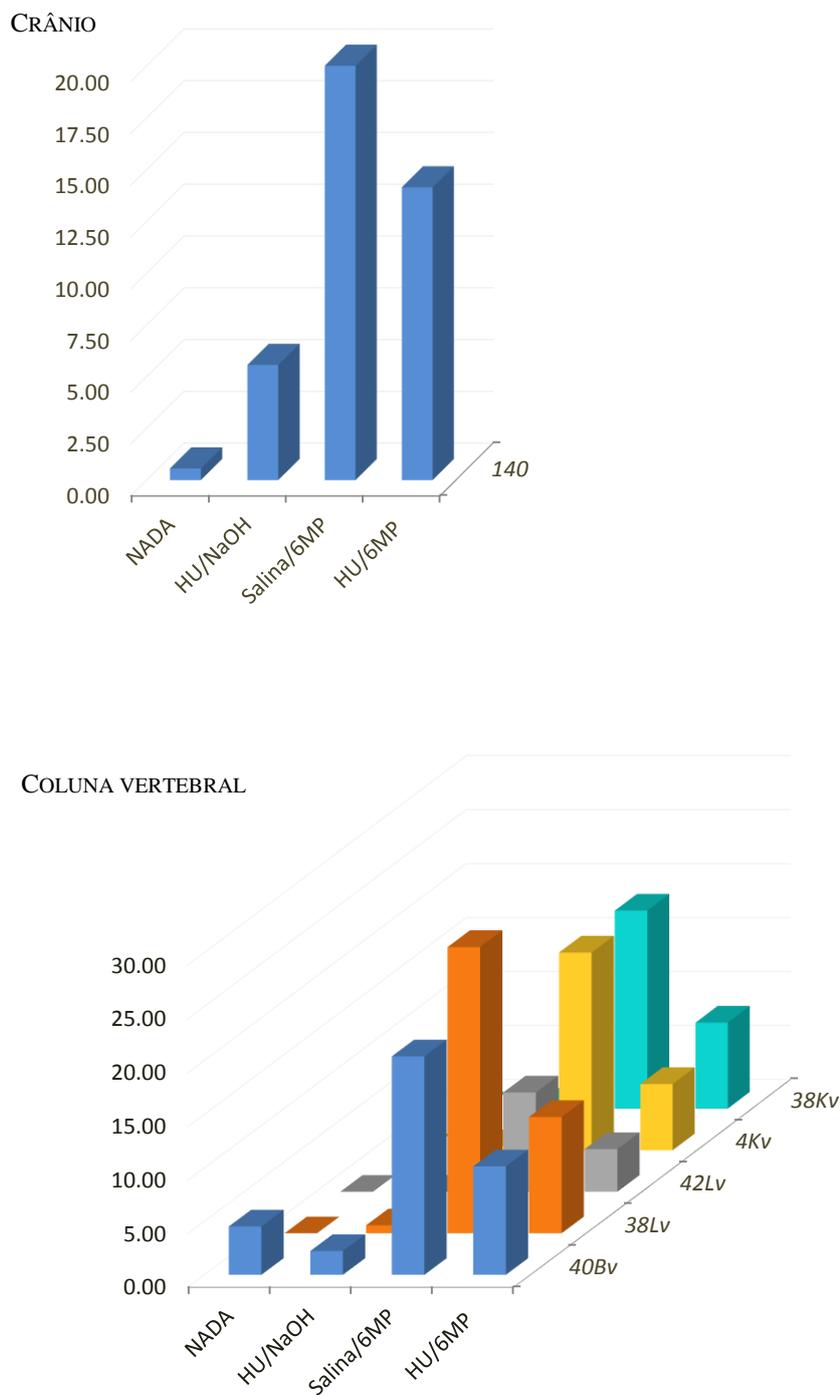
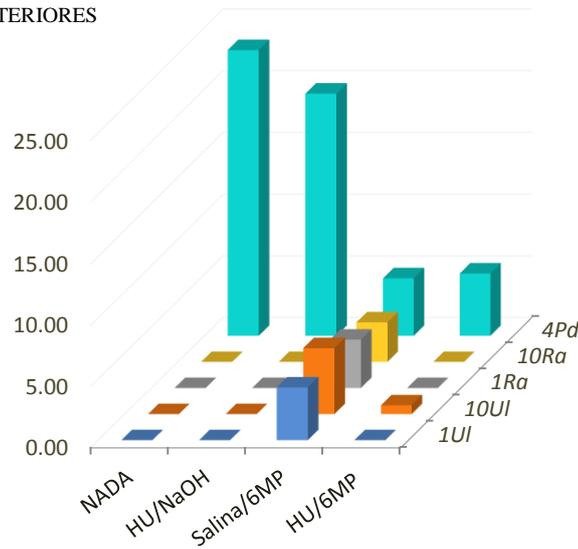


Fig. 4.2.3.3: Efeitos resultantes da exposição concomitante à HU e 6-MP sobre as incidências de malformações do esqueleto axial fetal. HU: 250 mg/kg ip; 6-MP: 24 mg/kg sc.

140: Fusão do osso zigomático com o processo jugular do maxilar; **40Bv:** 1-6 centros de ossificação de corpos vertebrais torácicos em forma de *dumb-bell*; **38Lv:** Interrupção do processo de fechamento de 1-6 os corpos vertebrais lombares; **42Lv:** 1-6 corpos vertebrais lombares desalinhados; **4Kv:** Forma irregular de 1-todos corpos vertebrais sacrais; **38Kv:** Interrupção do processo de fechamento de 1-todos corpos vertebrais sacrais.

MEMBROS ANTERIORES



MEMBROS POSTERIORES

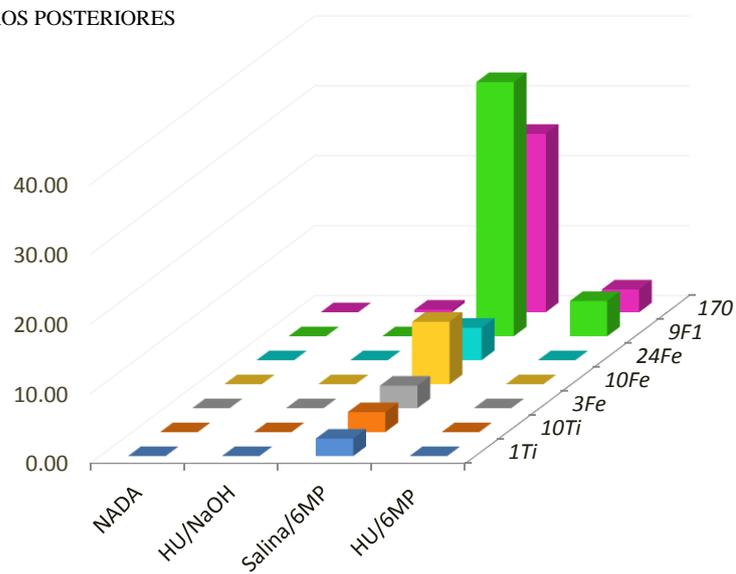


Fig. 4.2.3.4: Efeitos resultantes da exposição concomitante à HU e 6-MP sobre as incidências de malformações dos ossos dos membros anteriores e posteriores.

1UI: Úlna torta; **10UI:** Úlna mais curta; **1Ra:** Rádio torto; **10Ra:** Rádio mais curto; **4Pd:** Forma irregular do processo deltoide; **1Ti:** Tibia torta; **10Ti:** Tibia mais curta; **3Fe:** Ausência de fêmur; **10Fe:** Fêmur mais curto; **24Fe:** Constricção do fêmur; **9F1:** 1º dedo mais longo; **170:** Polidactilia.

Nos experimentos envolvendo esquemas de exposição combinada sequencial aos fármacos HU e 6-MP, os grupos que receberam HU, 2 horas ou 4 horas antes da 6-MP, ou 4 horas depois da 6MP, não diferiram dos que receberam veículo e 6MP em relação à maioria dos parâmetros de toxicidade materna e embriotoxicidade. Entretanto, a HU administrada 2 horas depois da 6MP, antagonizou os efeitos notados com 6-MP sobre os pesos dos fetos, e diminuiu a proporção de fetos apresentando a anomalia externa “1º dedo da pata traseira maior”. Nos experimentos em que a HU foi administrada 4 horas antes da 6-MP, o tratamento com ambos os antineoplásicos provocou o aparecimento de fetos com a anomalia externa “cauda curta e encrespada”. Nos demais experimentos envolvendo administrações sequenciais, a HU não modificou as frequências de malformações externas aumentadas pelo monotratoamento com 6-MP.

A análise do efeito das administrações sequenciais sobre o conjunto de anomalias selecionadas (item 4.2.2; Figuras 4.2.3.1 e 4.2.3.2) evidenciou que:

- i) A administração da HU 2 horas antes da 6-MP não alterou a magnitude dos aumentos de frequência de anomalias do esqueleto axial e dos membros anteriores e posteriores observados com o monotratoamento com 6-MP. A exceção foi um aumento de dois tipos de alterações da coluna vertebral: corpos vertebrais lombares desalinhados (42Lv: malformação) e interrupção do fechamento de corpos vertebrais lombares (38Lv: variação), representados na Figura 4.2.3.5.

COLUNA VERTEBRAL

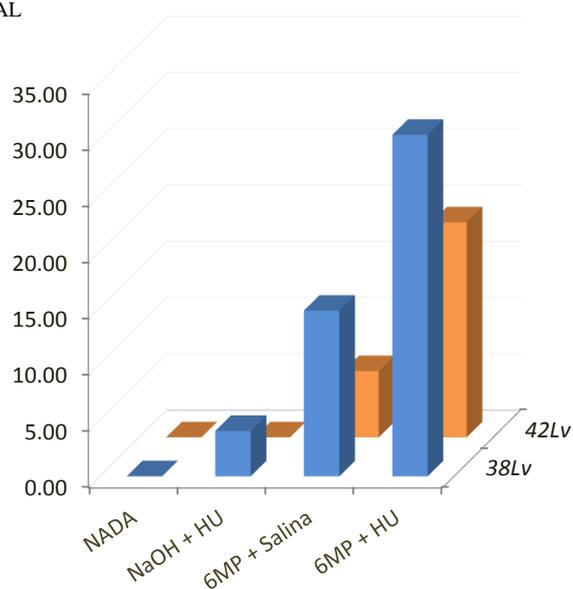


Fig. 4.2.3.5: Efeitos resultantes da exposição sequencial à HU e 6-MP sobre as incidências de malformações do esqueleto axial fetal, utilizando um intervalo de 2 horas entre os tratamentos.

38Lv: Interrupção do processo de fechamento de 1-6 corpos vertebrais lombares; **42Lv:** 1-6 corpos vertebrais lombares desalinhados.

- ii) A administração da HU 2 horas depois da 6-MP, não alterou as frequências de várias anormalidades registradas com o monotratoamento com 6-MP. A incidência de algumas anomalias, entretanto, foi atenuada parcialmente pela co-administração de HU. (Figuras 4.2.3.6 e 4.2.3.7).

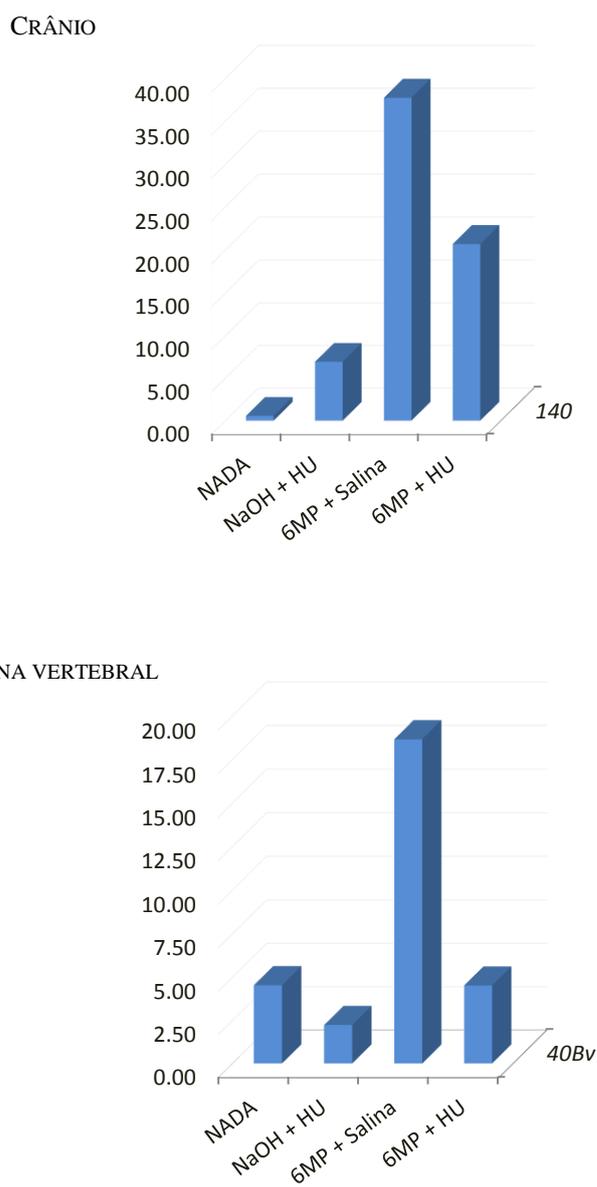
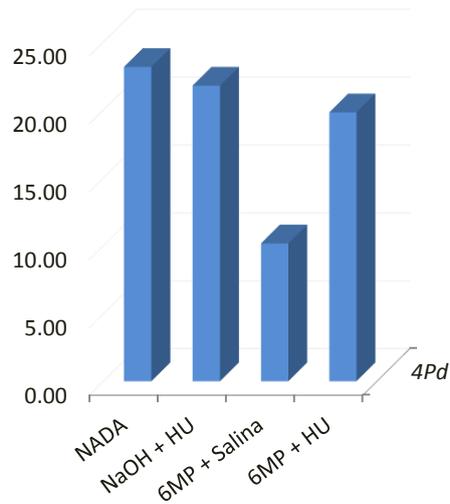


Fig. 4.2.3.6: Efeitos resultantes da exposição sequencial à 6-MP e HU sobre as incidências de malformações do esqueleto axial fetal, utilizando um intervalo de 2 horas entre os tratamentos.

140: Fusão do osso zigomático com o processo jugular do maxilar; **40Bv:** 1-2 centros de ossificação de corpos vertebrais torácicos em forma de *dumb-bell*.

MEMBROS ANTERIORES



MEMBROS POSTERIORES

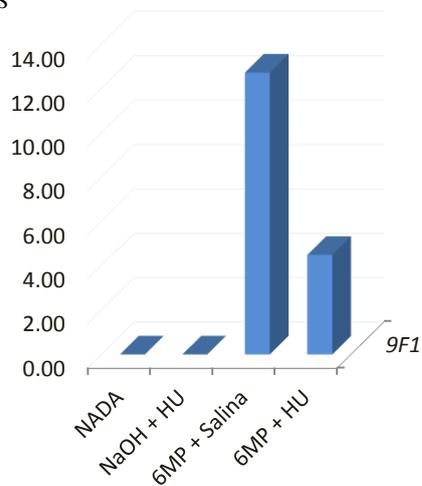


Fig. 4.2.3.7: Efeitos resultantes da exposição sequencial à 6-MP e HU sobre as incidências de malformações dos ossos dos membros anteriores e posteriores, utilizando um intervalo de 2 horas entre os tratamentos.

4Pd: Forma irregular do processo deltoide; **9F1:** 1º dedo mais longo.

- iii) A administração de HU 4 horas antes da 6-MP não modificou as frequências de várias anormalidades registradas com o monotratoamento com 6-MP, tendo provocado o aumento de algumas alterações da coluna vertebral, patas dianteiras e patas traseiras. (Figuras 4.2.3.8 e 4.2.3.9).

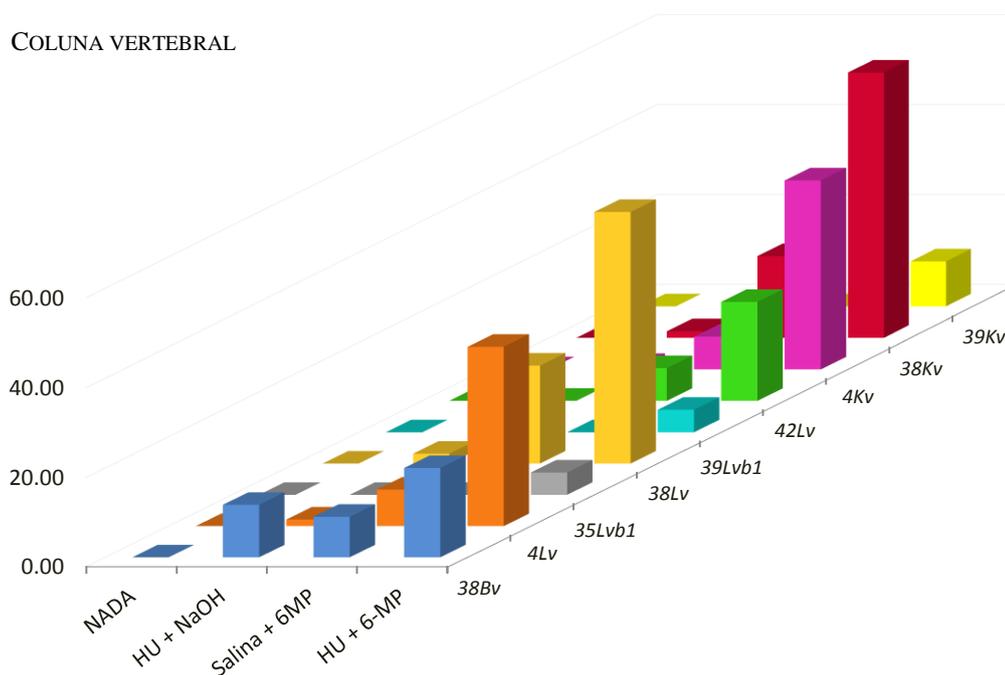
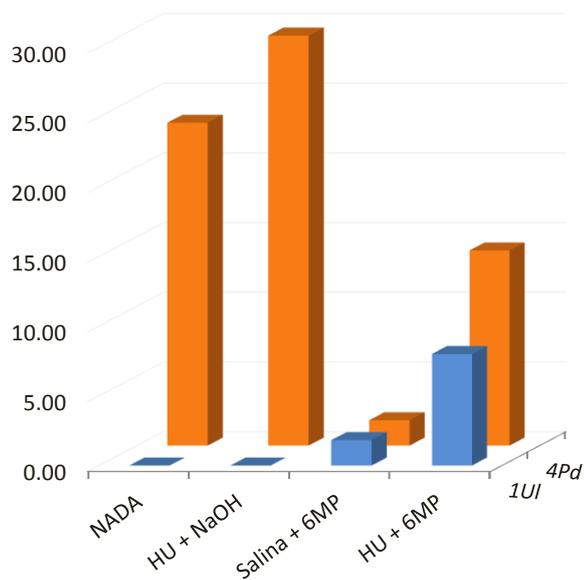


Fig. 4.2.3.8: Efeitos resultantes da exposição sequencial à HU e 6-MP sobre as incidências de malformações do esqueleto axial fetal, utilizando um intervalo de 4 horas entre os tratamentos.

38Bv: Interrupção do processo de fechamento de 1-6 corpos vertebrais torácicos; **4Lv:** Forma irregular de 1-6 corpos vertebrais lombares; **35Lv:** Fusão entre 1-2 corpos vertebrais lombares; **38Lv:** Interrupção do processo de fechamento de 1-6 corpos vertebrais lombares; **39Lv:** 1-2 corpos vertebrais lombares divididos simetricamente; **42Lv:** 1-6 corpos vertebrais lombares desalinhados; **4Kv:** Forma irregular de 1-4 corpos vertebrais sacrais; **38Kv:** Interrupção do processo de fechamento de 1-4 corpos vertebrais sacrais; **39Kv:** 1-4 corpos vertebrais sacrais divididos simetricamente.

PATAS DIANTEIRAS



PATAS TRASEIRAS

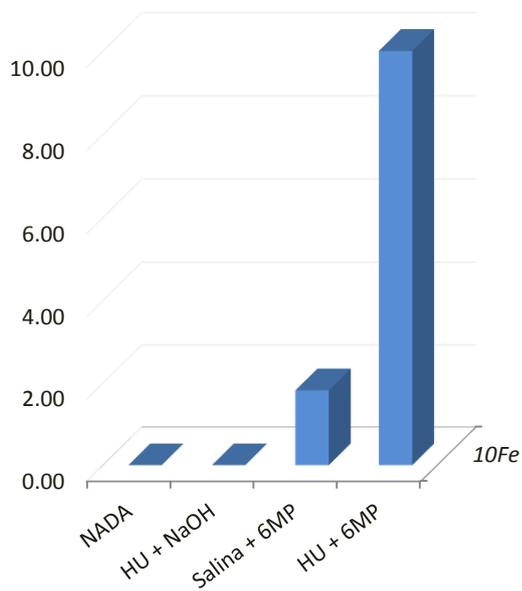


Fig. 4.2.3.9: Efeitos resultantes da exposição sequencial de HU à 6-MP sobre as incidências de malformações do esqueleto apendicular anterior e posterior fetal, utilizando um intervalo de 4 horas entre os tratamentos.

4Pd: Forma irregular do processo deltoide; **1UI:** Ulna torta; **10Fe:** Fêmur mais curto.

- iv) A administração de HU 4 horas depois da 6-MP atenuou o aumento da frequência de algumas anomalias registradas com o monotratoamento com 6-MP (crânio, coluna vertebral e patas dianteiras), e elevou frequência de outras (coluna e pata traseira). (Figuras 4.2.3.10 e 4.2.3.11).

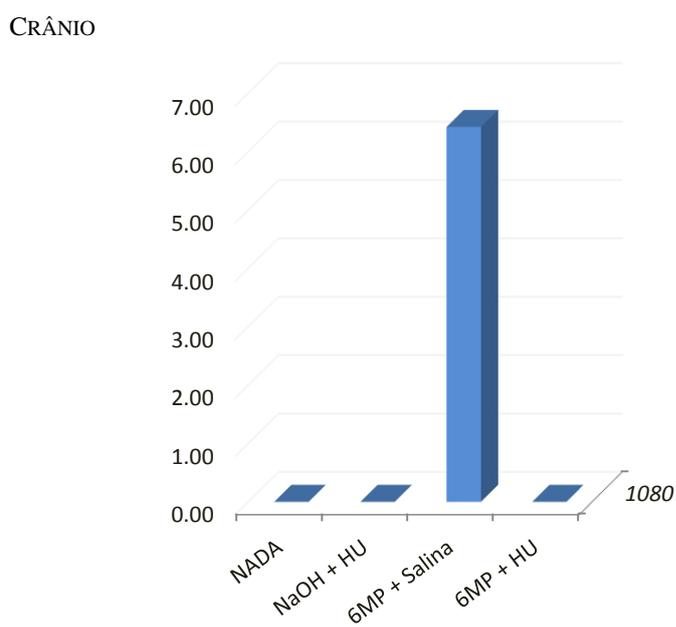
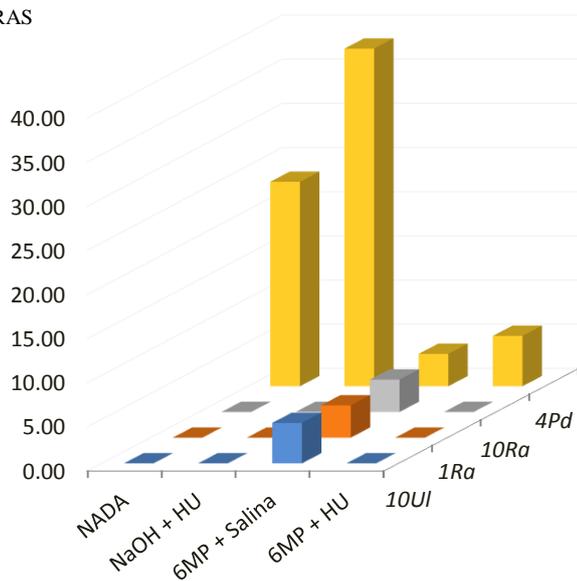


Fig. 4.2.3.10: Efeito resultante da exposição sequencial à 6-MP e HU sobre as incidências de malformações do esqueleto axial fetal, utilizando um intervalo de 4 horas entre os tratamentos.

1080: Mandíbula curta (micrognatia).

PATAS DIANTEIRAS



PATAS TRASEIRAS

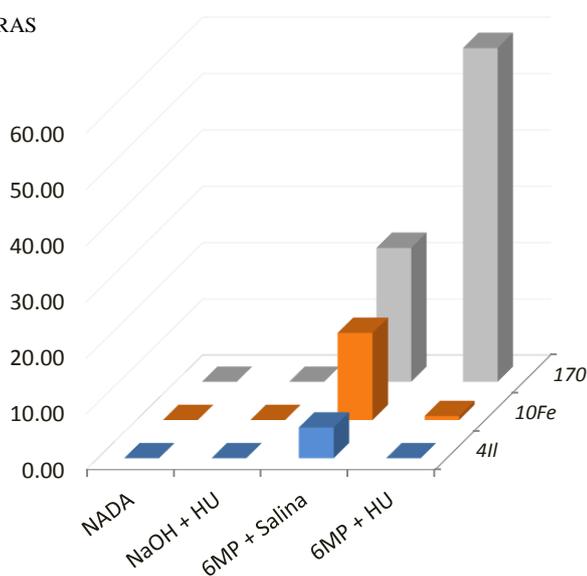


Fig. 4.2.3.11: Efeitos resultantes da exposição sequencial à 6-MP e HU sobre as incidências de malformações do esqueleto apendicular anterior e posterior fetal, utilizando um intervalo de 4 horas entre os tratamentos.

10UI: Ulna mais curta; **1Ra:** Rádio torto; **10Ra:** Rádio mais curto; **4Pd:** Forma irregular do processo deltoide; **4II:** Forma irregular do ílio; **10Fe:** Fêmur mais curto; **170:** Polidactilia.

5 – DISCUSSÃO

5.1 - PRIMEIRA FASE

5.1.1 - DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO DOSE-EFEITO DA HU E 6-MP ADMINISTRADAS A RATAS NO DG11 E OS EFEITOS EMBRIOTÓXICOS EM FETOS (DG21).

5.1.1.1 - DESENHO EXPERIMENTAL E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Nos estudos de embriotoxicidade, avaliamos as relações dose-resposta para anomalias esqueléticas, induzidas pela HU e 6-MP. Para tanto, empregamos um protocolo envolvendo uma única administração de várias doses dos antineoplásicos a ratas grávidas, no (DG11), e verificamos a incidência de uma infinidade de anomalias esqueléticas fetais no DG21, isto é, a termo. Isto significa dizer que, as intervenções, no caso os tratamentos com os antineoplásicos, foram pontuais, *i.e.*, feitas em uma determinada janela do desenvolvimento embrionário, quando os ossos ainda não estavam sendo formados, coincidente com o dia 10 pós-concepção (DG10 pós-concepção), e que quaisquer efeitos observados no DG21 foram decorrentes dessa única administração.

Em ratos, no final do DG9, ou durante o DG10 (pós-concepção), ocorre o início da somitogênese, quando são formados os primeiros pares de (0 a 4) somitos, mais ou menos ao mesmo tempo. Além disso, ocorre a formação do tubo intestinal e do celoma, o início da formação dos vasos sanguíneos e da circulação embrionária, bem como a involução da decídua antimesometrial. (HEBEL & STROMBERG, 1986; PAMPFER & DONNAY, 1999; ERB, 2006). Durante esta fase do desenvolvimento embrionário (DG10) do rato, o intervalo de 2 horas corresponde ao tempo médio aproximado de aparecimento de um somito (VICKERS, 1983).

Os somitos brotam em pares, a partir da extremidade anterior do mesoderma paraxial (pré-somítico), situado de cada lado da notocorda. Em intervalos regulares, um grupo de células aparentemente uniformes é organizado em blocos discretos, por mecanismos estreitamente regulados no espaço e no tempo. A diferenciação subsequente das células do interior dos segmentos somíticos leva à formação de vértebras, costelas, cartilagem, tendões,

musculatura esquelética e células endoteliais. A metade posterior de um somito, e a metade anterior do somito subsequente, originarão uma vértebra, com exceção dos primeiros quatro somitos, que coalescem, formando o osso occipital do crânio. (BROWN, 1994; AULEHLA & HERRMANN, 2004; BAKER *et al.*, 2006; CINQUIN, 2007).

No DG10 (pós-concepção), também são detectadas variações, entre os momentos de desenvolvimento dos embriões de uma mesma ninhada. Dentre as possíveis causas dessas variações, podemos citar: i) período do cruzamento; ii) tempo para que o espermatozoide atinge o ovo – momento da fecundação; iii) tempo real da implantação; iv) diferenças no acesso nutricional dos implantes, decorrentes de diferenças entre os sítios uterinos. Sendo assim, o número de somitos, apesar de ser um critério amplamente usado para estabelecer o momento do desenvolvimento embrionário, é variável entre os embriões de animais politoicos. (ERB, 2006).

O desenvolvimento, em dias pós-concepção (pós-coito), de ratos está ilustrado nos Anexos 55 e 56, que apresentam informações complementares. Consideramos pertinente anexar essas informações, a fim melhor situarmos o momento do tratamento com os fármacos antineoplásicos HU e/ou 6-MP (DG11, ou DG10 pós-concepção), dentro do contexto do desenvolvimento embrionário desses animais.

5.1.1.2 - TOXICIDADE MATERNA, PERDAS GESTACIONAIS, PESO DO FETO E DA PLACENTA, E ANORMALIDADES MORFOLÓGICAS DETECTADAS NO EXAME EXTERNO.

5.1.1.2.1 - HIDROXIUREIA (HU):

Os resultados do estudo de embriotoxicidade, utilizando uma única administração de HU, no DG11, indicaram que, até a maior dose testada (500 mg/kg), a HU não causou toxicidade materna, que seria indicada por uma redução significativa do ganho de peso materno, nas primeiras 48 horas após o tratamento, em relação ao observado no grupo controle (veículo da HU: salina). O tratamento com HU diminuiu os pesos fetais e placentários de maneira dose-dependente (indivíduo como unidade de análise), aumentou as taxas de reabsorção dos embriões, e, como era de se esperar, aumentou as incidências de malformações fetais visíveis externamente (compatíveis com as anomalias esqueléticas registradas posteriormente).

A relação entre peso placentário/peso fetal (indivíduo como unidade de análise) diminuiu de modo dose-dependente, indicando que a HU interferiu mais sobre o peso das placentas, do que sobre o peso dos fetos. Estes dados sugerem que a redução do peso placentário pode ter contribuído, em alguma extensão, para diminuição do peso dos embriões, e eventualmente, para os efeitos embriotóxicos registrados.

Os resultados do presente trabalho são consistentes com alguns relatos da literatura. BARR & BEAUDOIN, (1981), avaliaram os efeitos embriotóxicos e teratogênicos da HU, quando administrada a ratas grávidas por via *ip* a cada 6 horas, nas doses de 200 a 375 mg/kg, no DG9 a DG10,75. Esses autores verificaram que o tratamento com HU produziu uma depressão dos pesos dos fetos e das placentas, além de ter induzido uma ampla gama de malformações externas fetais a termo (DG21). CHAHOUD *et al.* (2002), verificaram que o tratamento de ratas grávidas bem nutridas com 500 mg/kg de HU no DG11, causou uma redução significativa dos pesos fetais (DG21), porém neste estudo, os pesos placentários não foram determinados.

De acordo como SPENCER *et al.*, 2000 (item 1.7.1.6), o tratamento com HU inibiu a decidualização das células do estroma endometrial, inibição esta que foi acompanhada por um aumento das taxas de reabsorção fetais, perdas pós-implantação, e pela diminuição dos pesos fetais. A circulação do sangue materno através das lacunas trofoblásticas, ocorre desde o início da decidualização das células do estroma endometrial. À medida que o concepto cresce, ele se torna cada vez mais dependente do fluxo de trocas fisiológicas com o sangue materno, que é fator determinante para o suprimento adequado do embrião com nutrientes e oxigênio. A redução da circulação útero-placentária pode causar hipóxia e também comprometer a nutrição fetal. Em animais experimentais, há uma correlação entre peso fetal e o tamanho da placenta, sugerindo que o peso fetal depende da capacidade funcional da placenta. (DESESSO, 1987).

5.1.1.2.2 – 6-MERCAPTOPURINA (6-MP):

Os resultados obtidos neste estudo indicaram que a 6-MP, administrada a ratas grávidas com 6-MP (DG11), até a maior dose testada (24 mg/kg), não causou diminuição do ganho de peso materno durante as primeiras 48 horas após o tratamento, em relação ao grupo controle que recebeu veículo (NaOH), indicando que este fármaco não foi tóxico para as mães. Estes resultados sugerem também, que a administração de 6-MP aparentemente não interferiu com o *status* nutricional materno (*i.e.*, com a ingestão de alimento, uma vez que não

houve redução do ganho de peso materno durante as primeiras 48 horas após o tratamento), o que é reconhecidamente um mecanismo associado à diminuição do desenvolvimento e crescimento embrionário (CARNEY & KIMMEL, 2007; FURUKAWA, *et al.*, 2011 a,b; TAKI *et al.*, 2012).

O tratamento da 6-MP provocou aumentos da taxa de reabsorção dos embriões e da proporção de fetos mortos, traduzido por perdas gestacionais, bem como a incidência de anomalias fetais visíveis ao exame externo dos fetos a termo (DG21). A análise dos esqueletos fetais confirmaram os achados externos.

Como pode ser observado, a administração de 6-MP provocou uma diminuição dose-dependente acentuada dos pesos fetais (indivíduo e ninhada como unidades de análise), dos pesos placentários (indivíduo como unidade de análise), bem como da razão peso da placenta/peso fetal (indivíduo como unidade de análise). A diminuição da razão peso da placenta/peso fetal é um indicativo de que o efeito da 6-MP sobre o peso das placentas foi maior do que o seu efeito sobre o peso fetal, indicando que o tecido placentário foi um alvo sujeito às ações adversas da 6-MP. A ação da 6-MP sobre a placenta, *i.e.*, a indução de placenta pequena (itens 1.4.4 e 1.7.2.5), provavelmente contribuiu para a diminuição drástica do peso (e tamanho) fetal, observada com as maiores doses. Entretanto não podemos inferir a extensão desta contribuição.

5.1.1.3 – CURVAS DOSE-EFEITO TERATOGÊNICO DA HU E 6-MP: ANORMALIDADES DO ESQUELETO FETAL

Os fármacos antineoplásicos HU e 6-MP são substâncias altamente teratogênicas em animais experimentais, e consideradas como teratógenos universais, uma vez que são capazes de induzir aparecimento de inúmeros tipos de anomalias, em vários momentos do desenvolvimento embrionário. Teratógenos específicos, por outro lado, produzem um só tipo de anomalia, em um ou em poucos momentos do desenvolvimento do embrião, *i.e.*, em período(s) definido(s) de maior susceptibilidade embrionária. (NEUBERT, *et al.*, 1987).

As relações dose-resposta são a melhor indicação para o estabelecimento da relação entre causa e efeito, *i.e.*, mostram quando, e o quanto, as alterações anatômicas são induzidas pela exposição aos agentes químicos. (CHAHOUUD & PAUMGARTTEN 2009).

As curvas dose-resposta (relações quantitativas) para cada alteração esquelética observada, tanto no esqueleto axial, quanto no esqueleto apendicular, de fetos provenientes de mães tratadas no DG11 com HU (doses de 0-500 mg/kg, *ip*) ou de 6-MP (doses de 0-24

mg/kg, *sc*) foram descritas nos itens 4.1.1.2 e 4.1.2.2. De acordo com os resultados obtidos nestes estudos, podemos constatar que a administração única de HU ou 6-MP no DG11, aumentou de maneira dose-dependente as incidências de uma grande variedade de anomalias ósseas classificadas consensualmente como malformações ou variações, bem como de anomalias cuja classificação é discutível. Os tratamentos com estes fármacos antineoplásicos também provocaram diminuições das incidências de alguns tipos de alterações ósseas (malformações e variações) cujas frequências espontâneas (observadas nos controles tratados com os veículos) foram altas.

A exposição de ratas grávidas a HU aumentou as incidências de várias anomalias (malformações e variações), na prole exposta, o que foi consistente com achados de outros estudos realizados na mesma espécie, que utilizaram um protocolo experimental similar (dose única de HU no DG11; cesariana e avaliação dos fetos a termo no DG21). Dentre essas anomalias, podemos mencionar as seguintes ocorrências: fusões envolvendo o osso zigomático e maxilar; osso timpânico menor; forma irregular do axis; fusão entre arcos vertebrais lombares; fusões entre corpos vertebrais lombares; ausência do processo deltoide; processo deltoide menor; centros de ossificação de corpos vertebrais lombares e torácicos divididos; centros de ossificação de corpos vertebrais lombares e torácicos em forma de *dumb-bell* (CHAHOU *et al.*, 2002; CHAHOU & PAUMGARTTEN, 2009).

Baseado na curva dose-efeito da 6-MP obtida neste estudo, evidenciamos que este antineoplásico provocou o aumento da ocorrência de fusão de dedos das patas traseiras, ou sindactilia, uma malformação típica. O aumento da incidência de sindactilia, e de outras anomalias nos membros anteriores e posteriores de ratos e camundongos tratados com 6-MP, foi relatado por alguns autores. Alguns estudos realizados em sistema de cultura de órgãos, demonstraram que, o tratamento *in vitro* de explantes de brotos de membros (obtidos de embriões de camundongo de 11 dias) com 6-MP, durante 7 dias, induzia o aparecimento de fusões nos explantes de membros posteriores. (NEUBERT *et al.*, 1974).

Como pode ser também constatado, o tratamento de fêmeas grávidas com 6-MP aumentou de maneira marcada e dose-dependente, a incidência de polidactilia nas patas traseiras dos fetos a termo. Este resultado é consistente com os achados de SCOTT *et al.*, 1980, que observaram que a administração intravenosa de 6-MPr a ratas grávidas no DG11, resultou numa alta percentagem de fetos apresentando esta malformação nas patas traseiras.

A maior dose de 6-MP (24 mg/kg) provocou também, um aumento significativo de tíbias ausentes nos fetos expostos. Esta malformação estrutural foi também relatada por CHAHOU & PAUMGARTTEN, 2009, que constataram um aumento da incidência desta anomalia em fetos provenientes de mães tratadas com 6-MPr, no DG11.

Os tratamentos com as maiores doses de HU e 6-MP provocaram aumentos relativamente pequenos, porém significativos, da ocorrência de fusão do osso zigomático com o processo jugular do maxilar na prole exposta. As incidências observadas com a administração de HU (500 mg/kg *ip*) e 6-MP (24 mg/kg *sc*) foram de 6,7% e 14,2%, enquanto as de seus respectivos controles foram de 0,0% e 4,3%. Estes resultados estão de acordo com os achados de CHAHOUE *et al.* (2002) e CHAHOUD & PAUMGARTTEN (2009), que constataram aumentos, no caso dose-dependentes, das incidências desta fusão, em fetos a termo (DG21) provenientes de ratas expostas a HU (250-550 mg/kg, *i.p*) ou a 6-MP ribosídeo (3-14 mg/kg, *sc*), no DG11. Este tipo de fusão normalmente ocorre durante o período pós-natal, e, de certo modo, os tratamentos com HU, 6-MP e 6-MPr anteciparam este processo, porém as consequências dessa antecipação para o animal não são conhecidas.

Alterações esqueléticas, como buraco nos ossos, ossos apresentando ossificação incompleta, ossos mais distantes, ossos não calcificados, pobremente calcificados, ou esponjosos, são ocorrências que indicam retardo na ossificação, que geralmente são transitórias e consideradas como variações. (KHERA 1981; SOLECKI *et al.*, 2001; CARNEY & KIMMEL, 2007; CHAHOUD & PAUMGARTTEN, 2009).

Nos estudos dose-efeito realizados, os tratamentos, tanto com HU, como com 6-MP, provocaram aumentos doses-dependentes da ocorrência de um grande número de variações, como ossos incompletos, ossos mais distantes, e de ossos apresentando alterações nos graus de ossificação.

O processo de ossificação de cada centro vertebral começa com dois centros de ossificação separados, que se fundem e adquirem forma de *dumb-bell*, e, em seguida, se torna ovalado (CARNEY & KIMMEL, 2007). De acordo com os resultados ora obtidos, verificamos que tanto a HU, como a 6-MP, causaram aumentos dose-dependentes da ocorrência de centros de ossificação de corpos vertebrais torácicos e lombares em forma de *dumb-bell* bem como aumentos das incidências de centros de ossificação de corpos vertebrais torácicos e lombares divididos. Estes resultados são consistentes com achados de CHAHOUD & PAUMGARTTEN (2009), obtidos em fetos de ratas tratadas com HU (de 0-550 mg/kg), e com 6-MPr (3-14 mg/kg, *sc*), no DG11. Estas alterações anatômicas são, na maioria das vezes, classificadas como variações, uma vez que são transitórias e reparadas no período pós-natal (SOLECKI *et al.*, 2001). Entretanto, esta classificação é discutível. Alguns autores como MARR e colaboradores (*apud* CHAHOUD & PAUMGARTTEN, 2009), por exemplo, argumentam que, no DG21, os “corpos vertebrais divididos” são cercados por cartilagem, o que tornaria ainda possível, o seu crescimento e mineralização – para esses autores, essa anomalia é uma variação. Entretanto, CHAHOUD & PAUMGARTTEN, 2009, consideram que tais anomalias, não

deveriam ser enxergadas como um mero retardo na ossificação, ponderando que, apesar de reparáveis, essas alterações anatômicas podem persistir por algum tempo durante a vida pós-natal, e, além disso, não sabe se estas alterações produzem algum tipo de distúrbio comportamental ou funcional no animal, enquanto persistem.

Todas as doses testadas de HU provocaram aumentos pequenos e uniformes da incidência de adição de 1 vértebra na coluna lombar. Essa alteração é considerada uma variação, apesar de seu caráter permanente. Não existem dados experimentais demonstrando que a presença de vértebras supernumerárias lombares seja incompatível com a vida de roedores (KHERA, 1981). De acordo com SOLECKI *et al.* (2001), uma vértebra adicional na região troncolombar, ou na região caudal de rato, normalmente não é considerada uma malformação.

Os NOELs (*no observed effect levels*) da HU e da 6-MP estabelecidos para malformações e variações esqueléticas não diferiram, indicando que a ocorrência de variações não antecipou a ocorrência de malformações, nas doses testadas. Assim, com base nas curvas dose-resposta obtidas, e portanto, nas faixas de doses testadas nestes estudos, os NOELs foram: NOEL (HU): < 250 mg/kg; NOEL (6-MP): < 6 mg/kg.

A diminuição do desenvolvimento embriofetal, *i.e.*, um retardo generalizado do crescimento, detectado pela diminuição do peso corporal fetal, e por atrasos no desenvolvimento e/ou maturação óssea observados, provocados pela exposição in útero dos embriões (DG11) a HU e 6-MP pode estar associada aos efeitos destes antineoplásicos sobre a placenta, o que comprometeria o fluxo de trocas placenta-feto, incluindo o transporte de nutrientes essenciais para o desenvolvimento fetal, trocas metabólicas, etc. (AMEMIYA *et al.*, 1986 e 1989; HAY, 1995 e 2006; CROSS *et al.*, 2006; FURUKAWA, *et al.*, 2011 a,b; TAKI *et al.*, 2012).

5.2 - SEGUNDA FASE

5.2.1 – REDISCUTINDO OS ESTUDOS UTILIZANDO ADMINISTRAÇÃO COMBINADA DE HIDROXIUREIA (HU) E 6-MERCAPTOPURINA (6-MP)

De acordo com o descrito no item 1.7.3, dois trabalhos publicados no mesmo ano (1999) descreveram a interação entre HU e 6-MP, porém, enfocando aspectos distintos. O primeiro trabalho, realizado por INNOCENTI *et al.*, (1999), estudou a interação farmacocinética após a administração concomitante e repetida de HU+6-MP a ratos, enquanto o segundo, comparou os efeitos da administração combinada com os efeitos do monotratoamento com HU ou 6-MPr em camundongos (PLATZEK & SCHWABE, 1999). Entretanto, os resultados obtidos nesses únicos estudos foram conflitantes, *i.e.*, podemos detectar inconsistências entre os resultados obtidos pelo segundo e a hipótese levantada pelo primeiro. Um dos objetivos do presente estudo, como já claramente mencionado, foi tentar esclarecer as inconsistências entre a hipótese proposta por INNOCENTI *et al.* (1999) e os dados obtidos por PLATZEK & SCHWABE (1999).

INNOCENTI *et al.* (1999), compararam os níveis de 6-MPN e de 6-TGN (metabólitos da 6-MP), presentes nos eritrócitos, fígado e rins de ratas adultas tratadas somente com 6-MP, com os níveis obtidos de ratas tratadas concomitantemente com HU + 6-MP. Esses autores verificaram que a administração combinada com HU, um inibidor da ribonucleotídeo redutase, aumentou a produção e a acumulação de 6-MPN e 6-TGN nos tecidos avaliados. Esses resultados são consistentes com a interpretação de que a HU modula a biotransformação *in vivo* da 6-MP, inibindo a sua conversão em metabólitos ativos, ou seja, em nucleotídeos de 6-tioguanina (6-TGNs), incluindo o trifosfato de 6-tiodesoxiguanosina (6-dTGTP). Este último metabólito parece ser o mais ativo em termos de citotoxicidade, e a sua incorporação ao DNA é considerada como o mecanismo primário pelo qual a 6-MP inibe a proliferação celular. (vide item 1.7.3 e Figura 1.6). INNOCENTI *et al.* (1999) demonstraram que a 6-MP é ativamente metabolizada em ratos e que a sua biotransformação *in vivo* pode ser modulada pela administração concomitante de HU, fármaco que inibe a enzima responsável pela interconversão intracelular de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos.

PLATZEK & SCHWABE (1999), por outro lado, estudaram os efeitos da administração combinada de uma dose não embriotóxica de HU e de uma dose teratogênica de 6-MPr, à fêmeas grávidas de camundongos (item 1.7.3). Além dos tratamentos combinados, o desenho

experimental deste experimento, incluiu um grupo controle não tratado, mas não incluiu grupos tratados com apenas HU ou 6-MPr (monotratamento). Isto significa dizer, que os autores compararam as respostas dos animais à administração combinada aos dois fármacos, com respostas ao monotratamento com HU ou 6-MP obtidas em experimentos diferentes (realizados em uma outra época), e que, a partir de tais comparações, chegaram à conclusões que poderiam ser resumidas da seguinte forma: a) a administração concomitante de HU e 6-MP não teria alterado o efeito teratogênico típico da 6-MPr, mas teria causado um pequeno aumento da frequência de anomalias do crânio típicas da HU; b) a administração de HU 2 horas da 6-MPr teria aumentado a incidência de anomalias de patas e do crânio, em comparação com o que ocorreria com o monotratamento com 6-MPr (patas) e HU (crânio); c) a administração de 6-MPr 2 horas antes da HU teria diminuído acentuadamente a frequência de defeitos nas patas, e aumentado ainda mais as anomalias de ossos do crânio.

PLATZEK & SCHWABE (1999) também investigaram a taxa de incorporação de 6-tioguanina ao DNA após a administração de ³⁵S-6-MPr, mas somente utilizando o esquema de tratamento em que HU atenuou os efeitos do 6-MPr, *i.e.*, quando 6-MPr foi administrado 2 horas antes de HU. Neste caso, o tratamento combinado com HU diminuiu significativamente a incorporação de ³⁵S-6-tioguanina ao DNA, em comparação com o monotratamento com 6-MP. Apesar da redução da incorporação de ³⁵S-6-tioguanina ser compatível com a hipótese de que a HU inibe a conversão do 6-MPr a metabólitos que são incorporados ao DNA, tal hipótese teria sido consideravelmente fortalecida, se os autores tivessem determinado a incorporação de ³⁵S-6-tioguanina nos demais esquemas de administração utilizados, ou seja, se os resultados tivessem realmente indicado que não ocorreu diminuição da incorporação da 6-tioguanina nas situações em que o tratamento combinado com HU não atenuou os efeitos do 6-MPr. Cabe observar que, neste estudo, a HU, quando administrada concomitantemente com 6-MPr, não atenuou os seus efeitos, ao contrário do que foi claramente demonstrado por INNOCENTI *et al.*, 1999 (ver descrição detalhada dos estudos no item 1.7.3).

5.2.3 – DISCUSSÃO DOS ACHADOS DOS ESTUDOS DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO CONCOMITANTE E SEQUENCIAL DE HU E 6-MP SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIOFETAL DE RATOS.

A avaliação do conjunto de resultados obtidos nos experimentos utilizando administrações concomitante e sequencial dos fármacos HU e 6-MP, descritos nos itens 4.2.1-4.2.2, e resumidos em forma gráfica (histogramas) no item 4.2.3, indica que:

Considerando a variável tempo (intervalo entre as administrações):

Os resultados relativos aos efeitos da administração concomitante, ou sequencial (com intervalo de 2 horas) da HU e 6MP são consistentes com as seguintes hipóteses:

i) HU antagoniza a conversão da 6-MP (pró-droga) em metabólito tóxico para o desenvolvimento embrionário (interação ao nível farmacocinético), ou seja, a HU bloqueia a RR, inibindo a formação do metabólito ativo final (teratogênico) da 6MP (trifosfato de 6-desoxitioguanosina), o que explica a atenuação de seus efeitos embriotóxicos.

ii) A HU é rapidamente eliminada do organismo materno e do embrião, em menos de 2 horas, e a 6MP, mais lentamente. Essa interpretação também se aplica aos casos em que as malformações foram atenuadas pela HU, quando esta foi administrada 4 horas depois da 6MP, porém não se aplica a todos os casos. Quando administrada 4 horas antes da 6MP, a HU aumentou a incidência de vários defeitos da coluna vertebral e das patas traseiras, e reverteu parcialmente um efeito na pata dianteira. Considerando que a HU seja de fato eliminada em até 2 horas, como sugerem alguns resultados descritos na literatura (ver item 1.7.1.5), o antagonismo ou a potenciação de qualquer efeito após a sua eliminação, não poderia ocorrer apenas ao nível farmacocinético.

De acordo com LIEBELT *et al*, 2007, a meia vida de eliminação da HU em ratas grávidas foi estimada em 11 a 30 minutos.

Considerando a variável sequência (ordem das administrações):

Os resultados relativos aos efeitos da administração concomitante, ou sequencial, com a 6-MP sendo administrada antes da HU, são consistentes com as seguintes hipóteses:

i) HU antagoniza a conversão da 6-MP (pró-droga) em metabólito tóxico para o desenvolvimento embrionário (interação ao nível farmacocinético), ou seja, a HU bloqueia a RR, inibindo a formação do metabólito ativo final (teratogênico) da 6-MP (trifosfato de 6-desoxitiguanosina), o que explica a atenuação de seus efeitos embriotóxicos.

ii) A HU é rapidamente eliminada do organismo materno e do embrião, em menos de 2 horas, e a 6MP, mais lentamente.

De acordo com as hipóteses supra-citadas, podemos interpretar nossos achados da seguinte maneira:

- Quando HU e 6-MP foram injetados concomitantemente, a HU inibiu a enzima ribonucleotídeo redutase, impedindo a geração do metabólito ativo trifosfato de 6-tiodesoxiguanosina (6-DTGTP) que, uma vez formado, seria incorporado ao DNA embrionário como falso análogo da guanina, provocando a inibição de sua síntese, e acarretando em embriotoxicidade/teratogenicidade. A inibição da bioativação da 6-MP pela HU explica a atenuação das incidências de uma variedade de anomalias, observada no grupo tratado com ambos os fármacos. (Figuras 4.2.3.3 e 4.2.3.4).
- Quando HU foi administrada 2 horas depois da 6-MP, que ainda estava sendo bioativada, bloqueou a enzima RR, impedindo, a partir deste momento, a geração de (6-DTGTP), levando à diminuição das frequências de algumas malformações. (Figura 4.2.3.5).
- Quando HU foi administrada 2 horas antes da 6-MP, no momento em que a segunda pró-droga foi injetada, a HU já teria sido totalmente eliminada do organismo, possibilitando a conversão de 6-TGDP em 6-dTGTP, catalisada pela enzima RR ativa. De fato, atenuações dos efeitos teratogênicos da 6-MP não foram constatadas. Entretanto, neste caso, o tratamento sequencial HU→6-MP, elevou a frequência de duas anomalias em relação à observada com o monotratoamento com 6-MP. (Figuras 4.2.3.6 e 4.2.3.7).
- Quando HU foi administrada 4 horas antes da 6-MP, no momento da administração do segundo fármaco, a HU já tinha sido eliminada, e, portanto, não atenuou suas ações

embriotóxicas, mas provocou um aumento da incidência de um conjunto de anomalias da coluna cervical, em comparação com grupo que recebeu apenas 6-MP. (Figuras 4.2.3.8 e 4.2.3.9).

- Quando HU foi administrada 4 horas depois da 6-MP, considerando que ainda haveria 6-MP disponível no compartimento embrionário, a partir do momento em que HU foi injetada, inibiu a enzima RR, interrompendo a conversão de 6TGDP em 6-dTGTP, e assim atenuando as ações embriotóxicas/teratogênicas da 6-MP, o que foi traduzido pelas reduções das frequências de várias malformações, com exceção da ocorrência de polidactilia, cuja frequência foi aumentada. (Figuras 4.2.3.10 e 4.2.3.11).

A hipótese da interação farmacocinética, consistente com o conjunto de resultados obtidos nesses experimentos, é capaz de explicar as situações em que houve inibição dos efeitos embriotóxicos e teratogênicos da 6-MP pela HU, mas não os aumentos observados nos dois esquemas de tratamento em que a 6-MP foi administrada, depois da HU já ter sido eliminada do organismo, ou em que a HU foi administrada 4 horas depois da 6-MP. Nestas situações, foram constatados aumentos das frequências de anomalias, que não poderiam ser explicados pela mera adição dos efeitos isolados de cada um dos fármacos antineoplásicos.

Os aumentos das frequências das malformações observadas com esses três esquemas de tratamento indicaram que, além da interação toxicocinética (inibição da ativação metabólica) ocorreu também uma interação ao nível toxicodinâmico. Entretanto, os mecanismos através dos quais essas interações ocorrem são ainda desconhecidos.

A 5-bromodesoxiuridina (BrdU) é um análogo da timidina, rapidamente incorporado ao DNA de células proliferativas, sendo também um teratígeno conhecido. KWASSIGROCH & SKALKOS (1985), avaliaram os efeitos da administração concomitante e sequencial da HU e BrdU (500 mg/kg) sobre os fetos de fêmeas de camundongo grávidas, tratadas no DG11 com uma única dose de cada substância (HU: 250 mg/kg; BrdU: 500 mg/kg). Os esquemas de tratamento empregados neste estudo foram: administração de HU e BrdU (monotratamento); administração concomitante; administração de HU 3 horas antes de BrdU; Administração de HU 3 horas depois de BrdU. A ocorrência de “fenda palatina” (FP) foi avaliada nos fetos a termo. Os resultados revelaram que com HU e BrdU administrados isoladamente resultaram nas frequências de FP de 2,4% e 22,9%, respectivamente. Quando HU e BrdU foram administrados concomitantemente, houve uma diminuição da frequência de FPs para 3,6%; quando HU foi administrada 3 horas antes de BrdU, a frequência de FP aumentou para 33%.

Os autores atribuíram a diminuição da frequência de FP observada no tratamento concomitante, à inibição da síntese de DNA pela HU, levando à diminuição da incorporação de BrdU ao DNA, e sugeriram que a elevação da frequência de FP, constatada quando HU foi administrada 3 horas antes de BrdU, seria devida à sincronização da HU sobre as células em divisão. (KWASSIGROCH & SKALKOS, 1985).

De acordo com a hipótese proposta por KWASSIGROCH & SKALKOS (1985), a sincronização da divisão celular na fase S (fase de síntese de DNA) poderia favorecer o aumento da taxa de incorporação de bases análogas, como BrdU ao DNA do embrião, acarretando em aumentos das incidências de malformações. Como o metabólito ativo da 6-MP é um falso análogo da guanina, a hipótese formulada por KWASSIGROCH & SKALKOS (1985), poderia também se aplicar aos aumentos das frequências de anomalias, registrados quando HU foi administrada antes da 6-MP.

Essas interações, entretanto, podem ser bem mais complexas, considerando que a inibição da enzima RR não constitui o único mecanismo embriotóxico da HU. Como relatado no item 1.7.1.4, a HU, por exemplo, induz *stress* oxidativo, através de uma rápida produção de peróxido de hidrogênio e de radicais hidroxila (DESESSO, 1981; DESESSO & GOERINGER, 1990 a e b), levando ao aumento da peroxidação de lipídeos, e à formação de 4-hidroxi-2-nonenal, que é acumulado em regiões do embrião suscetíveis ao desenvolvimento de malformações (SCHISSER & HALES, 2013), o que poderia potencializar a ação teratogênica de outras substâncias.

As possibilidades e os diversos níveis em que as interações entre efeitos de antineoplásicos poderiam ocorrer são inúmeros, e pouco se conhece a esse respeito, sobretudo quando ocorrem em sistemas altamente complexos, como por exemplo, em um embrião em desenvolvimento.

Cabe também considerar aqui, as possíveis interações que poderiam também ocorrer entre esses dois fármacos antineoplásicos, ao nível placentário. Como vimos anteriormente, a placenta foi um alvo altamente sensível para as ações adversas, tanto da HU, como da 6-MP. Ambas as drogas produzem lesões na placenta, em estruturas distintas, e através de mecanismos diferentes. A HU age sobre a formação da decídua (tecido materna), perturbando a atividade proliferativa das células endometriais, enquanto 6-MP age sobre a zona labiríntica, através da indução de apoptose das células trofoectodérmicas, levando à formação de placenta pequena. (FURUKAWA, *et al.*, 2011 b; TAKI *et al.*, 2012).

Esses são apenas alguns exemplos do que poderia ocorrer, quando da administração de HU e 6-MP. Entretanto, são apenas possibilidades de interação, que mereceriam ser futuramente investigadas.

6- CONCLUSÃO

Na primeira fase deste trabalho analisamos as relações entre as doses dos fármacos antineoplásicos hidroxiuréia (HU) e 6-mercaptopurina (6-MP), administradas durante o período crítico da embriogênese/organogênese, e as manifestações de embriotoxicidade observadas no feto a termo.

Neste estudo, HU e 6-MP provocaram perdas gestacionais (reabsorções ou morte embrionária), diminuições dos pesos dos fetos e das placentas, diminuições da razão peso fetal/peso placentário, bem como o aparecimento de anomalias externas. As diminuições da razão peso fetal/peso placentário sugerem que a placenta é o alvo mais sensível para os efeitos adversos dos fármacos antineoplásicos estudados.

Os dois antineoplásicos avaliados induziram aumentos dose-relacionados da ocorrência de variações e de malformações esqueléticas. Dentro da faixa de doses testadas, a ocorrência de variações não antecipou a ocorrência de malformações. As exposições a HU e 6-MP resultaram também, em reduções das incidências de alguns tipos de anomalias, geralmente quando as frequências espontâneas foram relativamente altas. Entretanto, os mecanismos que levam à essas reduções não estão estabelecidos.

Embora se saiba há muito tempo que a HU e a 6-MP são teratogênicas para roedores, poucos estudos examinaram em detalhe as relações dose-efeito. Os resultados ora obtidos forneceram um grande volume de dados, que irão ampliar a base de dados já existentes para estes antineoplásicos.

Na segunda fase do trabalho investigamos se havia interação entre os efeitos da hidroxiuréia (HU) e da 6-mercaptopurina (6-MP) sobre o embrião, após tratamentos sequenciais ou concomitantes, e testamos a hipótese de que a HU, inibindo a bio-ativação da 6-MP a 6-tioguanina (nucleotídeo ativo) poderia modular o efeito citotóxico e antineoplásico da 6-MP, proposta por INNOCENTI *et al.*, 1999.

Os resultados relativos aos efeitos da administração concomitante, ou sequencial, com a 6-MP sendo administrada antes da HU, *i.e.*, diminuição das frequências de anomalias induzidas pela 6-MP, foram consistentes com a hipótese proposta por INNOCENTI *et al.*, 1999, de que a HU antagoniza a conversão da 6-MP (pró-droga) em metabólito tóxico para o desenvolvimento embrionário (interação ao nível farmacocinético), ou seja, HU bloqueia a RR, inibindo a formação do metabólito ativo final (teratogênico) da 6-MP (trifosfato de 6-desoxitioguanosina), o que explica a atenuação de seus efeitos embriotóxicos. Porém, os aumentos das incidências de malformações induzidas pela 6-MP, observados em alguns

esquemas de tratamento sequencial, não podem ser explicados ao nível farmacocinético (ativação metabólica), e sugerem a ocorrência de um tipo de interação farmacodinâmica. Entretanto, os mecanismos envolvidos neste tipo de interação são obscuros.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicaram que HU e 6-MP interagem tanto ao nível toxicocinético, quanto toxicodinâmico.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, R.; LAMBOOY, L.; STET, E., *et al.* **Thiopurine induced disturbance of DNA methylation in human malignant cells.** *Adv. Enzyme Regul.*, **35**: 251-63, 1995.

ACHACHE, H.; REVEL, A. **Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation.** *Human Reproduction Update*, **12**(6): 731-746, 2006.

AIN, R.; CANHAM, N.; SOARES, M.J. **Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation.** *Developmental Biology*, **260**: 176-190, 2003.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular Biology of The Cell*. 4.ed. New York: Garland Science Ed., 2002.p

ALCOLEA, M.P.; COLOM, B. AMENGUAL-CLADERA, E.; LLADÓ, I.; GIANOTTI, M.; GARCIA-PALMER, F.J. **Rat visceral yolk sac (VYS) and placenta mitochondrial features during placentation period.** *Mitochondrion*, **8**: 389-395, 2008.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B., *et al.* **Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução.** *Quim. Nova*, **28**(1): 118-129, 2005.

AMBROSO, J.; HARRIS, C. **Assessment of Histiotrophic Nutrition Using Fluorescent Probes.** *Developmental Toxicology*, **889**: 407-423, 2012.

AMEMIYA, K.; KEEN, C.L.; HURLEY, L.S. **6-mercaptapurine-induced alterations in mineral metabolism and teratogenesis in the rat.** *Teratology*, **34**(3): 321-334, 1986.

AMEMIYA, K.; HURLEY, L.S.; KEEN, C.L. **Effect of 6-mercaptapurine on ⁶⁵Zn distribution in the pregnant rat.** *Experimental Teratology*, **39**(4): 387-393, 1989.

APLIN, J.d.; KIMBER, S.J. **Trophoblast-uterine interactions at implantation.** *Reproductive Biology and Endocrinology, RB&E*. 2:48. doi:10.1186/1477-7827, 2004.

ARKEL, R.M.; TAM, P.L. **Initiating head development mouse embryos: integrating signaling and transcriptional activity.** *Open Biology* **2**: 120030. Royal Society Publishing, 2012.

ARMANT, D.R. **Blastocysts don't go it alone. Extrinsic signals fine-tune the intrinsic developmental program of trophoblast cells.** *Developmental Biology*, **280**: 260-280, 2005.

AULEHLA, A.; HERRMANN, B.G. **Segmentation in vertebrates: clock and gradient finally joined.** *Genes & Development*, **18**: 2060-2067, 2004.

BAKER, R.E.; SCHNELL, S.; MAINI, P.K. **A clock and wavefront mechanism for somit formation.** *Developmental biology*, **293**: 116-126, 2006

BARR, M.JR.; BEAUDOIN, A.R. **An Exploration of the Role of Hydroxyurea Injection Time in Fetal Growth and Teratogenesis in Rats.** *Teratology*,**24**: 163-167, 1981.

BLÁSTULA. Disponível em: <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Blástula>>. Acesso em: 09/03/2016.

DEBEAUMAIS, T.A.; FAKHOURY, M.; MEDARD, Y., *et al.* **Determinants of mercaptopurine toxicity in paediatric acute leukemia maintenance therapy.** *British Journal of Clinical Pharmacology*, **71**(4): 575-584, 2010.

BLOOR, D.J.; METCALFE, A.D.; RUTHERFORD, A.; BRISON, D.R.; KIMBER, S.J. **Expression of cell adhesion molecules during human preimplantation embryo development.** *Molecular Human Reproduction*, **8**(3):237-245, 2002.

BROWN, N.A. Normal Development. Mechanisms of Early Embryogenesis. In: KIMMEL, C.A.; BUELKE-SAM, J. (Eds.). *Developmental Toxicology*. New York: Raves Press, Ltd., 1994.

CARNEY, E.W.; KIMMEL, C.A. **Interpretation of skeletal variations for human risk assessment: delayed ossification and wavy ribs.** *Birth Defects Res. Part B*, **80**: 473-496, 2007.

CEGIELA, U.; KACZMARCZYK-SEDIK, I.; NOWINSKA, B. **Effects of 6-mercaptopurine (6-MP) on histomorphometric parameters of the rat bones.** *Pharmacol Rep.*, **57**(4): 515-522, 2005.

CHAHOUD, I.; KURIYAMA, S.N.; PAUMGARTTEN, F.J.R. **Maternal protein-and-energy restriction reduces the developmental toxicity of cyclophosphamide and hydroxyurea in rats.** *Toxicology*, **179**: 137-149, 2002.

CHAHOUD, I.; PAUMGARTTEN, F.J.R. **Dose-response relationships of rat fetal skeleton variations: Relevance for risk assessment.** *Environmental Research*, **109**: 922-929, 2009.

CHAUBE, S.; MURPHY, M.L. **Protective effects of deoxycytidylic acid (CdMP) on hydroxyurea-induced malformations in rats.** *Teratology*, **7**: 79-88, 1973.

CINQUIN, O. **Understanding the somitogenesis clock: What's missing?** *Mechanisms of Development*, **124**: 501-507, 2007.

CISTERNA, A.E.C. **Análise da Ação do Embrião e dos Hormônios Ovarianos na Regulação da Matriz Extracelular de Células Deciduais: Estudo *in vivo* e *in vitro*.** 2013. 135 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2013.

CORRÊA, I.P. **Expressão gênica de fatores angiogênicos na placenta de ratas submetidas ao estresse.** 2009. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Área de Obstetrícia e Ginecologia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.

CROSS, J.C. **Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis.** *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **11**(2): 105-113, 2000.

CROSS, J.C.; MICKELSON, L. **Nutritional influences on implantation and placental development.** *Nutr Rev.*, **64**: 72–91 2006.

DAWSON, A.B. **A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with Alizarin Red S.** *Stain Technology*, **1**:123-124, 1926.

DEB, K.; SIVAGURU, M.; YONG, H.Y.; ROBERTS, R.M. **Cdx2 Gene Expression and trophoectoderm Lineage Specification in Mouse Embryos.** *Science*, **311**(5763): 992-996, 2006.

DERELANKO, M.J.; AULETA, C.S. **Handbook of Toxicology. Third Edition.** CRC Press, Taylor & Francis Group, NY, 2014. Pp 465-466.

DESESSO, J.M. **Amelioration of teratogenesis. I. Modification of hydroxyurea-induced teratogenesis by the antioxidant propyl gallate.** *Teratology*, **24**(1): 19-35, 1981.

DESESSO, J.M. **Maternal Factors in Developmental Toxicity.** *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, **7**: 225-240, 1987.

DESESSO, J.M.; GOERINGER, G.C. **The nature of the embryo-protective interaction of propyl gallate with hydroxyurea.** *Reproductive Toxicology*, **4**(2):145-52, 1990 (a).

DESESSO, J.M.; GOERINGER, G.C. **Ethoxyquin and nordihydroguaiaretic acid reduce hydroxyurea developmental toxicity.** *Reproductive Toxicology*, **4**(4): 267-75, 1990 (b).

DEY, S.K.; LIM, H.; DAS, S.K.; REESE, J.; PARIA, B.C.; DAOKOKU, T. **Molecular Cues to Implantation.** *Endocrine Reviews*, **25**(3): 341-373, 2004.

DING, L.; ZHANG, F-B; LIU, H. *et al.* **Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase activity is related to 6-thioguanine nucleotide concentrations and thiopurine-induced leukopenia in the treatment of inflammatory bowel disease.** *Inflammatory Bowel Diseases*, **18**(1): 63-73, 2012.

DOI, K. **Mechanisms of neurotoxicity induced in the developing brain of mice and rats by DNA-damaging chemicals.** *The Journal of Toxicological Sciences*, **36**(6): 695-712, 2011.

ERB, C. Embriology and Teratology. In: SUCKOW, M.A; WISBROTH, S.H.; FRANKLIN, C.L. (Eds.). *The Laboratory Rat*. California: Elsevier Academic Press, 2006, pp: 821-835

FAKHOURY, M.; DE BEAUMAIS, T.; MÉDARD, Y.; JACQZ-AIGRAIN, E. **Therapeutic drug monitoring of 6-thioguanine nucleotides in pediatric acute lymphoblastic leukaemia: interest and limits.** *Thérapie*, **65**(3): 187-193, 2010.

FAUNES, F.; HAYWARD, P.; DESCALZO, S.M.; CHATTERJEE, S.S., *et al.* **A membrane-associated β -catenine/Oct4 complex correlates with ground-state pluripotency in mouse embryonic stem cells.** *Development*, **140**(6): 1171-1183, 2013.

FERREIRA, M.J. **Expressão de IFN-gama e interleucina (IL)-10 e seus receptores pelas células trofoblásticas de camundongos.** Tese (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2007.

FONSECA, B.M.; CORREIA-DA-SILVA, G; TEIXEIRA, N. **The rat as animal model for fetoplacental development: a reappraisal of the post-implantation period.** *Reproductive Biology*, **12**(2): 97-118, 2012.

FURUKAWA, S.; USUDA, K.; ABE, M.,*et al.* **Effect of 6-mercaptopurine on rat placenta.** *E. J. Vet. Med. Sci.*, **70**(6): 551-556, 2008.

FURUKAWA, S.; HAYASHI, S.; USUDA, K., *et al.* **The relationship between fetal growth restriction and small placenta in 6-mercaptopurine exposed rat.** *Exp.Toxicol.Pathol.*, **63**(1-2): 89-95, 2011. (a)

FURUKAWA. S; HAYASHI, S.; USUDA, K; ABE, M; HAGIO, S.; OGAWA, I. **Toxicological Pathology in the Rat Placenta.** *J. Toxicol. Pathol.*, **24**: 95-111, 2011. (b)

GENBACEV, O.D.; PRAKOBPHOL, A.; FOULK, R.A.; KRTOLICA, A.R., *et al.* **Trophoblast L-Selectin-Mediated Adhesion at the Maternal-Fetal Interface.** *Science*, **299**: 405-408, 2003.

GLASSER, S.R.; APLIN, J.D.; GIODICE, L.C.; TABIBZADEH, S. **The Endometrium.** N.Y.: Taylor & Francis Group, 2004. p. 428-431. (International Standard Book Number 13:978-0-203-21903-4

GRIVICICH, I; REGNER, A.; ROCHA, A.B. **Morte Celular por Apoptose.** *Revista Brasileira de Cancerologia*, **53**(3): 335-343, 2007.

GUO, G.; HUSS, M.; TONG, G.Q.; WANG, C., *et al.* **Resolution of Cell Fate Decisions Revealed by Single-Cell Gene Expression Analysis from Zygote to Blastocyst.** *Developmental Cell*, **18**: 675-685, 2010.

GU, Y.; JOW, G.M.; MOULTON, B.C.; LEE, C, *et al.* **Apoptosis in Decidual Tissue regression and Reorganization.** *Endocrinology*, **135**(3): 1272-1279, 1994.

HALSEY, C.; ROBERTS, I.A.G. **The role of hydroxyurea in sickle cell disease.** *British Journal of Haematology*, **120**: 177–186, 2003.

HAMATANI, T.; CARTER, M.G.; SHAROV, A.A.; KO, S.H. **Dynamics of Global Gene Expression Changes during Mouse Preimplantation Development.** *Developmental Cell*, **6**: 117-131, 2004.

HANSEN, D.K.; GRAFTON, T.F.; CROSS, D.R.; JAMES, S.J. **Partial Attenuation of Hydroxyurea-induced Embryotoxicity by Deoxyribonucleotides in Mouse and Rat Embryos Treated In Vitro.** *Toxicology in Vitro*, **9**(1): 11-19, 1995.

HAY, W.W. **Metabolic interrelationships of placenta and fetus.** *Placenta*. **16**: 19–30, 1995.

HAY, W.W. **Placental-fetal glucose exchange and fetal glucose metabolism.** *Trans Am Clin Climatol Assoc.* **117**: 321–340, 2006.

HERKEN, R.; MERKER, H.J.; KROWKE, R. **Investigation of the effect of hydroxyurea on the cell cycle and development of necrosis in the embryonic CNS of mice.** *Teratology*, **18**(1): 103-117, 1978.

HICKMAN, D.; WANG, J.P.; WANG, Y.; UNADKAT, J.D. **Evaluation of the selectivity of In vitro probes and suitability of organic solvents for the measurement of human cytochrome P450 monooxygenase activities.** *Drug Metab. Dispos.*, **26**: 207-215, 1998.

HIRANO, T.; ISHIHARA, K.; HIBI, M. **Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors.** *Oncogene*, **19**(21): 2548-56, 2000.

IMURAN (AZATHIOPRINE). **Description and Clinical Pharmacology.** Disponível em: <http://www.druglib.com/druginfo/imuran/description_pharmacology/>. Acesso em: 28/10/2015.

INNOCENTI, F.; DANESI, R.; BOCCI, G., *et al.* **Metabolism of 6-mercaptopurine in the erythrocytes, liver, and kidney of rats during multiple-dose regimens.** *Cancer Chemother.Pharmacol.*, **43**: 133-140, 1999.

JHA, R.K.; TITUS, S.; SAXENA, D.; KUMAR. P.G.; LALORAYA, M. **Profiling of E-cadherin, β -catenin and Ca^{2+} in embryo-uterine interactions at implantation.** *Federation of European Biochemical Societies*, **580**: 5653-5660, 2006.

JOSWIG, A.; GABRIEL, H.D.; KIBSCHULL, M.; WINTERHAGER, E. **Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways.** *Reproductive Biology*, **1**:44: 1-9, 2003.

KANEMITSU H.; YAMAUCHI H.; KOMATSU M., *et al.* **Time-course changes in neural cell apoptosis in the fetal rat brain from dams treated with 6-mercaptopurine (6-MP).** *Histol. Histopathol.*, **24**(3): 317-324, 2009. (a)

KANEMITSU H.; YAMAUCHI H.; KOMATSU M., *et al.* **6-Mercaptopurine (6-MP) induces cell cycle arrest and apoptosis of neural progenitor cells in the developing fetal rat brain.** *Neurotoxicol.Teratol.*, **31**(2): 104-109, 2009. (b)

KANEMITSU H.; YAMAUCHI H.; KOMATSU M., *et al.* **6-Mercaptopurine (6-MP) induces p53-mediated apoptosis of neural progenitor cells in the developing fetal rodent brain.** *Neurotoxicol.Teratol.*, **31**(4): 198-202, 2009. (c)

KESSLER, C.A.; MOGHADAM, K.K.; SCHROEDER, J.K., *et al.* **Cannabinoid receptor I activation markedly inhibits human decidualization.** *Molecular and Cellular Endocrinology*, **229**: 65-74, 2005.

KHERA, K.S. **Common fetal aberrations and their teratologic significance: a review.** *Fundam. Appl. Toxicol.*, **1**: 13-18.

KIMMEL, C.A.; BUELKE-SAM, J. **Developmental Toxicology. Target Organ Toxicology Series.** CRC Press, New York, 1994. **PP: 245-270.**

KO, M.S.H.; KITCHEN, J.R.; WANG, X.; THREAT, T.A., *et al.* **Large-scale cDNA analysis reveals phased gene expression patterns during preimplantation mouse development.** *Development*, **127**: 1737-1749, 2000.

KOOT, Y.E.M.; TEKLENBURG, G.; SALKER, M.S.; BROSENS, J.J; MACKLON, N.S. **Molecular aspects of implantation failure.** *Biochimica et Biophysica Acta*, **1822**: 1943-1950, 2012.

KURODA, T.; TADA, M.; KUBOTA, H.; KIMURA, H., *et al.* **Octamer and Sox Elements Are Required for Transcriptional cis Regulation of Nanog Gene Expression.** *Molecular and Cellular Biology*, **25**(6): 2475-2485, 2005.

KWASIGROCH, T.E.; SKALKO, R.G. **The teratogenic interaction of hydroxyurea and 5-bromodeoxyuridine examined with the aid of lim culture and image analysis.** *Fundamental and Applied Toxicology*, **5**(6), Part 1: 1161-1173, 1985.

LEWIS, D.F; IOANNIDES, C.; PARKE, D.V. **Cytochromes P450 and species differences in xenobiotic metabolism and activation of carcinogen.** *Environmental Health Perspectives*, **106**: 633-641, 1998.

LI, W.; DING, S. **Small molecules that modulates embryonic stem cell fate and somatic cell reprogramming.** *Trends in Pharmacological Sciences*, **31**(1): 36-45, 2010.

LIEBELT, E.L.; BALK, S.J.; FABER, W., *et al.* **NTP-CERHR - Expert Panel Report on the Reproductive and Developmental Toxicity of Hydroxyurea: Birth Defects Research (Part B)**, **80**: 259-366, 2007.

LIU, W.M.; DUAN, E.K.; CAO, Y.J. **Effects of anandamide on embryo implantation in the mouse.** *Life Sciences*, **71**: 1623-1632, 2002.

MARIKAWA, Y.; ALARCÓN, V.B. **Establishment of Trophoectoderm and Inner Cell Mass Lineages in the Mouse Embryo.** *Molecular Reproduction & Development*, **76**: 1019-1032, 2009.

MEHROTRA, P.K. **Ultrastructure of mouse ectoplacental cone cells.** *Biol. Struc. Morphog.*, **1**(2): 63-68, 1988.

MILLER, S.A.; RUNNER, M.N. **Tissue specificity for incorporation of [³H]thymidine by the 10- to 12-somite mouse embryo: alteration by acute exposure to hydroxyurea.** *J. Embryol. exp. Morph.*, **44**: 181-189, 1978.

MIYSUI, K.; TOKUZAWA, Y.; ITOH, H.; SEGAWA, K.; MURAKAMI, M.; TAKAHASHI, K.; MARUYAMA, M.; MAEDA, M.; YAMANAKA, S. **The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells.** *Cell*, **113**: 631-642, 2003.

MONTANARI, T. **Embriologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas.** Ed. do autor, Porto Alegre, 2013. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/livrodeembrio>>. Acesso em: 09/06/2015.

MURPHY, C.R. **Commonality Within Diversity: The plasma membrane Transformation of Uterine Epithelial Cells During Early Placentation.** *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **15**(4): 179-183, 1998.

NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M.; DE MELO, T. R. F. **Planejamento, Síntese e Avaliação Farmacológica de Novos Compostos Híbridos para o Tratamento dos Sintomas da Anemia Falciforme.** *Revista Virtual de Química*, **3**(6):447-451, 2012.

NAVARRO, V.P.; NELSON-FILHO, P.; SILVA, L.A.B. **A participação das metaloproteinases da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal.** *Revista de Odontologia da UNESP*, **35**(4): 233-238, 2006.

NELSON, J.A.; CARPENTER, J.W.; ROSE, L.M.; ADAMSON, D.J. **Mechanisms of Action of 6-Thioguanine, 6-Mercaptopurine, and 8-Azaguanine.** *Cancer Research*, **35**: 2872-2878, 1975.

NEUBERT, D.; TAPKEN, S.; MERKER, H.J. **Induction of Skeletal Malformation in Organ Cultures of Mammalian Embryonic Tissues.** *Naunnyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **298**: 93-105, 1977.

NEUBERT, D.; CHAHOUD, I.; PLATZEK, T. **Principles and problems in assessing prenatal toxicity.** *Arch. Toxicol.*, **60**: 238-245, 1987.

OGLE, T.F.; DAI, D.; GEORGE, P.; MAHESH, V.B. **Stromal Cell Progesterone and Estrogen Receptors during Proliferation and Regression of the Decidua Basalis in the Pregnant Rat.** *Biology of Reproduction*, **57**: 495-506, 1997.

PAMPFER, S.; DONNAY, I. **Apoptosis at the time of embryo implantation in mouse and rat.** *Cell Death and Differentiation*, **6**: 533-545, 1999.

PAMPFER, S. **Apoptosis in Rodent Peri-implantation Embryos: Differential Susceptibility of Inner Cell Mass and Trophoectoderm Cell Lineages – A Review.** *Placenta*, **21**, Supplement A, Trophoblast Research, **14**, S3-S10, 2000.

PARIA, B.C.; ELENUS, K.; KLAGSBRUN, M.; DEY, S.K. **Heparin-binding EGF-like growth factor interacts with mouse blastocysts independently of ErbB1: a possible role for heparan sulfate proteoglycans and ErbB4 in blastocyst implantation.** *Development*, **126**: 1997-2005, 1999.

PARISOTO, E.B. **Avaliação da Atividade Antitumoral do Extrato Bruto e Supercrítico de *Cordiaverbenacea*.** 2011. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

PARR, E.L.; TUNG, H.N.; PARR, M.B. **Apoptosis as the Mode of Uterine Epithelial Cell Death during Embryo Implantation in Mice and Rat.** *Biology of Reproduction*, **36**: 211-225, 1987.

PENNINGTON, A.M.; BRONK, J.R. **The absorption of 6-mercaptopurine from 6-mercaptopurine riboside in rat small intestine: effect of phosphate.** *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **36**: 136-142, 1995.

PETIT, E.; LANGOUET, S.; AKHADAR, H., *et al.* **Differential toxic effects of azathioprine, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine on human hepatocytes.** *Toxicology in Vitro*, **22**: 632-642, 2008.

PLATZEK, T.; BOCHERT, G.; NEUBERT, D. **DNA modification induced by 6-mercaptopurine riboside in murine embryos.** *Chemico-Biological Interactions*, **93(1)**: 59-71, 1994.

PLATZEK, T.; BOCHERT, G. **Dose-response relationship of teratogenicity and prenatal-toxic risk estimation of 6-mercaptopurine riboside in mice.** *Teratogen Carcinogen Mutagen*, **16**:169-181, 1996.

PLATZEK, T.; SCHWABE, R. **Combined Prenatal Toxicity of 6-Mercaptopurine Riboside and Hydroxyurea in Mice.** *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, **19**: 223-232, 1999.

POLIFKA, J.E.; FRIEDMAN, J.M. **Teratogen Update: Azathioprine and 6-Mercaptopurine.** *Teratology*, **65**: 240–261, 2002.

POURQUIÉ, O. **Vertebrate Somitogenesis.** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **17**: 311-350, 2001.

PREFONTAINE, E.; MACDONALD, J.K.; SUTHERLAND, L.R. **Azathioprine or 6-mercaptopurine for induction of remission in Crohn's disease.** *Cochrane database Syst. Rev.*, **16(6)**: CD000545.

PRZYBYSZEWSKI, W.M.; MALEC, J. **Protection against hydroxyurea-induced cytotoxic effects in L5178Y cells by free radical scavengers.** *Cancer Letters*, **17**: 223-228, 1982.

PRZYBYSZEWSKI, W.M.; KOPEC-SZLEZAK, J.; MALEC, J. **Protection of L5178Y cells by vitamin E against acute hydroxyurea toxicity does not change the efficiency of ribonucleotidoreductase-mediated hydroxyurea-induced cytotoxic events.** *Cancer Letters*, **34**: 337-344, 1987.

SKOOG, L.; NORDENSKJÖLD, B. **Effects of Hydroxyurea and 1-β-D-Arabinofuranosyl-cytosine on Deoxyribonucleotide Pools in Mouse Embryo Cells.** *European Journal of Biochemistry*, **19**(1): 81-89, 1971.

SOARES, M.J.; CHAKRABORTY, D.; KARIM-RUMI, M.A.; KONNO, T. **Rat Placentation: An Experimental Model For Investigating The Hemochorial Maternal-Fetal Interface.** *Placenta*, **33**(4): 233-243, 2012.

SOLECKI, R.; BÜRGIN, H.; BUSCHMANN, J.; CLARK, R.; DUVERGER, M.; FIALKOWSKI, O., *et al.* **Harmonisation of rat fetal skeletal terminology and classification. report of the third workshop on the terminology in developmental toxicology : Berlin, 14–16 September 2000.** *Reproductive Toxicology*, **15**: 713-721, 2001.

SONG, H.; HAN, K.; LIM, H. **Progesterone supplementation extends uterine receptivity for blastocyst implantation in mice.** *Reproduction*, **133**: 487-493, 2007.

SPENCER, F.; CHI, L.; ZHU, M.X. **Hydroxyurea inhibition of cellular and developmental activities in the decidualized and pregnant uteri of rats.** *J Appl Toxicol.* **20**: 407–412, 2000.

STEMIER, M.P.; HECHT, A.; KINZEL, B.; KEMLER, R. **Analysis of Regulatory Elements of E-Cadherin With Reporter Gene Constructs in Transgenic Mouse Embryos.** *Developmental Dynamics*, **227**: 238-245, 2003.

TAM, P.P.L.; BEHRINGER, R.R. **Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan.** *Mechanisms of Development*, **68**: 3-25, 1997.

TAUBENECK, M.W.; DASTON, G.P.; ROGERS, J. M.; KEEN, C. L. **Altered maternal zinc metabolism following exposure to diverse developmental toxicants.** *Reproductive Toxicology*, **8**(1): 25-40, 1994.

TENÓRIO, R.P; GÓES, A.J.S.; LIMA, J.G., *et al.* **Tiossemicarbazonas: Métodos de Obtenção, Aplicações Sintéticas e Importância Biológica.** *Quim. Nova*, **28**(6): 1030-1037, 2005.

TESSIER, C.; DEB, S.; PRINGENT-TESSIER, A.; FERGUSON-GOTTSCHALL, S.; GIBORI, G.B.; SHIU, R.P.C.; GIBORI, G. **Estrogen Receptors α and β in Rat Decidua Cells: Cell-Specific Expression and Differential regulation by Steroid Hormones and Prolactin.** *Endocrinology*, **141**(10): 3842-3851, 2000.

TESSIER, C.; PRINGENT-TESSIER, A.; FERGUSON-GOTTSCHALL, S.; GU, Y.; GIBORI, G. **PRL Antiapoptotic Effect in the Rat Decidua Involves the PI3K/Protein Kinase B-Mediated Inhibition of Caspase-3 Activity.** *Endocrinology*, **142**(9): 4086-4094, 2001.

THOMAS, C.W.; MYHRE, G.M.; TSCHUMPER, R., *et al.* **Selective inhibition of inflammatory gene expression in activated T lymphocytes: a mechanism of immune suppression by thiopurines.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **312**: 537-545, 2005.

TIEDE, I; FRITZ, G.; STRAND, S., *et al.* **CD28-dependent Rac-1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes.** *J. Clin. Invest.*, **111**: 1133-1145, 2003.

TRANGUCH, S.; SMITH, D.F.; DEY, S.K. **Progesterone receptor requires a co-chaperone for signaling in uterine biology and implantation.** *Reproductive Biomedicine Online*, **13**(5): 651-660, 2006.

UV-MADISON, UNIVERSITY WISCONSIN-MADISON. Dynamics of Development, Amphibian Embryology Tutorial: Gastrulation. **Zoology 470 Course Page**, 2002. Disponível em: <http://worms.zoology.wisc.edu/frogs/gast/gast_morph.html#vagition>. Acesso em: 16/12/2015.

VARLET, I.; COLLIGNON, J.; ROBERTSON, E.; **nodal expression in the primitive endoderm is required for specification of the anterior axis during mouse gastrulation.** *Development*, **124**: 1033-1044, 1997.

VICKERS, T.H. **The chronology of somites in rat embryos.** *Teratology*, **28**(3): 457-460, 1983.

WANG, J.; MAYERNIK, L.; ARMANT, D.R. **Inntegrin Signaling Regulates Blastocyst Adhesion to Fibronectin at Implantation: Intracellular Calcium Transients and Vesicle Trafficking in Primary Trophoblast Cells.** *Developmental Biology*, **245**: 270-279, 2002.

WATERS, M.D.; STACK, H.F.; JACKSON, M.A.; BROCKMAN, H.E.; De FLORA, S. **Activity profiles of antimutagens: in vitro and in vivo data.** *Mutation Research*, **350**: 09-129, 1996.

WATSON, E.D.; CROSS, J.C. **Development of Structures and Transport Functions in the Mouse Placenta.** *Physiology*, **20**: 180-193, 2005.

WATSON, J.D.; BELL, S.P; LOSICK, R.; BAKER, T.A.; GANN, A.; LEVINE, M. **Biologia Molecular do Gene.** 7ª Edição. Porto Alegre: Ed. Artmed S.A., 2015. p. 733-744.

WEINBERG, R.A. **A Biologia do Câncer.** Porto Alegre: Ed. Artmed S.A., 2008. p. 255-306.

WICKRAMARATNE, G.A. **The post-natal fate of supernumerary ribs in rat teratogenicity studies.** *J Appl Toxicol.*, 8(2):91-94, 1988.

WILSON, J.G. General principles and mechanisms derived from animal studies. In: WILSON, J.G.; FRASER, F.C. (Eds.). *Handbook of Teratology.* NY and London: Press Plenum, 1977, pp: 47-74.

WISE, L.D.; BECK, S.L.; BELTRAME, D.; BEYER, B.K.; CHAHOUD, I.; CLARK, R.L.; CLARK, R.; DRUGA, A.M.; FEUSTON, M.H.; GUITTIN, P.; HENWOOD, S.M.; KIMMEL, C.A.; LINDSTROM, P.; PALMER, A.K.; PETRERE, J.A.; SOLOMON, H.M.; YASUDA, M.; YORK, R.G. **Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1).** *Teratology*, **55**: 249-292, 1997.

WINKELSTEIN, A. **Effects of cytotoxic immunossuppressants on tuberculin-sensitive guines pigs.** *J. Clin. Invest.*, **56**(6): 1587-1596, 1975.

WOO, G.H.; KATAYAMA, K.; JUNG, J.Y., *et al.* **Hydroxyurea(HU)-induced apoptosis in the mouse fetal tissues.** *Histol. Histopathol.*, **18**: 387-392, 2003.

WOO, G.H.; BAK, E.J.; NAKAYAMA, H.; DOI, K. **Molecular mechanisms of hydroxyurea(HU)-induced apoptosis in the mouse fetal brain.** *Neurotoxicol.Teratol.*, **18** (1): 125-134, 2006.

WOODING, F.B.P.; BURTON, G.J. **Comparative Placentation: Structures, Functions and Evolution.** Verlag Berlin Heidelberg: Springer, 2008. p. 30-31.

YANG, Y.; PACE, B. **Pharmacologic induction of fetal hemoglobin synthesis: cellular and molecular mechanisms.** *Pediatr. Pathol. Mol. Med.*, **20**: 87–106, 2001.

YU, L.; WAXMAN, D.J. **Role of cytochrome P450 in oxazaphosphorine metabolism. Deactivation via N-dechloroethylation and activation via 4-hydroxylation catalyzed by distinct subsets of rat liver cytochromes P450.** *Drug Metab. Dispos.* **24**: 1254-1262, 1996.

ZHANG. S.; LIN, H.; KONG, S.; WANG, S; WANG, H.; WANG, H; ARMANT, R. **Physiological and molecular determinants of embryo implantation.** *Molecular Aspects of Medicine*, **34**: 939-980, 2013.

ZHOU, X.; SASAKI, H.; LOWE, L.; HOGAN. B.L.M.; KUEHN, M.R. **Nodal is a novel TGF- β -like gene expressed in the mouse node during gastrulation.** *Nature*, **361**: 543-547, 1993.

ZOHN, I.E.; SARKAR. A.A. **The Visceral Yolk Sac Endoderm Provides for Absorption of Nutrients to the Embryo during Neurulation.** *Birth Defects Research (Part A)*, **88**: 593-600, 2010.

ANEXOS

Anexo 2: Comparação entre placentas de rato e de humanos (Adaptado de FURUKAWA et al., 2011)

	Rato	Homem
Período embrionário/período fetal	3 (Embrião/ 1 (Feto))	1 (Embrião/ 4 (Feto))
Tipo de Implantação	Excêntrica	Intersticial
Placenta saco vitelino	Placenta saco vitelínica contribui para funções especiais durante a gestação	Placenta saco vitelínica é um órgão temporário, essencial durante a organogênese, e degenera ao final do primeiro trimestre.
Placenta cório-alantóica	Tipo labiríntica, formada por: <ul style="list-style-type: none"> - Zona labiríntica <ul style="list-style-type: none"> - Citotrofoblasto - Sinciciotrofoblasto - Zona basal <ul style="list-style-type: none"> - Espongiotrofoblasto - Células glicogênicas - Células Trofoblásticas gigantes - Decídua basal 	Tipo vilosa, formada por: <ul style="list-style-type: none"> - Placenta fetal <ul style="list-style-type: none"> - Sinciciotrofoblasto - Placa basal <ul style="list-style-type: none"> - Células citotrofoblásticas - Trofoblasto intersticial - Trofoblasto endovascular - Decídua basal
Barreira placentária	<p>Sangue materno</p> <p>↓</p> <p>Citotrofoblasto</p> <p>↓</p> <p>Sinciciotrofoblasto</p> <p>↓</p> <p>Sinciciotrofoblasto</p> <p>↓</p> <p>Membrana basal</p> <p>↓</p> <p>Capilares fetais</p> <p>↓</p> <p>Sangue Fetal</p>	<p>Sangue materno</p> <p>↓</p> <p>Sinciciotrofoblasto</p> <p>↓</p> <p>Membrana basal</p> <p>↓</p> <p>Capilares fetais</p> <p>↓</p> <p>Sangue Fetal</p>
Trofoblasto associado ao remodelamento vascular	Remodelamento vascular efetuado por trofoblastos endovasculares na glândula metrial	Remodelamento vascular efetuado por trofoblastos endovasculares e intersticiais na glândula metrial
Esteroidogênese placentária	A placenta sintetiza hormônios androgênicos a partir do colesterol. Estrogênio é produzido no ovário, devido á ausência de aromatase.	A placenta sintetiza pregnenolona a partir do colesterol. Estrogênio é produzido na placenta depois que a glândula adrenal fetal converte desidroepiandrosterona, devido á ausência de CYP17.
Síntese de hormônio glicoproteico	Hormônio glicoproteico não é produzido devido á ausência de produção da cadeia α .	HCG é produzido na placenta.

HCG: gonadotrofina coriônica; hormônio constituído por 2 cadeias distintas (subunidades α e β).

ANEXO 3: SÉRIES CLÍNICAS RELATANDO RESULTADOS DE GESTAÇÕES DE MULHERES TRATADAS COM AZATIOPRINA. (Adaptado de POLIFKA & FRIEDMAN, 2002).

Nº crianças	Razão do tratamento materno	Nº abortos espontâneos	Nº natimortos ou de mortes intrauterinas	Nº crianças nascidas vivas	Nº crianças com anomalias congênicas (AC) e/ou com problemas neonatais
32	TR	9	1	22	AC: 2; IUGR: 6; ND:7
18	TR	1	0	17	AC: 2; hepatoblastoma: 1; batimento cardíaco desacelerado e obstrução do cordão umbilical: 1; hiperbilirrubinemia: 4.
26	TR	3	0	23	Nascimento prematuro: 2; desconforto respiratório agudo: 1; Múltiplas malformações incompatíveis.com vida: 1; IUGR: 3; ND: 2.
26	TR	6	0	20	Nascimento prematuro: 2; ND: 2.
46	TR	1	1	44	Crianças com AC: 4; RDS: 4; insuficiência adrenocortical, linfopenia: 2; septicemia: 2.
28	TR	4	1	23	Nascimento prematuro: 13; SGA: 29; ND: 3
116	TR	13	8	95	Nascimento prematuro: 28; Crianças com AC: 4; SGA: 2; ND: 3
39	TR	2	0	37	Nascimento prematuro: 7; ND: 1
24	TR	0	0	24	Nascimento prematuro: 8; Crianças com AC: 1 (problema psicomotor); SGA: 4; RDS: 1
20	TR	0	1	19	IUGR: 8; oligoamnio: 4; emissão de mecônio: 9; hipóxia: 5; SGA: 8
110	TR	0	0	110	Crianças com AC: 5; CMV: 1; ND e hemorragia intracerebral: 1
22	TR	0	5	17	IUGR: 4; LBW: 4; ND: 1
13	TR	1	0	12	SGA: 3
13	TR	3	0	10	Nascimento prematuro: 5; Crianças com AC: 1 (hérnia do diafragma); ND: 4

AC: anomalias congênicas; CMV; citomegalovírus HA: hepatite autoimune; HCA hepatite crônica ativa; DR: doença reumática. DTCM: doença do tecido conectivo misto; IBD: doença inflamatória intestinal; IUD: morte intrauterina; IUGR: retardo de crescimento intrauterino; LBW: baixo peso ao nascer; LBW: baixo peso ao nascer; LES: lúpus eritematoso sistêmico; ND: morte neonatal; RDS: síndrome do desconforto respiratório; SGA: tamanho pequeno para a idade gestacional; TF:; transplante de fígado; TR: transplante renal; TRP: transplante de rins e pâncreas. Algumas crianças apresentavam uma ou mais anomalias.

(Cont.) ANEXO 3: SÉRIES CLÍNICAS RELATANDO RESULTADOS DE GESTAÇÕES DE MULHERES TRATADAS COM AZATIOPRINA. (Adaptado de Polifka & Friedman, 2002).

Nº crianças	Razão do tratamento materno	Nº de abortos espontâneos	Nº de natimortos ou de mortes intrauterinas	Nº crianças nascidas vivas	Nº de crianças com anomalias congênicas (AC) e/ou com problemas neonatais
13	TR	3	0	10	Nascimento prematuro: 5; Crianças com AC: 1 (hérnia do diafragma); ND: 4
14	TR	3	0	11	Nascimento prematuro: 3; IUGR: 4; displasia broncopulmonar: 1
8	TR	2	0	6	Nascimento prematuro: 1
14	TR	0	1	13	Nascimento prematuro: 1; SGA: 9
22	TR	2	0	20	Nascimento prematuro: 14; Crianças com AC: 1 (defeito no septo atrial); anemia: 2; LBW: 18
26	TR	3	3	20	Nascimento prematuro: 3
14	TR	1	5	8	Crianças com AC: 1 (Hidrocefalia); IUD: 1; ND: 1
23	TR	2	1	20	Nascimento prematuro: 14; Crianças com AC: 1 (fenda palatina no natimorto); LBW: 14; ND: 1
37	TR	2	2	33	Nascimento prematuro: 24; retardo do crescimento: 24; RDS: 4; Hipoplasia renal com refluxo: 1; poliomielite: 1; ND: 1
8	TR	0	1	8	Nascimento prematuro: 1; Crianças com AC: 1 (hipospádia); RDS: 2
11	TR	3	2	6	Crianças com AC: 1; ND: 1; cariótipo anormal: 1/5
13	TR	0	0	13	Crianças com AC: 2 (Fechamento prematuro fontelelas; 1; hérnia umbilical: 1); RDS: 2; ND: 1
30	TR/TRP/TF	0	0	30	Nascimento prematuro: 13; RDS: 1; SGA: 4; hipocalcemia: 2; trombocitopenia: 1
30	TR/TRP/TF	0	0	30	Nascimento prematuro: 13; RDS: 1; SGA: 4; hipocalcemia: 2; trombocitopenia: 1

AC: anomalias congênicas; CMV; citomegalovírus HA: hepatite autoimune; HCA hepatite crônica ativa; DR: doença reumática. DTCM: doença do tecido conectivo misto; DII: doença inflamatória intestinal; IUD: morte intrauterina; IUGR: retardo de crescimento intrauterino; LBW: baixo peso ao nascer; LBW: baixo peso ao nascer; LES: lúpus eritematoso sistêmico; ND: morte neonatal; RDS: síndrome do desconforto respiratório; SGA: tamanho pequeno para a idade gestacional; TF: transplante de fígado; TR: transplante renal; TRP: transplante de rins e pâncreas. Algumas crianças apresentavam uma ou mais anomalias.

(Cont.) ANEXO 3: SÉRIES CLÍNICAS RELATANDO RESULTADOS DE GESTAÇÕES DE MULHERES TRATADAS COM AZATIOPRINA. (Adaptado de Polifka & Friedman, 2002).

Nº crianças	Razão do tratamento materno	Nº de abortos espontâneos	Nº de natimortos ou de mortes intrauterinas	Nº crianças nascidas vivas	Nº de crianças com anomalias congênicas (AC) e/ou com problemas neonatais
7	TF	0	0	7	Nascimento prematuro: 2
7	LES	0	0	7	Crianças com AC: 1 (ventrículo direito com abertura dupla); pele de lúpus: 1; desconforto respiratório: 1; SGA: 2
9	HCA/LES/DTCM	0	0	9	Nascimento prematuro: 1; CMV: 1
33	DR	0	0	33	Crianças com AC: 3 (pés equinovaros: 1; testículo não descendente: 1; defeito cardiovascular: 1).
15	DII	0	0	15	Nascimento prematuro: 1; Cianose: 1
8	DII	0	0	8	Crianças normais
1	HA	0	0	1	Criança normal

AC: anomalias congênicas; CMV; citomegalovírus HA: hepatite autoimune; HCA hepatite crônica ativa; DR: doença reumática. DTCM: doença do tecido conectivo misto; DII: doença inflamatória intestinal; IUD: morte intrauterina; IUGR: retardo de crescimento intrauterino; LBW: baixo peso ao nascer; LBW: baixo peso ao nascer; LES: lúpus eritematoso sistêmico; ND: morte neonatal; RDS: síndrome do desconforto respiratório; SGA: tamanho pequeno para a idade gestacional; TF: transplante de fígado; TR: transplante renal; TRP: transplante de rins e pâncreas. Algumas crianças apresentavam uma ou mais anomalias.

ANEXO 4: ESTUDOS DE CASOS RELATANDO RESULTADOS DE GESTAÇÕES DE MULHERES TRATADAS COM AZATIOPRINA. (Adaptado de POLIFKA & FRIEDMAN, 2002).

Nº crianças	Razão do tratamento materno	Nº de abortos espontâneos	Nº de natimortos ou de mortes intrauterinas	Nº crianças nascidas vivas	Nº de crianças com anomalias congênicas (AC) e/ou com problemas neonatais
1	TR	0	0	1	Criança normal
1	TR	0	0	1	Nascimento prematuro; RDS; Criança com AC (defeito no septo atrial), hiperbilirrubinemia e hipotireoidismo
1	TR	0	0	1	Nascimento prematuro; SGA; IUGR; criança com hipotonia transitória
5	TR	0	0	5	Crianças normais
1	TR	0	0	1	Criança normal
1	TR	0	0	1	Criança normal
5	TR	0	0	5	Crianças normais
2	TR	0	0	2	Crianças normais
2	TR	0	0	2	Crianças normais
1	TR	0	0	1	Hiperparatireoidismo transitório
5	TR	0	0	5	Crianças com AC: 2 (anomalia valvular aórtica e defeito do septo ventricular: 1; desenvolvimento psicomotor atrasado: 1); RDS: 1; acidose metabólica: 1; dificuldade respiratória: 1;
1	TR	0	0	1	Criança normal
6	TR	0	0	6	Crianças normais: 5; SGA: 1
2	TR	0	1	1	Criança normal: 1
2	TR	0	0	2	Nascimento prematuro: 1; Criança normal: 1;

AC: anomalias congênicas; CMV; citomegalovírus; HC: hepatite crônica ativa; DRC: doença renal crônica; LBW: baixo peso ao nascer; LES: lúpus eritematoso sistêmico; ND: morte neonatal; RDS: síndrome do desconforto respiratório; SGA: tamanho pequeno para a idade gestacional; TC: Transplante cardíaco; TF: transplante de fígado; TPU: transplante de pulmão; TR: transplante renal; TRP: transplante de rins e pâncreas. Algumas crianças apresentavam uma ou mais anomalias.

(Cont.) ANEXO 4: ESTUDOS DE CASOS RELATANDO RESULTADOS DE GESTAÇÕES DE MULHERES TRATADAS COM AZATIOPRINA. (Adaptado de POLIFKA & FRIEDMAN, 2002).

Nº crianças	Razão do tratamento materno	Nº de abortos espontâneos	Nº de natimortos ou de mortes intrauterinas	Nº crianças nascidas vivas	Nº de crianças com anomalias congênicas (AC) e/ou com problemas neonatais
6	TR	0	0	6	Crianças normais: 5 Criança com AC: 1 (Hemangioma cerebral)
1	TR	0	0	1	Criança normal
1	TR	0	0	1	RDS
2	TR	0	0	2 (gêmeos)	Gêmeo A: cardiomiopatia dilatada e trombócita; RDS; morte. Gêmeo B: cardiomiopatia dilatada; RDS; falha renal; função cardíaca pobre; anasarca.
1	TR	0	0	1	Dano cromossômico transitório (linfócitos)
1	TR	0	0	1	Criança normal
2	TR	0	0	2	Crianças normais
5	TR	1	0	4	Crianças normais: 4
1	TR	0	0	1	LBW
1	TR	0	0	1	Criança normal
2	TR	0	0	2	Crianças normais
3	TR	0	0	3	Crianças normais
2	TR	0	0	2	Crianças normais
2	TR	0	0	2	Morte após nascimento: 2; RDS: 2; hipoplasia de sistema linfático, medula óssea e córtex adrenal: 2
2	TR	0	0	2	Criança com AC: 1 (Anencefalia); Criança normal: 1
1	TRP	0	0	1	Criança normal
1	DRC	0	0	1	Criança normal; infecção com CMV

AC: anomalias congênicas; CMV; citomegalovírus; HC: hepatite crônica; DRC: doença renal crônica; LBW: baixo peso ao nascer; LBW: baixo peso ao nascer; LES: lúpus eritematoso sistêmico; ND: morte neonatal; RDS: síndrome do desconforto respiratório; SGA: tamanho pequeno para a idade gestacional; TC: Transplante cardíaco; TF: transplante de fígado; TPU: transplante de pulmão; TR: transplante renal; TRP: transplante de rins e pâncreas. Algumas crianças apresentavam uma ou mais anomalias.

(Cont.) ANEXO 4: ESTUDOS DE CASOS RELATANDO RESULTADOS DE GESTAÇÕES DE MULHERES TRATADAS COM AZATIOPRINA. (Adaptado de Polifka & Friedman, 2002).

Nº crianças	Razão do tratamento materno	Nº de abortos espontâneos	Nº de natimortos ou de mortes intrauterinas	Nº crianças nascidas vivas	Nº de crianças com anomalias congênicas (AC) e/ou com problemas neonatais
1	TC	0	0	1	Criança normal
1	TC	0	0	1	Criança normal
1	TC	0	0	1	Criança normal
1	TC	0	0	1	Criança normal
1	TC	0	0	1	Criança normal
2	TC	0	0	2	SGA: 1; desconforto respiratório: 1; criança normal: 1
1	TC	0	0	1	Criança normal
1	TC	0	0	1	Criança normal
1	TC/TPU	0	0	1	Criança normal
2	TC/TPU	0	0	2	Crianças normais
2	TC/TPU	0	0	2	Crianças normais
2	TF	0	0	2	Crianças normais
1	TF	0	0	1	Criança normal
1	TF	0	0	1	Criança normal
1	TF	0	0	1	Criança normal
1	TF	0	0	1	Criança normal
1	TF	0	0	1	Infecção com CMV, anemia, morte após nascimento
3	TF	0	0	3	Crianças normais
5	TPU	0	0	5	Crianças normais
1	LES	0	0	1	Criança normal

AC: anomalias congênicas; CMV; citomegalovírus; HC: hepatite crônica; DRC: doença renal crônica; LBW: baixo peso ao nascer; LES: lúpus eritematoso sistêmico; ND: morte neonatal; RDS: síndrome do desconforto respiratório; SGA: tamanho pequeno para a idade gestacional; TC: Transplante cardíaco; TF: transplante de fígado; TPU: transplante de pulmão; TR: transplante renal; TRP: transplante de rins e pâncreas. Algumas crianças apresentavam uma ou mais anomalias.

(Cont.) ANEXO 4: ESTUDOS DE CASOS RELATANDO RESULTADOS DE GESTAÇÕES DE MULHERES TRATADAS COM AZATIOPRINA. (Adaptado de Polifka & Friedman, 2002).

Nº crianças	Razão do tratamento materno	Nº de abortos espontâneos	Nº de natimortos ou de mortes intrauterinas	Nº crianças nascidas vivas	Nº de crianças com anomalias congênicas (AC) e/ou com problemas neonatais
1	TF	0	0	1	Criança normal
1	TF	0	0	1	Infecção com CMV, anemia, morte após nascimento: 1
3	TF	0	0	3	Crianças normais
5	TPU	0	0	5	Crianças normais
1	LES	0	0	1	Criança normal
1	LES	0	0	1	Criança normal
4	LES	2	0	4	Crianças normais: 2; pneumotórax e pneumonia: 1
3	LES	2	0	3	Criança normal: 1
1	LES	0	0	1	microcefalia; defeitos faciais; micropenis, retardo do crescimento, aberrações cromossômicas
1	LES	0	0	1	Polidactilia pré-axial
1	-	0	0	1	Criança normal
1	Granuloma de Wegener	0	0	1	Criança normal
2	Colite ulcerativa	0	0	2	Crianças normais
1	Doença de Crohn	0	0	1	Criança normal
1	Glomerulonefrite	0	0	1	Parassístole ventricular
1	HC	0	0	1	Criança normal

AC: anomalias congênicas; CMV; citomegalovírus; HC: hepatite crônica; DRC: doença renal crônica; LBW: baixo peso ao nascer; LBW: baixo peso ao nascer; LES: lúpus eritematoso sistêmico; ND: morte neonatal; RDS: síndrome do desconforto respiratório; SGA: tamanho pequeno para a idade gestacional; TC: Transplante cardíaco; TF: transplante de fígado; TPU: transplante de pulmão; TR: transplante renal; TRP: transplante de rins e pâncreas. Algumas crianças apresentavam uma ou mais anomalias.

ANEXO 5: ESTUDOS DE CASOS RELATANDO RESULTADOS DE GESTAÇÕES DE MULHERES TRATADAS COM 6-MERCAPTOPURINA (6-MP). (Adaptado de POLIFKA & FRIEDMAN, 2002).					
Nº crianças	Razão do tratamento materno	Nº de abortos espontâneos	Nº de natimortos ou de mortes intrauterinas	Nº crianças nascidas vivas	Nº de crianças com anomalias congênicas (AC) e/ou com problemas neonatais
1	Leucemia	0	0	1	AC: microftalmia bilateral; opacidade córnea; fenda palatina; tireoide e ovários hipoplásicos; cifose torácica; citomegalia; IUGR; morte 10 semanas após o nascimento. Morte materna 1 mês após o parto.
1	Leucemia	0	0	1	Criança normal
1	Leucemia	0	0	1	Criança normal
1	Leucemia	0	0	1	Morte materna na 23ª semana de gravidez; Morfologia da criança normal
1	Leucemia	0	0	1	Nascimento prematuro; Anemia hemolítica micro angiopática. Morte materna 16 dias após parto.
1	Leucemia	0	0	1	Nascimento prematuro; criança normal. Morte materna 3 dias após o parto;
1	Leucemia	0	0	1	Criança normal. Morte materna 3 meses após o parto;
1	Leucemia	0	0	1	Nascimento prematuro; criança normal.
1	Leucemia	0	0	1	Nascimento prematuro. Morte da criança 12 horas após nascimento. Morte materna 5 dias após o parto;
1	Leucemia	0	0	1	Criança normal
1	Leucemia	0	0	1	Morte da criança 2 horas após nascimento. Morte materna.
1	Leucemia	0	0	1	Natimorto. Nascimento prematuro (7 meses). Morte materna durante o parto.
1	Leucemia	0	0	1	Criança normal
1	Leucemia	0	0	1	Nascimento prematuro; morte 2 dias após o nascimento. Morte materna 2 meses após o parto.
1	Leucemia	0	0	1	Criança normal. Morte materna 7 meses após o parto.
1	Leucemia	0	0	1	Criança normal. Morte materna 4 semanas após o parto.

(Cont.) ANEXO 5: ESTUDOS DE CASOS RELATANDO RESULTADOS DE GESTAÇÕES DE MULHERES TRATADAS COM 6-MERCAPTOPURINA (6-MP). (Adaptado de POLIFKA & FRIEDMAN, 2002).

Nº crianças	Razão do tratamento materno	Nº de abortos espontâneos	Nº de natimortos ou de mortes intrauterinas	Nº crianças nascidas vivas	Nº de crianças com anomalias congênitas (AC) e/ou com problemas neonatais
1	Leucemia	0	0	1	Nascimento prematuro; criança normal. Morte materna 4 meses após o parto.
1	Leucemia	0	0	1	Criança normal
1	Leucemia	0	0	1	Criança normal
1	Leucemia	0	0	1	Criança normal
1	Leucemia	0	0	1	Criança normal
1	Leucemia	0	0	1	Criança normal. Morte materna 2 semanas após o parto.
1	Leucemia	0	1	0	Criança seria normal. Morte materna 1 semana após o parto.
1	Leucemia	0	0	1	Criança normal. Morte materna 5 meses após o parto.
1	Leucemia	0	0	1	Nascimento prematuro; criança normal.
1	Leucemia	0	0	1	Natimorto; polidactilia.
1	Leucemia	0	0	1	Criança com hipoplasia transitória da medula óssea.
4	Leucemia	2 (um dos fetos era malformado)	0	2	2 gêmeos. Gêmeo A: Criança normal; Gêmeo B: microcefalia; hipertelorismo; focomelia.
1	Leucemia	0	0	1	Criança normal
1	Leucemia	0	0	1	Criança normal. Morte materna 6 meses após o parto.
1	Leucemia	0	0	1	Criança normal; cariótipo apresentando anéis e <i>gaps</i> .
1	Leucemia	0	0	1	Criança normal, apresentando leucopenia leve.
2	Leucemia	0	0	2	Gêmeos normais; sepsis neonatal.
1	Leucemia	0	0	1	Criança normal, com policitemia e hiperbilirrubinemia
1	Leucemia	0	0	1	Nascimento prematuro; criança normal

(Cont.) ANEXO 5: ESTUDOS DE CASOS RELATANDO RESULTADOS DE GESTAÇÕES DE MULHERES TRATADAS COM 6-MERCAPTOPURINA (6-MP). (Adaptado de POLIFKA & FRIEDMAN, 2002).

Nº crianças	Razão do tratamento materno	Nº de abortos espontâneos	Nº de natimortos ou de mortes intrauterinas	Nº crianças nascidas vivas	Nº de crianças com anomalias congênicas (AC) e/ou com problemas neonatais
1	Leucemia	0	0	1	Criança normal. Morte materna 3 semanas após o parto (pré-eclampsia).
1	Leucemia	1	0	0	-
1	Leucemia	0	0	1	Criança normal. Morte materna 1 mês após o parto.
1	Leucemia	0	0	1	Nascimento prematuro; morte 19 horas após o nascimento.
1	Leucemia	0	0	1	Criança com murmúrio cardíaco de tipo desconhecido
1	Leucemia	0	0	1	Criança normal
1	Leucemia	1	0	0	-
1	Leucemia	0	0	1	Criança normal. Morte materna 3 dias após o parto.
1	Leucemia	0	0	1	Criança normal
1	Leucemia	0	0	1	Criança normal
1	Linfoma não-Hodgkin	1	0	0	-
1	Lupus Eritematoso Sistêmico	0	0	1	Criança normal
2	Doença Intestinal Inflamatória	0	0	2	Crianças normais

PARTE I

**DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE DOSES DE HU E 6-MP
ADMINISTRADAS A RATAS NO DG11 E OS EFEITOS EMBRIOTÓXICOS EM
RATOS (DG21).**

HIDROXIUREIA (HU)

Anexo 6: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do crânio induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg)				
	0	250	300	400	500
<i>Fetos vivos (N)</i>	106	131	117	129	60
<i>Ninhadas (N)</i>	11	11	11	12	7
<i>Malformações (%):</i>					
Fusão do osso zigomático com processo jugular do maxilar	0,00 (0,00)	0,76 (9,09)	0,85 (9,09)	3,88 (33,33)	6,67 ^{abc} (42,86) ^a
Ossos timpânicos tortos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	1,55 (8,33)	0,00 (0,00)
Processo jugular do maxilar torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Ausência do osso timpânico	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,55 (16,67)	8,33 (42,86)
Ausência do osso gonial	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,55 (8,33)	1,67 (14,29)
Forma irregular do osso interparietal	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Forma irregular do osso supraoccipital	0,94 (9,09)	7,63 ^a (36,36)	11,97 ^a (45,45)	3,10 ^c (25,00)	1,67 ^c (14,29)
Forma irregular do osso exoccipital	0,00 (0,00)	1,53 (18,18)	11,97 ^{ab} (36,36)	22,48 ^{abc} (41,67) ^a	21,67 ^{ab} (28,57)
Forma irregular do osso basoccipital	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Forma irregular do osso timpânico	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	9,30 ^{abc} (41,67) ^{abc}	5,00 ^{abc} (42,86) ^{abc}
Forma irregular do osso escamoso	12,26 (45,45)	33,59 ^a (81,82)	12,82 ^b (54,55)	20,93 ^b (91,67) ^a	10,00 ^b (57,14)
Forma irregular do osso zigomático	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
Forma irregular do osso premaxilar	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Forma irregular do osso pre-esfenoide	0,00 (0,00)	15,27 ^a (36,36)	0,85 ^b (9,09)	6,20 ^{abc} (16,67)	0,00 ^b (0,00)
Forma irregular do osso basoesfenoide	0,00 (0,00)	0,76 (9,09)	0,00 (0,00)	1,55 (16,67)	3,33 (28,57)
Forma irregular do osso âmulus	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
Forma irregular do osso pterigoide	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
Forma irregular da mandíbula	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
Assimetria do osso escamoso	1,89 (9,09)	5,34 (45,45)	4,27 (27,27)	3,10 (36,36)	0,00 (0,00)

(Cont.) Anexo 6: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do crânio induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg)				
	0	250	300	400	500
<i>Malformações (%):</i>					
Osso frontal incompleto	0,94 (9,09)	3,05 (27,27)	17,09 ^{ab} (36,36)	15,50 ^{ab} (50,00)	11,67 ^{ab} (28,57)
Osso parietal incompleto	0,94 (9,09)	6,11 ^a (36,36)	1,71 (18,18)	1,55 (8,33)	10,00 ^{abcd} (28,57)
Osso interparietal incompleto	1,89 (9,09)	0,76 (9,09)	0,00 (0,00)	3,88 (25,00)	21,67 ^{abcd} (28,57)
Osso supraoccipital incompleto	36,79 (90,91)	48,09 (72,73)	53,85 ^a (100,00)	72,87 ^{abc} (100,00)	81,67 ^{abc} (85,71)
Osso exoccipital incompleto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	7,75 ^{abc} (25,00)	30,00 ^{abcd} (28,57)
Osso timpânico incompleto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Osso escamoso incompleto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,00 ^{abcd} (14,29)
Osso timpânico menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	23,26 ^{abc} (50,00) ^{ab}	40,00 ^{abcd} (57,14) ^{abc}
Osso timpânico mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,65 ^{abc} (16,67)	0,00 (0,00)
Osso gonialo menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Osso timpânico mais largo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,33 (8,33)	0,00 (0,00)
Osso interparietal mais estreito	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Fissura no osso interparietal	0,00 (0,00)	0,76 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Fissura no basoesfenoide	1,89 (9,09)	0,76 (9,09)	0,85 (9,09)	3,10 (16,67)	3,33 (28,57)
Ossificação adicional próxima ao osso frontal	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Ossificação adicional próxima ao osso parietal	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
Ossificação adicional próxima ao osso interparietal	0,00 (0,00)	0,76 (9,09)	0,85 (9,09)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
Ossos parietais mais distantes	0,00 (0,00)	10,69 ^a (27,27)	31,62 ^{ab} (54,55) ^a	24,03 ^{ab} (58,33) ^a	56,67 ^{abcd} (71,43) ^a
Distância maior entre os ossos da mandíbula	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	0,00 (0,00)	3,33 (14,29)
Buraco no osso supraoccipital	0,94 (9,09)	6,11 ^a (27,27)	6,84 ^a (27,27)	2,33 (25,00)	1,67 (14,29)
Buraco no osso supraoccipital	0,94 (9,09)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Buraco no osso timpânico	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Buraco no osso escamoso	12,26 (54,55)	19,85 (81,82)	16,24 (63,64)	34,11 ^{abc} (91,67)	23,33 (42,86) ^d
Buraco no processo jugular do maxilar	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Buraco no osso basoesfenoide	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)

Anexo 7: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos do crânio induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg)				
	0	250	300	400	500
<i>Fetos vivos (N)</i>	106	131	117	129	60
<i>Ninhadas (N)</i>	11	11	11	12	7
<i>Alterações (%):</i>					
Osso supraoccipital esponjoso	0,00 (0,00)	3,82 (27,27)	1,71 (18,18)	11,63 ^{abc} (33,33)	21,67 ^{abc} (28,57)
Osso interparietal esponjoso	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	8,33 ^{abcd} (14,29)
Osso nasal pobremente calcificado	1,89 (9,09)	1,53 (18,18)	0,85 (9,09)	22,48 ^{abc} (58,33) ^{ac}	53,33 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Osso frontal pobremente calcificado	1,89 (9,09)	1,53 (18,18)	0,85 (9,09)	22,48 ^{abc} (58,33) ^{ac}	53,33 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Osso parietal pobremente calcificado	1,89 (9,09)	1,53 (18,18)	4,27 (27,27)	26,36 ^{abc} (75,00) ^{abc}	56,67 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Osso interparietal pobremente calcificado	5,66 (27,27)	7,63 (45,45)	14,53 ^a (63,54)	34,88 ^{abc} (83,33) ^a	63,33 ^{abcd} (85,71)
Osso supraoccipital pobremente calcificado	50,00 (81,82)	64,12 ^a (100,00)	73,50 ^a (100,00)	74,42 ^a (91,67)	78,33 ^a (85,71)
Osso exoccipital pobremente calcificado	2,83 (18,18)	0,76 (9,09)	8,55 ^b (36,36)	32,56 ^{abc} (75,00) ^{ab}	61,67 ^{abcd} (85,71) ^{ab}
Osso basoccipital pobremente calcificado	12,26 (36,36)	34,35 ^a (72,73)	31,62 ^a (90,91) ^a	58,14 ^{abc} (91,67) ^a	78,33 ^{abcd} (85,71)
Osso timpânico pobremente calcificado	3,77 (9,09)	2,29 (27,27)	11,97 ^{ab} (27,27)	35,66 ^{abc} (75,00) ^{abc}	66,67 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Osso gonialo pobremente calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,55 (8,33)	21,67 ^{abcd} (42,86) ^{abc}
Osso hioide pobremente calcificado	0,00 (0,00)	6,11 ^a (36,36)	9,40 ^a (18,18)	37,98 ^{abc} (91,67) ^{abc}	63,33 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Osso escamoso pobremente calcificado	1,89 (18,18)	2,29 (18,18)	5,13 (27,27)	28,68 ^{abc} (83,33) ^{abc}	60,00 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Processo jugular do osso escamoso pobremente calcificado	3,77 (18,18)	2,29 (18,18)	4,27 (27,27)	28,68 ^{abc} (83,33) ^{abc}	60,00 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Osso zigomático pobremente calcificado	3,77 (18,18)	3,05 (27,27)	4,27 (27,27)	30,23 ^{abc} (83,33) ^{abc}	60,00 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Osso maxilar pobremente calcificado	3,77 (18,18)	3,05 (27,27)	4,27 (27,27)	27,91 ^{abc} (83,33) ^{abc}	60,00 ^{abcd} (85,71) ^{abc}

(Cont.) Anexo 7: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos do crânio induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg)				
	0	250	300	400	500
<i>Alterações (%):</i>					
Processo jugular do maxilar pobremente calcificado	3,77 (18,18)	3,05 (27,27)	4,27 (27,27)	27,91 ^{abc} (83,33) ^{abc}	60,00 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Osso premaxilar pobremente calcificado	3,77 (18,18)	3,05 (27,27)	4,27 (27,27)	27,91 ^{abc} (83,33) ^{abc}	60,00 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Osso lacrimal pobremente calcificado	2,83 (18,18)	2,29 (18,18)	3,42 (27,27)	26,36 ^{abc} (75,00) ^{abc}	60,00 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Lâmina orbital do osso frontal pobremente calcificada	1,89 (9,09)	2,29 (18,18)	3,42 (27,27)	26,36 ^{abc} (75,00) ^{abc}	60,00 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
Osso vomer pobremente calcificado	1,89 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
Osso palatino pobremente calcificado	3,77 (27,27)	6,87 (27,27)	16,24 ^{ab} (81,82) ^{ab}	36,43 ^{abc} (83,33) ^{ab}	71,67 ^{abcd} (85,71) ^{ab}
Osso presfenoide pobremente calcificado	3,77 (9,09)	0,00 ^a (0,00)	1,71 (9,09)	16,28 ^{abc} (50,00) ^b	38,33 ^{abcd} (71,43) ^{abc}
Osso presfenoide não calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,55 (16,67)	0,00 (0,00)
Osso orbitoesfenoide pobremente calcificado	5,66 (36,36)	6,87 (27,27)	11,97 (63,64)	36,43 ^{abc} (83,33) ^{ab}	70,00 ^{abcd} (85,71) ^b
Osso basoesfenoide pobremente calcificado	10,38 (36,36)	18,32 (81,82)	23,08 ^a (81,82)	41,86 ^{abc} (83,33) ^a	70,00 ^{abcd} (85,71)
Osso hamulus pobremente calcificado	2,83 (18,18)	6,87 (36,36)	15,38 ^{ab} (63,64)	37,21 ^{abc} (83,33) ^{ab}	71,67 ^{abcd} (85,71) ^a
Osso pterigóide pobremente calcificado	2,83 (18,18)	9,16 (54,55)	15,38 ^a (63,64)	36,43 ^{abc} (75,00) ^a	71,67 ^{abcd} (85,71) ^a
Mandíbula pobremente calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	16,28 ^{abc} (50,00) ^{ab}	98,33 ^{abcd} (100,00) ^{abcd}
2890	0,00 (0,00)	0,76 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)

Anexo 8: Tipos e frequências de anomalias dos ossos da coluna vertebral induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg)				
	0	250	300	400	500
<i>Fetos vivos (N)</i>	106	131	117	129	60
<i>Ninhadas (N)</i>	11	11	11	12	7
<i>Malformações (%):</i>					
Forma irregular do atlas	1,89 (18,18)	0,76 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Atlas mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,00 ^{abcd} (14,29)
Atlas mais curto e mais largo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Atlas mais largo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	0,00 (0,00)	3,33 (14,29)
Forma irregular do axis	4,72 (27,27)	19,85 ^a (72,73)	14,53 ^a (36,36)	9,30 ^b (16,67) ^b	13,33 (28,57)
Ossificação incompleta de 1-6 arcos vertebrais cervicais	0,00 (0,00)	0,76 (9,09)	3,42 (18,18)	3,88 (16,67)	18,33 ^{abcd} (28,57)
Fusão entre 2 arcos vertebrais cervicais adjacentes	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
Fusão entre 2-6 arcos vertebrais torácicos adjacentes	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,88 ^b (33,33)	3,33 (14,29)
1-2 corpos vertebrais torácicos fundidos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
Interrupção do processo de fechamento de 1-13 corpos vertebrais torácicos	3,77 (27,27)	12,21 (54,55)	11,11 ^a (54,55)	33,33 ^{abc} (75,00) ^a	46,67 ^{abc} (85,71) ^a
Corpo de 1-2 vertebrais torácicas dividido assimetricamente	0,00 (0,00)	1,53 (18,18)	0,85 (9,09)	6,20 ^{ac} (41,67) ^a	11,67 ^{abc} (42,86) ^a
Corpo de 1-2 vertebrais torácicas dividido simetricamente	0,94 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,88 ^b (33,33)	3,33 (14,29)
Centros ossific. de 1-6 corpos vertebrais torácicos em forma de <i>dumb-bell</i>	0,94 (9,09)	13,74 ^a (72,73) ^a	6,84 ^a (45,45)	24,81 ^{abc} (75,00) ^a	45,00 ^{abcd} (85,71) ^a
Fusão entre 1 arco vertebral torácico e 1 arco lombar adjacente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,55 (8,33)	0,00 (0,00)
Fusão entre 2-6 arcos vertebrais lombares adjacentes	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,20 ^{abc} (33,33)	18,33 ^{abc} (57,14) ^{abc}
Fusão de 1 arco vertebral lombar com 1 arco sacral adjacente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	8,33 ^{abcd} (28,57)
Fusão entre 2 corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,55 (8,33)	6,67 ^{abc} (28,57)
Interrupção do processo de fechamento de 1-6 corpos vertebrais lombares	1,89 (9,09)	3,05 (27,27)	0,85 (9,09)	10,08 ^{abc} (58,33) ^{ac}	28,33 ^{abcd} (85,71) ^{abc}
3-6 corpos vertebrais lombares divididos simetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Forma irregular de 1-2 arcos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Centros ossific. de 1-2 corpos vertebrais lombares em forma de <i>dumb-bell</i>	0,00 (0,00)	2,29 (18,18)	7,69 ^a (36,36)	4,65 ^a (50,00) ^a	13,33 ^{ab} (57,14) ^a

(Cont.) Anexo 8: Tipos e frequências de anomalias dos ossos da coluna vertebral induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg)				
	0	250	300	400	500
<i>Malformações (%):</i>					
1-2 corpos vertebrais lombares divididos assimetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	5,43 ^{ab} (33,33)	15,00 ^{abcd} (28,57)
1-6 corpos vertebrais lombares desalinhados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,43 ^{abc} (25,00)	21,67 ^{abcd} (42,86) ^{abc}
Hemicentro de 1-2 corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
Ossificação unilateral do corpo de 1-2 vértebras lombares	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	3,33 (14,29)
Forma irregular de 1-2 arcos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	21,37 ^a (81,82) ^a	42,74 ^{ab} (72,73) ^a	34,11 ^{ab} (83,33) ^a	41,67 ^{ab} (71,43) ^a
Fusão entre 2-4 arcos vertebrais sacrais adjacentes	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	0,00 (0,00)	31,67 ^{abcd} (57,14) ^{abcd}
Corpo de 1-2 vertebrais sacrais desalinhado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
Ausência de 1-2 corpos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Posição irregular de até 2 arcos vertebrais da coluna sacral	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
1-2 arcos vertebrais sacrais desalinhados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
1-4 corpos vertebrais sacrais adjacentes fundidos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	8,33 ^{abcd} (42,86) ^{abcd}
Interrupção do processo de fechamento de 1-4 corpos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	4,65 ^{ab} (25,00)	3,33 (28,57)
Corpo de 1-2 vertebrais sacrais dividido simetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,33 (28,57)
Ossificação unilateral do corpo de 1-4 vértebras sacrais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,00 ^{abcd} (14,29)
Centros ossific. de 1-4 corpos vertebrais sacrais em forma de <i>dumb-bell</i>	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Corpo de 1-4 vertebrais sacrais divididos assimetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,67 ^{abcd} (42,86) ^{abcd}
Corpo de 1-4 vertebrais sacrais desalinhados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	8,33 ^{abcd} (28,57)
Corpos das 2 vertebrais caudais desalinhados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,55 (8,33)	3,33 (14,29)
Fusão entre corpos de 2 vértebras caudais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	1,67 (14,29)
Corpo de 1-2 vertebrais caudais dividido simetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
Adição de 1 vértebra na coluna lombar	0,00 (0,00)	6,11 ^a (45,45) ^a	8,55 ^a (36,36)	6,20 ^a (25,00)	6,67 ^a (14,29)
Escoleose na coluna lombar	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,55 (8,33)	1,67 (14,29)

Anexo 9: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos da coluna vertebral induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg)				
	0	250	300	400	500
<i>Fetos vivos (N)</i>	106	131	117	129	60
<i>Ninhadas (N)</i>	11	11	11	12	7
<i>Alterações (%) :</i>					
1-13 vértebras torácicas pobremente calcificadas	2,83 (18,18)	6,11 (36,36)	10,26 ^a (54,55)	37,21 ^{abc} (83,33) ^{ab}	70,00 ^{abcd} (85,71) ^a
1-7 corpos vertebrais cervicais não calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
1-2 arcos vertebrais cervicais não calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Todas as 7 vértebras cervicais pobremente calcificada	2,83 (18,18)	5,34 (36,36)	5,98 (36,36)	31,78 ^{abc} (66,67) ^{abc}	66,67 ^{abcd} (85,71) ^a
3-6 corpos vertebrais lombares não calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,55 (8,33)	0,00 (0,00)
1-6 vértebras lombares pobremente calcificadas	8,49 (45,45)	12,21 (81,82)	15,38 (63,64)	42,64 ^{abc} (83,33)	71,67 ^{abcd} (85,71)
1-4 corpos vertebrais sacrais não calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	5,00 ^{abc} (28,57)
1-4 vértebras sacrais pobremente calcificadas	16,98 (63,64)	19,85 (90,91)	27,35 (72,73)	56,59 ^{abc} (91,67)	75,00 ^{abcd} (85,71)
1-2 vértebras caudais não calcificadas	0,94 (9,09)	5,34 (45,45)	9,40 (36,36)	16,28 ^{ab} (66,67) ^a	28,33 ^{abc} (57,14) ^a
1-4 arcos vertebrais caudais não calcificados	0,00 (0,00)	0,76 (9,09)	0,85 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Os 2 corpos vertebrais da coluna caudal não calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
1-2 vértebras caudais pobremente calcificadas	37,74 (90,91)	33,59 (90,91)	38,46 (81,82)	62,79 ^{abc} (100,00) ^a	70,00 ^{abc} (71,43) ^a

Anexo 10: Tipos e frequências de anomalias da costela induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg)				
	0	250	300	400	500
<i>Fetos vivos (N)</i>	106	131	117	129	60
<i>Ninhadas (N)</i>	11	11	11	12	7
<i>Malformações (%):</i>					
Fusão entre 2 costelas	0,00 (0,00)	0,76 (9,09)	1,71 (18,18)	5,43 ^{ab} (50,00) ^a	1,67 (14,29)
Fusão entre pelo menos 2 pares de costelas	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,71 (18,18)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
1-2 costelas menores	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
1 a 13 costelas mais curtas	6,60 (27,27)	25,95 ^a (63,64)	20,51 ^a (54,55)	24,8 ^a (83,33) ^a	26,67 ^a (41,67)
Costela extra rudimentar na coluna cervical	11,32 (54,55)	1,53 ^a (9,09)	0,00 (0,00) ^a	2,33 ^a (25,00)	0,00 ^a (0,00) ^a
Costela extra na coluna lombar	50,00 (90,91)	36,64 ^a (90,91)	38,46 (90,91)	24,03 ^{abc} (66,67)	36,67 (41,67)
Ausência de 1 costela	0,00 (0,00)	0,76 (9,09)	0,85 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)

Anexo 11: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do esterno induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg)				
	0	250	300	400	500
<i>Fetos vivos (N)</i>	106	131	117	129	60
<i>Ninhadas (N)</i>	11	11	11	12	7
<i>Malformações (%):</i>					
Esterno deslocado	1,89 (18,18)	14,50 (81,82) ^a	15,38 ^a (45,45)	13,95 ^a (67,67) ^a	23,33 ^a (71,43) ^a
Forma irregular da 1 ^a esternebra	0,00 (0,00)	1,53 (9,09)	0, (0,00)	6,20 ^{ac} (41,67) ^{ac}	5,00 ^{ac} (28,57)
1 ^a esternebra menor	0,94 (9,09)	0,76 (9,09)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	1,67 (14,29)
Forma irregular da 2 ^a esternebra	12,26 (36,36)	14,50 (81,82)	11,11 (54,55)	17,83 (83,33) ^a	23,33 ^c (57,14)
2 ^a esternebra menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,33 (25,00)	3,33 (14,29)
Forma irregular da 3 ^a esternebra	19,81 (81,82)	17,56 (81,82)	16,24 (73,73)	20,16 (100,00)	31,67 ^{bc} (85,71)
3 ^a esternebra menor	0,00 (0,00)	0,76 (0,09)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
Forma irregular da 4 ^a esternebra	35,85 (90,91)	32,82 (100,00)	29,91	27,13 (91,67)	36,67 (85,71)
4 ^a esternebra menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,33 (16,67)	0,00 (0,00)
Forma irregular da 5 ^a esternebra	51,89 (100,00)	44,27 (90,91)	54,70	42,64 (91,67)	21,67 ^{abcd} (71,43)
5 ^a esternebra menor	36,79 (90,91)	16,79 ^a (90,91)	17,09 ^a	22,48 ^a (75,00)	21,67 ^a (71,43)
5 ^a esternebra dividida	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	0,78 (8,33)	1,67 (14,29)
Forma irregular da 6 ^a esternebra	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)

Anexo 12: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos do esterno induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg)				
	0	250	300	400	500
<i>Fetos vivos (N)</i>	106	131	117	129	60
<i>Ninhadas (N)</i>	11	11	11	12	7
<i>Alterações (%):</i>					
1ª esternebra pobremente calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,10 (25,00)	0,00 (0,00)
2ª esternebra não calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
2ª esternebra pobremente calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,10 (25,00)	0,00 (0,00)
3ª esternebra pobremente calcificada	0,94 (9,09)	0,76 (9,09)	0,00 (0,00)	4,65 ^c (41,67) ^c	0,00 (0,00)
4ª esternebra não calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
4ª esternebra pobremente calcificada	5,66 (36,36)	9,16 (63,64)	14,53 ^a (72,73)	10,85 (66,67)	11,67 (42,86)
5ª esternebra não calcificada	0,94 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,65 (41,67) ^{bc}	0,00 (0,00)
5ª esternebra pobremente calcificada	31,13 (72,73)	35,11 (81,82)	38,46 (81,82)	34,11 (75,00)	20,00 ^{bc} (42,86)
6ª esternebra não calcificada	0,94 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,10 (25,00)	0,00 (0,00)
6ª esternebra pobremente calcificada	70,75 (100,00)	64,89 (100,00)	69,23 (100,00)	53,49 ^{ac} (91,67)	30,00 ^{abcd} (42,86) ^{abcd}
Todas as esternebbras pobremente calcificadas	2,83 (27,27)	5,34 (27,27)	13,68 ^{ab} (54,55)	33,33 ^{abc} (83,33) ^{ab}	56,67 ^{abcd} (71,43)

Anexo 13: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros anteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg)				
	0	250	300	400	500
<i>Fetos vivos (N)</i>	106	131	117	129	60
<i>Ninhadas (N)</i>	11	11	11	12	7
<i>Malformações (%):</i>					
Buraco no úmero	20,75 (81,82)	20,61 (81,82)	20,51 (90,91)	17,83 (83,33)	8,33 ^{ab} (42,86) ^c
Clavícula torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Constricção da clavícula	0,00 (0,00)	0,76 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Ausência do processo deltoide	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	10,00 ^{abcd} (57,14) ^{abcd}
Buraco no processo deltoide	66,98 (100,00)	72,52 (100,00)	66,67 (100,00)	66,67 (100,00)	73,33 (85,71)
Forma irregular do processo deltoide	11,32 (63,64)	16,79 (54,55)	20,51 (54,55)	10,85 (41,67)	1,67 ^{abcd} (14,29)
Processo deltoide menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,55 (16,67)	6,67 ^{abc} (28,57)
Falange proximal do 2º dedo menor	14,15 (63,64)	16,79 (81,82)	14,53 (63,64)	20,16 (75,00)	23,33 (71,43)
Falange proximal do 3º dedo menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	5,00 ^{abc} (28,57)
Falange proximal do 4º dedo menor	0,00 (0,00)	2,29 (18,18)	1,71 (18,18)	0,78 (8,33)	3,33 (14,29)
Fusão entre o 3º e 4º dedos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
Falange proximal do 5º dedo menor	34,91 (90,91)	25,19 (100,00)	27,35 (81,82)	41,86 ^{bc} (91,67)	11,67 ^{abcd} (57,14) ^b
5º Metacarpo menor	0,94 (9,09)	0,00 (0,00)	4,27 ^b (27,27)	12,40 ^{abc} (41,46) ^b	25,00 ^{abcd} (71,43) ^{ab}

Anexo 14: Tipos e frequências de alterações da ossificação de ossos dos membros anteriores, induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg)				
	0	250	300	400	500
<i>Fetos vivos (N)</i>	106	131	117	129	60
<i>Ninhadas (N)</i>	11	11	11	12	7
<i>Alterações (%):</i>					
Escápula pobremente calcificada	2,83 (18,18)	3,82 (27,27)	4,27 (27,27)	23,26 ^{abc}	65,00 ^{abcd}
Clavícula pobremente calcificada	2,83 (18,18)	3,82 (27,27)	4,27 (27,27)	23,26 ^{abc}	65,00 ^{abcd}
Úmero pobremente calcificado	1,89 (9,09)	3,82 (27,27)	4,27 (27,27)	23,26 ^{abc}	65,00 ^{abcd}
Ulna pobremente calcificada	1,89 (9,09)	3,82 (27,27)	4,27 (27,27)	24,03 ^{abc}	65,00 ^{abcd}
Osso rádio pobremente calcificado	1,89 (9,09)	3,82 (27,27)	4,27 (27,27)	24,03 ^{abc}	66,67 ^{abcd}
Metacarpos pobremente calcificados	0,00 (0,00)	4,58 ^a (27,27)	2,56 (9,09)	19,38 ^{abc}	31,67 ^{abc}
2º metacarpo pobremente calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	3,10 (25,00)	8,33 ^{abc} (42,86) ^{ab}
3º metacarpo pobremente calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	3,10 (25,00)	8,33 ^{abc} (42,86) ^{ab}
4º metacarpo pobremente calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	3,10 (25,00)	8,33 ^{abc} (42,86) ^{ab}
5º metacarpo pobremente calcificado	4,72 (36,36)	3,05 (27,27)	7,69 (45,45)	6,20 (33,33)	23,33 ^{abcd}
5º metacarpo não calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	1,67 (14,29)
Falanges proximais não calcificadas	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	3,10 (25,00)	0,00 (0,00)
Falange proximal do 2º dedo não calcificada	0,94 (9,09)	14,50 ^a (54,55)	17,95 ^a (81,82) ^a	9,30 ^a (58,33) ^a	28,33 ^{abd}
Falange proximal do 3º dedo não calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
Falange proximal do 4º dedo não calcificada	0,00 (0,00)	5,34 ^a (27,27)	0,85 (9,09)	1,55 (16,67)	0,00 (0,00)
Falange proximal do 5º dedo não calcificada	9,43 (72,73)	29,77 ^a (81,82)	29,91 ^a (90,91)	19,38 ^a (75,00)	40,00 ^{ad} (85,71)
Falanges proximais pobremente calcificadas	1,89 (18,18)	4,58 (27,27)	0,85 (9,09)	12,40 ^{abc}	11,67 ^{abc} (42,86)
Falange proximal do 2º dedo pobremente calcificada	66,98 (100,00)	56,49 (100,00)	49,57 ^a (90,91)	53,49 ^a (91,67)	41,67 ^a (71,43)
Falange proximal do 3º dedo pobremente calcificada	8,49 (54,55)	17,56 (81,82)	17,95 ^a (81,82)	20,93 ^a (75,00)	43,33 ^{abcd}
Falange proximal do 4º dedo pobremente calcificada	9,43 (54,55)	19,85 ^a (72,73)	17,95 (81,82)	20,16 ^a (75,00)	41,67 ^{abcd} (85,71)
Falange proximal do 5º dedo pobremente calcificada	81,13 (100,00)	56,49 ^a (100,00)	55,56 ^a (100,00)	60,47 ^a (91,67)	43,33 ^{ad} (85,71)

Anexo 15: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros posteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg)				
	0	250	300	400	500
<i>Fetos vivos (N)</i>	106	131	117	129	60
<i>Ninhadas (N)</i>	11	11	11	12	7
<i>Malformações (%):</i>					
Fusão do osso pubiano	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Osso pubiano mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Constricção do osso pubiano	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Fusão do osso ílio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ílio mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Ísquio torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	11,67 ^{abcd} (42,86) ^{abcd}
Fusão do ísquio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ísquio curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Ausência de tíbia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,88 ^b (25,00)	3,33 (28,57)
Tíbia torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
Fusão da tíbia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Tíbia mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,33 (16,67)	5,00 ^{abc} (28,57)
Constricção na tíbia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Fíbula torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
Fusão da fíbula	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Posição irregular da fíbula	0,00 (0,00)	0,76 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	11,67 ^{abcd} (28,57)

(Cont.) Anexo 15: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros posteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg)				
	0	250	300	400	500
<i>Malformações (%):</i>					
Fíbula mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Forma irregular do fêmur	0,00 (0,00)	0,76 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Fêmur mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Posição irregular do 1º dedo da pata traseira	0,00 (0,00)	3,05 (27,27)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Posição irregular do 2º dedo da pata da traseira	0,00 (0,00)	0,76 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
1º dedo da pata traseira mais longo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	1,67 (14,29)
Ausência do 1º dedo da pata traseira	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,10 (16,67)	5,00 ^{abc} (42,86) ^{abc}
1º dedo da pata traseira mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,55 (8,33)	1,67 (14,29)
Ausência do 2º dedo da pata traseira	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,55 (16,67)	0,00 (0,00)
2º dedo da pata traseira mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 5º dedo da pata traseira	0,00 (0,00)	6,11 (18,18)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
Falange proximal do 2º dedo menor	4,72 (18,18)	9,92 (45,45)	5,13 (36,36)	13,18 ^{ac} (50,00)	0,00 ^{bd} (0,00) ^d
Falange proximal do 3º dedo menor	0,00 (0,00)	6,87 ^a (45,45) ^a	1,71 (18,18)	7,75 ^{ac} (41,67) ^a	0,00 ^d (0,00)
Falange proximal do 4º dedo menor	0,94 (9,09)	4,58 (27,27)	0,85 (9,09)	6,20 ^{ac} (41,67)	0,00 (0,00)
Falange proximal do 5º dedo menor	4,72 (27,27)	6,87 (36,36)	1,71 (9,09)	5,43 (41,67)	0,00 (0,00)
1º metatarso menor	13,21 (45,45)	8,40 (27,27)	7,69 (36,36)	36,43 ^{abc} (91,67) ^{abc}	23,33 ^{bc} (57,14)
2º metatarso menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,67 (14,29)
2º metatarso mais estreito	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,78 (8,33)	0,00 (0,00)
Polidactilia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)

Anexo 16: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos dos membros posteriores, induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg)				
	0	250	300	400	500
<i>Fetos vivos (N)</i>	106	131	117	129	60
<i>Ninhadas (N)</i>	11	11	11	12	7
<i>Alterações (%):</i>					
Fíbula pobremente calcificada	8,49 (45,45)	19,08 ^a (72,73)	19,66 ^a (63,64)	47,29 ^{abc} (91,67) ^a	70,00 ^{abcd} (85,71)
Ílio pobremente calcificado	8,49 (45,45)	15,27 (72,73)	19,66 ^a (63,64)	47,29 ^{abc} (91,67) ^a	70,00 ^{abcd} (85,71)
Ísquio pobremente calcificado	8,49 (45,45)	15,27 (72,73)	19,66 ^a (63,64)	47,29 ^{abc} (91,67) ^a	70,00 ^{abcd} (85,71)
Púbis pobremente calcificado	8,49 (45,45)	15,27 (72,73)	19,66 ^a (63,64)	47,29 ^{abc} (91,67) ^a	70,00 ^{abcd} (85,71)
Fêmur pobremente calcificado	8,49 (45,45)	19,08 ^a (72,73)	19,66 ^a (63,64)	47,29 ^{abc} (91,67) ^a	70,00 ^{abcd} (85,71)
Tíbia pobremente calcificada	8,49 (45,45)	19,08 ^a (72,73)	19,66 ^a (63,64)	47,29 ^{abc} (91,67) ^a	70,00 ^{abcd} (85,71)
Metatarsos não calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	31,78 ^{abc} (75,00) ^{abc}	0,00 ^d (0,00) ^d
1º metatarso não calcificado	4,72 (45,45)	1,53 (18,18)	11,97 ^b (63,64)	13,95 ^{ab} (83,33) ^b	46,67 ^{abcd} (85,71) ^b
Metatarsos pobremente calcificados	1,89 (9,09)	22,14 ^a (72,73) ^a	6,84 ^b (45,45)	0,00 ^{bc} (0,00) ^{bc}	21,67 ^{acd} (71,43) ^{ad}
1º metatarso pobremente calcificado	27,36 (81,82)	8,40 ^a (36,36)	17,09 ^a (72,73)	25,58 ^{ab} (83,33) ^b	21,67 ^{ab} (71,43)
2º metatarso pobremente calcificado	3,77 (36,36)	0,76 (9,09)	8,55 ^b (54,55)	13,95 ^{ab} (58,33) ^b	51,67 ^{abcd} (85,71) ^b
3º metatarso pobremente calcificado	3,77 (36,36)	0,76 (9,09)	8,55 ^b (54,55)	13,95 ^{ab} (58,33) ^b	51,67 ^{abcd} (85,71) ^b
4º metatarso pobremente calcificado	3,77 (36,36)	0,76 (9,09)	8,55 ^b (54,55)	13,95 ^{ab} (58,33) ^b	51,67 ^{abcd} (85,71) ^b
5º metatarso pobremente calcificado	3,77 (36,36)	0,76 (9,09)	8,55 ^b (54,55)	13,95 ^{ab} (58,33) ^b	51,67 ^{abcd} (85,71) ^b

(Cont.) Anexo 16: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos dos membros posteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com HU, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE HU (mg/kg)				
	0	250	300	400	500
<i>Alterações (%):</i>					
Falanges proximais não calcificadas	6,60 (27,27)	13,74 (81,82) ^a	25,64 ^{ab} (81,82) ^a	35,66 ^{ab} (83,33) ^a	61,67 ^{abcd} (85,71) ^a
Falange proximal do 2º dedo não calcificada	15,09 (72,73)	25,95 (81,82)	24,79 (63,64)	23,26 (58,33)	8,33 ^{bcd} (42,86)
Falange proximal do 3º dedo não calcificada	0,94 (9,09)	2,29 (18,18)	7,69 ^a (54,55)	0,78 ^c (8,33) ^c	1,67 (14,29)
Falange proximal do 4º dedo não calcificada	0,00 (0,00)	1,53 (18,18)	0,00 (0,00)	1,55 (8,33)	1,67 (14,29)
Falange proximal do 5º dedo não calcificada	35,85 (100,00)	51,91 ^a (100,00)	40,17 (81,82)	44,96 (83,33)	13,33 ^{abcd} (42,86)
Falanges proximais pobremente calcificadas	6,60 (45,45)	6,87 (45,45)	2,56 (27,27)	1,55 (16,67)	0,00 ^a (0,00)
Falange proximal do 2º dedo pobremente calcificada	35,85 (81,82)	33,59 (90,91)	27,35 (81,82)	27,13 (91,67)	15,00 ^{ab} (42,86)
Falange proximal do 3º dedo pobremente calcificada	17,92 (81,82)	35,11 ^a (100,00)	24,79 (72,73)	34,11 ^a (75,00)	11,67 ^{bcd} (42,86)
Falange proximal do 4º dedo pobremente calcificada	18,87 (90,91)	35,11 ^a (100,00)	27,35 (81,82)	34,11 ^a (75,00)	11,67 ^{bcd} (42,86)
Falange proximal do 5º dedo pobremente calcificada	45,28 (90,91)	24,43 ^a (63,64)	24,79 ^a (72,73)	17,05 ^a (66,67)	20,00 ^a (28,57)

6-MERCAPTOPURINA (6-MP)

Anexo 17: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do crânio induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Malformações (%):</i>				
Fusão do osso zigomático com processo jugular do maxilar	4,31 (18,18)	2,52 (33,33)	6,86 (44,44)	14,15 ^{ab} (70,00) ^a
Fusão do processo jugular do escamoso com osso zigomático	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	8,49 ^{abc} (50,00) ^{ab}
Fusão do processo jugular do escamoso com processo jugular do maxilar e osso zigomático	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	14,15 ^{abc} (20,00)
Osso timpânico torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Processo jugular do maxilar torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	0,94 (10,00)
Forma irregular do osso interparietal	0,00 (0,00)	0,84 (11,11)	0,98 (11,11)	0,00 (0,00)
Forma irregular do osso supraoccipital	2,59 (18,18)	3,36 (33,33)	3,92 (33,33)	1,89 (20,00)
Forma irregular do osso exoccipital	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,90 ^{ab} (22,22)	43,40 ^{abc} (80,00) ^{abc}
Forma irregular do osso basoccipital	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,72 ^{ab} (18,18)
Forma irregular do osso timpânico	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,89 (10,00)
Forma irregular do osso escamoso	24,14 (90,91)	24,37 (100,00)	32,35 (100,00)	33,02 (90,00)
Forma irregular do osso zigomático	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,89 (10,00)
Forma irregular do osso premaxilar	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Assimetria do osso escamoso	10,34 (63,64)	11,76 (77,78)	8,82 (66,67)	3,77 ^b (40,00)
Osso nasal incompleto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	20,75 ^{abc} (30,00)
Osso frontal incompleto	6,03 (36,36)	60,50 ^a (77,78)	27,45 ^{ab} (55,56)	63,21 ^{ac} (70,00)
Osso parietal incompleto	3,45 (27,27)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	2,83 (20,00)
Osso interparietal incompleto	6,03 (45,45)	1,68 (22,22)	2,94 (22,22)	22,64 ^{abc} (50,00)
Osso supraoccipital incompleto	51,72 (81,82)	68,07 ^a (88,89)	75,49 ^a (100,00)	96,23 ^{abc} (100,00)
Osso exoccipital incompleto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	21,70 ^{abc} (40,00) ^a
Osso basoccipital incompleto	0,00 (0,00)	6,72 ^a (11,11)	0,00 ^b (0,00)	0,94 ^b (10,00)
Osso escamoso incompleto	0,86 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,66 ^{bc} (20,00)
Osso zigomático incompleto	0,86 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Processo jugular do maxilar incompleto	0,86 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Lâmina orbital do osso frontal incompleta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	0,94 (10,00)

(Cont.) Anexo 17: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do crânio induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg)			
	0	6	12	24
<i>Malformações (%):</i>				
Osso basoesfenoide incompleto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,96 (11,11)	2,83 (10,00)
Mandíbula incompleta	0,00 (0,00)	5,04 ^a (11,11)	0,00 ^b (0,00)	0,00 ^b (0,00)
Osso timpânico mais curto	0,00 (0,00)	1,68 (11,11)	0,00 (0,00)	8,49 ^{abc} (20,00)
Osso escamoso mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Mandíbula curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	28,30 ^{abc} (40,00) ^a
Osso interparietal menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	0,00 (0,00)
Osso presfenoide menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,77 ^b (30,00)
Fissura no osso interparietal	0,00 (0,00)	0,84 (11,11)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Fissura no osso basoccipital	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Fissura no osso escamoso	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Fissura no basoesfenoide	3,45 (27,27)	2,52 (22,22)	5,88 (44,44)	23,58 ^{abc} (60,00)
Ossificação adicional próxima ao osso frontal	0,86 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ossificação adicional próxima ao osso parietal	0,86 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ossificação adicional próxima ao osso interparietal	0,00 (0,00)	0,84 (11,11)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Distância maior entre os ossos frontais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,96 (11,11)	0,00 (0,00)
Ossos parietais mais distantes	4,31 (18,18)	55,46 ^a (77,78) ^a	59,80 ^a (88,89) ^a	92,45 ^{abc} (100,00) ^a
Distância maior entre os ossos palatinos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	12,26 ^{abc} (20,00)
Distância maior entre os ossos da mandíbula	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	29,41 ^{ab} (66,67) ^{ab}	82,08 ^{abc} (100,00) ^{ab}
Distância maior entre os ossos da mandíbula	0,86 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Buraco no osso supraoccipital	12,07 (54,55)	10,92 (55,56)	13,73 (66,67)	10,38 (40,00)
Buraco no osso supraoccipital	0,00 (0,00)	2,52 (22,22)	0,98 (11,11)	2,83 (30,00)
Buraco no osso basoccipital	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Buraco no osso escamoso	14,66 (90,91)	16,81 (88,89)	13,73 (77,78)	10,38 (70,00)
Buraco no osso palatino	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	0,00 (0,00)
Buraco no osso basoesfenoide	0,86 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Buraco na mandíbula	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)

Anexo 18: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos do crânio induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Alterações (%):</i>				
Osso supraoccipital esponjoso	0,86 (9,09)	12,61 ^a (44,44)	31,37 ^{ab} (88,89) ^a	72,64 ^{abc} (90,00) ^a
Osso exoccipital esponjoso	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,77 ^{abc} (30,00)
Osso basoccipital esponjoso	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,83 ^b (20,00)
Osso escamoso esponjoso	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (20,00)
Processo jugular do osso escamoso esponjoso	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Osso zigomático esponjoso	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,77 (10,00)
Osso basoesfenoide esponjoso	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,88 ^{ab} (11,11)	2,83 ^b (20,00)
Osso pterigoide esponjoso	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Mandíbula esponjosa	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Osso interparietal esponjoso	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	1,89 (10,00)
Osso nasal pobremente calcificado	0,86 (9,09)	6,72 ^a (33,33)	28,43 ^{ab} (44,44)	87,74 ^{abc} (90,00) ^{ab}
Osso frontal pobremente calcificado	0,86 (9,09)	6,72 ^a (33,33)	28,43 ^{ab} (44,44)	88,68 ^{abc} (90,00) ^{ab}
Osso parietal pobremente calcificado	1,72 (18,18)	7,56 (44,44)	33,33 ^{ab} (55,56)	88,68 ^{abc} (90,00) ^a
Osso interparietal pobremente calcificado	1,72 (18,18)	13,45 ^a (55,56)	29,41 ^{ab} (55,56)	85,85 ^{abc} (90,00) ^a
Osso supraoccipital pobremente calcificado	50,86 (81,82)	81,51 ^a (100,00)	95,10 ^{ab} (100,00)	97,17 ^{ab} (100,00)
Osso exoccipital pobremente calcificado	1,72 (18,18)	4,20 (44,44)	51,96 ^{ab} (88,89) ^a	89,62 ^{abc} (100,00) ^{ab}
Osso basoccipital pobremente calcificado	10,34 (36,36)	71,43 ^a (100,00) ^a	93,14 ^{ab} (100,00) ^a	93,40 ^{ab} (100,00) ^a

(Cont.) Anexo 18: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos do crânio induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg)			
	0	6	12	24
<i>Alterações (%):</i>				
Osso timpânico pobremente calcificado	3,45 (36,36)	7,56 (55,56)	11,76 ^a (44,44)	63,21 ^{abc} (80,00)
Osso hioide pobremente calcificado	1,72 (18,18)	12,61 ^a (33,33)	29,41 ^{ab} (44,44)	54,72 ^{abc} (60,00)
Osso escamoso pobremente calcificado	3,45 (27,27)	12,61 ^a (66,67)	48,04 ^{ab} (77,78)	82,08 ^{abc} (100,00) ^a
Processo jugular do osso escamoso pobremente calcificado	3,45 (27,27)	9,24 (55,56)	32,35 ^{ab} (55,56)	76,42 ^{abc} (90,00) ^a
Osso zigomático pobremente calcificado	3,45 (27,27)	9,24 (55,56)	30,39 ^{ab} (55,56)	79,25 ^{abc} (100,00) ^{abc}
Osso maxilar pobremente calcificado	2,59 (27,27)	7,56 (55,56)	22,55 ^{ab} (55,56)	76,42 ^{abc} (90,00) ^a
Processo jugular do maxilar pobremente calcificado	2,59 (27,27)	7,56 (55,56)	21,57 ^{ab} (55,56)	76,42 ^{abc} (80,00) ^a
Osso premaxilar pobremente calcificado	2,59 (27,27)	7,56 (55,56)	21,57 ^{ab} (55,56)	73,58 ^{abc} (80,00) ^a
Osso lacrimal pobremente calcificado	1,72 (18,18)	7,56 (55,56)	15,69 ^a (55,56)	71,70 ^{abc} (70,00)
Lâmina orbital do osso frontal pobremente calcificada	1,72 (18,18)	7,56 (55,56)	15,69 ^a (55,56)	71,70 ^{abc} (70,00)
Processo maxilar do osso palatino pobremente calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	1,89 (10,00)
Osso palatino pobremente calcificado	5,17 (36,36)	45,38 ^a (100,00) ^a	82,35 ^{ab} (100,00) ^a	98,11 ^{abc} (100,00) ^a
Osso presfenoide pobremente calcificado	1,72 (18,18)	0,00 (0,00)	5,88 ^b (22,22)	30,19 ^{abc} (60,00) ^b
Osso orbitoesfenoide pobremente calcificado	2,59 (18,18)	30,25 ^a (55,56)	54,90 ^{ab} (88,89) ^a	92,45 ^{abc} (100,00) ^{ab}
Osso basoesfenoide pobremente calcificado	6,03 (27,27)	47,90 ^a (100,00) ^a	90,20 ^{ab} (100,00) ^a	92,45 ^{ab} (100,00) ^a
Osso hamulus pobremente calcificado	6,03 (36,36)	41,18 ^a (77,78)	57,84 ^{ab} (55,56)	94,34 ^{abc} (90,00) ^a
Osso pterigóide pobremente calcificado	6,03 (36,36)	42,02 ^a (77,78)	88,24 ^{ab} (100,00) ^a	91,51 ^{ab} (100,00) ^a
Mandíbula pobremente calcificada	0,86 (9,09)	1,68 (11,11)	5,88 (33,33)	57,55 ^{abc} (70,00) ^{ab}

Anexo 19: Tipos e frequências de anomalias dos ossos da coluna vertebral induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Malformações (%):</i>				
Atlas torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Forma irregular do atlas	0,86 (9,09)	0,74 (11,11)	1,96 (22,22)	8,49 ^{ab} (50,00)
Atlas mais largo	0,86 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,66 ^{bc} (20,00)
Atlas mais estreito	0,86 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,83 (30,00)
Forma irregular do axis	24,14 (63,64)	42,02 ^a (100,00)	52,94 ^a (100,00)	76,42 ^{abc} (90,00)
Forma irregular de 1-2 arcos vertebrais cervicais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Ossificação incompleta de 1-7 arcos vertebrais cervicais	1,72 (9,09)	5,04 (22,22)	12,75 ^a (55,56)	92,45 ^{abc} (100,00) ^{abc}
Distância muito grande entre 1-2 arcos vertebrais cervicais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Distância muito pequena entre 1-2 arcos vertebrais cervicais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Constricção em 1-2 arcos vertebrais cervicais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,94 (22,22)	1,89 (20,00)
Interrupção do processo de fechamento de 1-6 corpos vertebrais cervicais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	9,80 ^{ab} (22,22)	4,72 ^{ab} (10,00)
1-2 corpos vertebrais cervicais divididos simetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,89 (20,00)
1-2 corpos vertebrais cervicais divididos assimetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,77 (20,00)
Centros de ossif. de 1-6 corpos vertebrais cervicais em forma de <i>dumb-bell</i>	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,83 (10,00)
1-2 corpos vertebrais torácicas	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
1-2 corpos vertebrais torácicos fundidos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,89 (20,00)
Interrupção do processo de fechamento de 1-6 corpos vertebrais torácicos	4,31 (27,27)	5,24 (22,22)	3,92 (44,44)	11,32 (70,00)

(Cont.) Anexo 19: Tipos e frequências de anomalias dos ossos da coluna vertebral induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg)			
	0	6	12	24
<i>Malformações (%):</i>				
Corpo de 1-2 vertebrae torácicas dividido assimetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,60 ^{abc} (40,00) ^a
Corpo de 1-2 vertebrae torácicas dividido simetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,60 ^{abc} (30,00)
Centros de ossif. de 1-6 corpos vertebrae torácicos em forma de <i>dumb-bell</i>	4,31 (36,36)	7,56 (33,33)	11,76 ^a (66,67)	37,74 ^{abc} (100,00) ^{ab}
1-2 corpos vertebrae torácicos desalinhados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Forma irregular de 1-2 arcos vertebrae torácicos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,72 ^{ab} (10,00)
Ossificação incompleta de 1-2 arcos vertebrae torácicos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,72 ^{ab} (10,00)
Interrupção do processo de fechamento de 1-6 corpos vertebrae lombares	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,72 ^{ab} (30,00)
1-2 corpos vertebrae lombares divididos assimetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Centros de ossif. de 1-6 corpos vertebrae lombares em forma de <i>dumb-bell</i>	0,86 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	16,98 ^{abc} (60,00) ^{abc}
1-2 corpos vertebrae lombares desalinhados	0,86 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Forma irregular de 1-2 arcos vertebrae sacrais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	0,94 (10,00)
1-2 corpos vertebrae sacrais fundidos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Interrupção do processo de fechamento de 1-6 corpos vertebrae sacrais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,89 (20,00)
Centros de ossif. de 1-2 corpos vertebrae sacrais em forma de <i>dumb-bell</i>	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,89 (20,00)
1-2 corpos vertebrae sacrais desalinhados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,89 (20,00)
1-2 arcos vertebrae caudais tortos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Interrupção do processo de fechamento de 1-2 corpos vertebrae caudais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	0,00 (0,00)

Anexo 20: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos da coluna vertebral induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no dia 11 de gestação.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Alterações (%):</i>				
1-7 corpos vertebrais cervicais não calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	26,42 ^{abc} (40,00) ^a
1-2 corpos vertebrais cervicais pobremente calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
1-2 arcos vertebrais cervicais pobremente calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Todas as 7 vértebras cervicais pobremente calcificadas	0,86 (9,09)	13,45 ^a (66,67) ^a	62,75 ^{ab} (88,89) ^a	93,40 ^{abc} (100,00) ^a
1-2 corpos vertebrais torácicos não calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
1-13 vértebras torácicas pobremente calcificadas	1,72 (18,18)	16,61 ^a (77,78)	67,65 ^{ab} (88,89)	92,45 ^{abc} (100,00)
1-6 vértebras lombares pobremente calcificadas	3,45 (27,27)	28,27 ^a (88,89)	77,45 ^{ab} (88,89)	97,17 ^{abc} (100,00)
1-4 corpos vertebrais sacrais não calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,83 (10,00)
1-4 vértebras sacrais não calcificadas	0,86 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	15,09 ^{abc} (50,00) ^{bc}
1-4 vértebras sacrais pobremente calcificadas	14,66 (63,64)	51,26 ^a (88,89)	80,39 ^{ab} (88,89)	96,23 ^{abc} (100,00)
1-2 corpos vertebrais sacrais pobremente calcificados	0,00 (0,00)	0,84 (11,11)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
1-2 vértebras caudais não calcificadas	12,07 (45,45)	30,25 ^a (100,00) ^a	49,02 ^{ab} (100,00) ^a	94,34 ^{abc} (100,00) ^a
1-2 vértebras caudais pobremente calcificadas	35,34 (63,64)	73,95 ^a (100,00)	77,45 ^a (88,89)	36,91 ^{bc} (90,00)
Todos os arcos vertebrais caudais não calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,96 (11,11)	0,94 (10,00)

Anexo 21: Tipos e frequências de anomalias da costela induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Malformações (%):</i>				
Ausência de 1-2 costelas	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
1-2 costelas menores	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Forma irregular de 1-2 costelas	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
1-2 costelas descontínuas	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
1-2 costelas onduladas	2,59 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
1-2 costelas extras na coluna torácica	0,86 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
1 a 13 costelas mais curtas	37,37 (90,91)	26,89 (88,89)	52,94 ^{ab} (100,00)	75,47 ^{abc} (100,00)
Costela extra rudimentar na coluna cervical	6,03 (18,18)	2,52 (22,22)	14,71 ^b (22,22)	5,66 ^c (10,00)
Costela extra rudimentar na coluna lombar	34,48 (90,91)	23,53 ^a (100,00)	26,47 ^a (77,78)	21,70 ^a (70,00)

Anexo 22: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do esterno induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no dia DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Malformações (%):</i>				
Forma irregular de todas as esternibras	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Esterno deslocado	8,62 (45,45)	15,96 (88,89) ^a	18,63 (88,89)	24,53 ^a (80,00)
Forma irregular da 1ª esternebra	0,86 (9,09)	1,68 (22,22)	6,86 ^a (44,44)	12,26 ^{ab} (40,00)
1ª esternebra menor	1,72 (18,18)	0,00 (0,00)	14,71 ^{ab} (55,56) ^b	34,91 ^{abc} (90,00) ^{ab}
Forma irregular da 2ª esternebra	13,79 (81,82)	10,92 (66,67)	31,37 ^{ab} (88,89)	21,70 ^b (90,00)
2ª esternebra menor	0,00 (0,00)	0,84 (11,11)	2,94 (33,33)	32,08 ^{abc} (90,00) ^{abc}
2ª esternebra dividida	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,83 (30,00)
Fusão entre 1ª e 2ª esternibras	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Forma irregular da 3ª esternebra	18,10 (90,91)	15,07 (77,78)	21,57 (88,89)	24,53 (100,00)
3ª esternebra menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,72 ^{ab} (30,00)
3ª esternebra dividida	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,72 ^{ab} (40,00) ^a
Forma irregular da 4ª esternebra	31,90 (100,00)	33,61 (77,78)	41,18 (88,89)	28,30 (100,00)
4ª esternebra menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	16,04 ^{abc} (80,00) ^{abc}
4ª esternebra dividida	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,77 ^b (30,00)
Forma irregular da 5ª esternebra	50,00 (100,00)	55,46 (100,00)	41,18 ^b (88,89)	3,77 ^{abc} (40,00) ^{ab}
Ausência da 5ª esternebra	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,72 ^{ab} (10,00)
5ª esternebra menor	34,48 (100,00)	33,61 (77,78)	42,16 (100,00)	17,92 ^{abc} (70,00)
5ª esternebra dividida	0,00 (0,00)	0,84 (12,50)	5,88 ^a (33,33)	0,94 (10,00)
Forma irregular da 6ª esternebra	3,45 (18,18)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,77 (20,00)
Bifurcação na 6ª esternebra	1,72 (18,18)	0,84 (11,11)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
6ª esternebra dividida	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)

Anexo 23: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos do esterno induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Alterações (%):</i>				
1ª esternebra não calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	10,38 ^{abc} (50,00) ^{abc}
1ª esternebra pobremente calcificada	0,86 (9,09)	0,00 (0,00)	4,90 ^b (22,22)	44,34 ^{abc} (80,00) ^{abc}
2ª esternebra não calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	8,49 ^{abc} (40,00) ^a
2ª esternebra pobremente calcificada	0,86 (9,09)	0,00 (0,00)	5,88 ^b (22,22)	42,45 ^{abc} (80,00) ^{abc}
3ª esternebra não calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	7,55 ^{abc} (20,00)
3ª esternebra pobremente calcificada	1,72 (18,18)	0,84 (11,11)	6,86 ^b (22,22)	46,23 ^{abc} (80,00) ^{abc}
4ª esternebra não calcificada	0,00 (0,00)	6,72 ^a (22,22)	0,00 ^b (0,00)	14,15 ^{ac} (40,00) ^a
4ª esternebra pobremente calcificada	5,17 (27,27)	12,61 (44,44)	15,69 ^a (44,44)	58,49 ^{abc} (80,00) ^a
5ª esternebra não calcificada	2,59 (18,18)	20,17 ^a (33,33)	7,84 ^b (33,33)	64,15 ^{abc} (100,00) ^{abc}
5ª esternebra pobremente calcificada	23,28 (45,45)	34,45 (44,44)	22,55 (44,44)	16,98 ^b (60,00)
6ª esternebra não calcificada	0,86 (9,09)	28,57 ^a (44,44)	4,90 ^b (22,22)	45,28 ^{abc} (70,00) ^a
6ª esternebra pobremente calcificada	40,52 (54,55)	46,22 (66,67)	45,10 (77,78)	32,08 ^b (60,00)
Todas as esternebbras não calcificadas	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,89 (20,00)
Todas as esternebbras pobremente calcificadas	0,00 (0,00)	2,52 (33,33)	12,75 ^{ab} (55,56) ^a	12,26 ^{ab} (60,00) ^a

Anexo 24: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros anteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Malformações (%):</i>				
Buraco na clavícula	0,00 (0,00)	0,84 (11,11)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Buraco na escápula	0,00 (0,00)	0,84 (11,11)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Forma irregular da escápula	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,83 (10,00)
Escápula menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Buraco no úmero	31,03 (90,91)	31,93 (100,00)	32,35 (100,00)	16,04 ^{abc} (50,00) ^{bc}
Osso úmero mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	15,09 ^{abc} (40,00) ^a
Osso úmero torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Forma irregular do úmero	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,89 (10,00)
Buraco no osso rádio	0,00 (0,00)	0,84 (11,11)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Osso rádio torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	11,32 ^{abc} (30,00)
Osso rádio mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	19,81 ^{abc} (30,00)
Ausência da ulna	0,00 (0,00)	0,84 (11,11)	0,00 (0,00)	5,66 ^a (20,00)
Buraco na ulna	0,00 (0,00)	0,84 (11,11)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ulna mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	18,87 ^{abc} (40,00) ^a
Ulna torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,72 ^{ab} (20,00)

(Cont.) Anexo 24: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros anteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg)			
	0	6	12	24
<i>Malformações (%):</i>				
Ausência do processo deltoide	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,66 ^{abc} (20,00)
Buraco no processo deltoide	57,76 (81,82)	63,03 (100,00)	62,75 (100,00)	49,06 ^b (80,00)
Forma irregular do processo deltoide	6,90 (54,55)	27,73 ^a (100,00) ^a	17,65 ^b (66,67)	7,55 ^b (50,00) ^b
Processo deltoide incompleto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Processo deltoide menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	0,00 (0,00)
Falange proximal do 2º dedo menor	22,69 (63,64)	28,57 (88,89)	15,69 ^b (66,67)	9,43 ^{ab} (50,00)
Ausência do 1º dedo (direito)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Ausência do 3º dedo (direito)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,89 (20,00)
Falange proximal do 3º dedo menor	3,45 (18,18)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	13,21 ^{abc} (40,00)
Ausência do 4º dedo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,83 (20,00)
Falange proximal do 4º dedo menor	5,04 (36,36)	0,00 ^a (0,00)	0,00 ^a (0,00)	5,66 ^{bc} (30,00)
Fusão entre 3º e 4º dedos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,60 ^{abc} (20,00)
Falange proximal do 5º dedo menor	12,93 (72,73)	36,13 ^a (100,00)	18,63 ^b (66,67)	13,21 ^b (60,00)
3º Metacarpo menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,89 (10,00)
4º Metacarpo menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
4º Metacarpo mais largo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
5º Metacarpo menor	0,00 (0,00)	2,52 (11,11)	5,88 ^a (44,44) ^a	26,42 ^{abc} (80,00) ^{ab}
Polidactilia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	0,00 (0,00)

Anexo 25: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos dos membros anteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Alterações (%):</i>				
Ulna não calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Ulna pobremente calcificada	2,59 (18,18)	2,52 (11,11)	13,73 ^{ab} (33,33)	83,96 ^{abc} (100,00) ^{abc}
Clavícula pobremente calcificada	0,86 (9,09)	2,52 (11,11)	6,86 ^a (22,22)	72,64 ^{abc} (90,00) ^{abc}
Escápula pobremente calcificada	0,86 (9,09)	2,52 (11,11)	13,73 ^{ab} (33,33)	81,13 ^{abc} (100,00) ^{abc}
Úmero pobremente calcificado	0,86 (9,09)	2,52 (11,11)	13,73 ^{ab} (33,33)	81,13 ^{abc} (100,00) ^{abc}
Oso rádio pobremente calcificado	2,59 (18,18)	2,52 (11,11)	13,73 ^{ab} (33,33)	81,13 ^{abc} (100,00) ^{abc}
Processo deltoide pobremente calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Metacarpos pobremente calcificados	1,72 (9,09)	11,76 ^a (22,22)	5,88 (33,33)	13,21 ^a (30,00)
2º metacarpo pobremente calcificado	0,86 (9,09)	1,68 (11,11)	0,98 (11,11)	24,53 ^{abc} (50,00)
3º metacarpo pobremente calcificado	0,86 (9,09)	1,68 (11,11)	0,98 (11,11)	25,47 ^{abc} (50,00)
4º metacarpo pobremente calcificado	0,86 (18,18)	1,68 (11,11)	0,98 (11,11)	25,47 ^{abc} (50,00)
5º metacarpo pobremente calcificado	4,31 (18,18)	0,84 (11,11)	6,86 ^b (55,56)	30,19 ^{abc} (80,00) ^{ab}
5º metacarpo não calcificado	0,86 (9,09)	0,00 (0,00)	2,94 (11,11)	31,13 ^{abc} (90,00) ^{abc}

(Cont.) Anexo 25: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos dos membros anteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg)			
	0	6	12	24
<i>Alterações (%):</i>				
Falanges proximais não calcificadas	3,45 (27,27)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	25,47 ^{abc} (80,00) ^{abc}
Falange proximal do 1º dedo não calcificada	0,00 (0,00)	4,20 (11,11)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Falange proximal do 2º dedo não calcificada	20,69 (54,55)	6,72 ^a (55,56)	13,73 (66,67)	62,26 ^{abc} (100,00) ^{ab}
Falange proximal do 3º dedo não calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,83 (20,00)
Falange proximal do 4º dedo não calcificada	6,03 (27,27)	0,00 ^a (0,00)	0,00 ^a (0,00)	7,55 ^{bc} (30,00)
Falange proximal do 5º dedo não calcificada	50,00 (81,82)	25,21 ^a (77,78)	17,65 ^a (66,67)	64,15 ^{abc} (100,00)
Falanges proximais pobremente calcificadas	1,72 (9,09)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	0,00 (0,00)
Falange proximal do 2º dedo pobremente calcificada	50,86 (100,00)	65,55 ^a (100,00)	32,35 ^{ab} (77,78)	16,98 ^{abc} (60,00) ^a
Falange proximal do 3º dedo pobremente calcificada	23,28 (72,73)	3,36 ^a (44,44)	8,82 ^a (44,44)	48,11 ^{abc} (80,00)
Falange proximal do 4º dedo pobremente calcificada	35,34 (100,00)	2,52 ^a (33,33) ^a	8,82 ^a (44,44) ^a	42,45 ^{bc} (80,00)
Falange proximal do 5º dedo pobremente calcificada	37,07 (100,00)	61,34 ^a (100,00)	43,14 ^b (66,67)	18,87 ^{abc} (60,00) ^a

Anexo 26: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros posteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Malformações (%):</i>				
Ausência osso pubiano	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,72 ^{ab} (10,00)
Forma irregular do osso pubiano	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,77 ^b (20,00)
Osso pubiano mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,83 (10,00)
Osso pubiano menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Ausência de ílio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,83 (10,00)
Forma irregular do ílio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	14,15 ^{abc} (30,00)
Ílio mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,60 ^{abc} (10,00)
Ílio menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,89 (20,00)
Buraco no ílio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	0,00 (0,00)
Forma irregular do ísquio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,77 ^b (10,00)
Ísquio menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Ausência de tíbia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	27,36 ^{abc} (50,00) ^{ab}
Tíbia torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,72 ^{ab} (30,00)
Tíbia mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	16,04 ^{abc} (80,00) ^{abc}
Constricção na tíbia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,83 (20,00)
Ausência de fíbula	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	12,26 ^{abc} (30,00)
Fíbula torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,60 ^{abc} (30,00)

(Cont.) Anexo 26: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros posteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg)			
	0	6	12	24
<i>Malformações (%):</i>				
Fíbula mais longa	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Fíbula mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Ausência de fêmur	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	22,64 ^{abc} (40,00) ^a
Fêmur mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	23,58 ^{abc} (70,00) ^{abc}
Constricção no fêmur	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,60 ^{abc} (20,00)
Ausência do 1º dedo da pata traseira	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	10,38 ^{abc} (50,00) ^{abc}
Posição irregular do 1º dedo da pata traseira	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,96 (11,11)	4,72 ^{ab} (30,00)
1º dedo da pata traseira mais longo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,92 (11,11)	34,91 ^{abc} (90,00) ^{abc}
1º dedo da pata traseira mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	12,26 ^{abc} (40,00) ^a
Ausência do 2º dedo da pata traseira	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Posição irregular do 2º dedo da pata da traseira	0,86 (9,09)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	0,94 (10,00)
Fusão entre o 1º e 2º dedos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,60 ^{abc} (40,00) ^a
Posição irregular do 5º dedo da pata traseira	0,00 (0,00)	1,68 (11,11)	0,98 (11,11)	0,00 (0,00)
Ausência da falange distal do 2º dedo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Falange distal do 2º dedo menor	4,31 (27,27)	1,68 (11,11)	0,98 (11,11)	0,94 (10,00)
Falange distal do 3º dedo menor	3,45 (27,27)	8,40 ^a (33,33)	0,00 ^b (0,00)	1,89 ^b (20,00)
Falange distal do 4º dedo menor	1,72 (9,09)	9,24 ^a (33,33)	1,96 ^b (22,22)	1,89 ^b (20,00)
Falange distal do 5º dedo menor	1,72 (18,18)	1,68 (11,11)	1,96 (22,22)	0,00 (0,00)
Ausência do 1º metatarso	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
1º metatarso menor	6,03 (36,36)	23,53 ^a (44,44)	15,69 ^a (44,44)	12,26 ^b (60,00)
5º metatarso menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
Polidactilia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	10,78 ^{ab} (22,22)	28,30 ^{abc} (100,00) ^{abc}

Anexo 27: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos dos membros posteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg)			
	0	6	12	24
<i>Fetos vivos (N)</i>	116	119	102	106
<i>Ninhadas (N)</i>	11	9	9	10
<i>Alterações (%):</i>				
Ílio pobremente calcificado	5,17 (36,36)	56,30 ^a (100,00) ^a	75,49 ^{ab} (77,78)	93,40 ^{abc} (100,00) ^a
Ísquio pobremente calcificado	5,17 (36,36)	56,30 ^a (100,00) ^a	75,49 ^{ab} (77,78)	96,23 ^{abc} (100,00) ^a
Pubis pobremente calcificado	5,17 (36,36)	56,30 ^a (100,00) ^a	75,49 ^{ab} (77,78)	90,57 ^{abc} (100,00) ^a
Fêmur pobremente calcificado	5,17 (36,36)	56,30 ^a (100,00) ^a	75,49 ^{ab} (77,78)	80,19 ^{ab} (100,00) ^a
Fíbula pobremente calcificada	5,17 (36,36)	56,30 ^a (100,00) ^a	75,49 ^{ab} (77,78)	81,13 ^{ab} (90,00) ^a
Tíbia pobremente calcificado	5,17 (36,36)	56,30 ^a (100,00) ^a	75,49 ^{ab} (77,78)	76,42 ^{ab} (100,00) ^a
Metatarsos não calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,77 ^b (10,00)
1° metatarso não calcificado	3,45 (18,18)	10,08 (33,33)	25,49 ^{ab} (77,78) ^a	52,83 ^{abc} (100,00) ^{ab}
2° metatarso não calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
4° metatarso não calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,94 (10,00)
5° metatarso não calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,83 (30,00)

(Cont.) Anexo 27: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos dos membros posteriores induzidas pelo tratamento de ratas grávidas com 6-MP, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	DOSES DE 6-MP (mg/kg)			
	0	6	12	24
<i>Alterações (%):</i>				
Metatarsos pobremente calcificados	4,31 (27,27)	31,09 ^a (66,67)	7,84 ^b (22,22)	21,70 ^{ac} (60,00)
1º metatarso pobremente calcificado	20,69 (63,64)	21,85 (77,78)	35,29 ^{ab} (66,67)	5,66 ^{abc} (40,00)
2º metatarso pobremente calcificado	2,59 (18,18)	11,76 ^a (55,56)	19,61 ^a (55,56)	35,85 ^{abc} (60,00)
3º metatarso pobremente calcificado	3,45 (18,18)	11,76 ^a (55,56)	19,61 ^a (55,56)	35,85 ^{abc} (60,00)
4º metatarso pobremente calcificado	3,45 (18,18)	11,76 ^a (55,56)	19,61 ^a (55,56)	35,85 ^{abc} (60,00)
5º metatarso pobremente calcificado	2,59 (18,18)	11,76 ^a (55,56)	16,67 ^a (55,56)	36,79 ^{abc} (70,00)
Falanges proximais não calcificadas	25,00 (63,04)	19,33 (77,78)	28,43 (77,78)	87,74 ^{abc} (100,00)
Falange proximal do 1º dedo não calcificada	7,76 (18,18)	0,00 ^a (0,00)	6,86 ^b (11,11)	0,00 ^{ac} (0,00)
Falange proximal do 2º dedo não calcificada	34,48 (81,82)	26,89 (88,89)	15,69 ^a (66,67)	0,94 ^{abc} (10,00) ^{abc}
Falange proximal do 3º dedo não calcificada	3,45 (18,18)	5,04 (33,33)	4,90 (44,44)	0,00 ^{bc} (0,00) ^c
Falange proximal do 4º dedo não calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	0,00 (0,00)
Falange proximal do 5º dedo não calcificada	49,14 (90,91)	61,34 (100,00)	38,24 ^b (77,78)	1,89 ^{abc} (20,00) ^{abc}
Falange proximal do 6º dedo não calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,96 (11,11)	0,00 (0,00)
Falanges proximais pobremente calcificadas	6,90 (45,45)	15,97 ^a (55,56)	14,71 (66,67)	0,00 ^{abc} (0,00) ^{abc}
Falange proximal do 1º dedo pobremente calcificada	0,00 (0,00)	0,84 (11,11)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Falange proximal do 2º dedo pobremente calcificada	28,45 (100,00)	38,66 (100,00)	25,49 ^b (66,67)	0,94 ^{abc} (10,00) ^{abc}
Falange proximal do 3º dedo pobremente calcificada	34,48 (81,82)	57,14 ^a (100,00)	28,43 ^b (66,67)	1,89 ^{abc} (20,00) ^{ab}
Falange proximal do 4º dedo pobremente calcificada	34,48 (81,82)	59,66 ^a (88,89)	31,37 ^b (66,67)	1,89 ^{abc} (20,00) ^{ab}
Falange proximal do 5º dedo pobremente calcificada	10,34 (54,55)	7,56 (55,56)	11,76 (55,56)	0,00 ^{abc} (0,00) ^{abc}

PARTE II

**ESTUDO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CONCOMITANTE E SEQUENCIAL DA
HU E 6-MP SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE RATOS**

EXPOSIÇÃO CONCOMITANTE DE HU E 6-MP

Anexo 28: Ganho de peso materno e dados de cesariana de ratas tratadas concomitantemente com HU (250 mg/kg) e 6-MP (24 mg/kg), no DG11, nos horários de 11:00, 13:00 e 15:00 hs.

PARÂMETROS AVALIADOS	NADA	11:00 hs			13:00 hs			15:00 hs		
		HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fêmeas grávidas (N)</i>	17	14	10	11	6	10	8	4	10	10
<i>Sítios de implantação (N)</i>	188	171	113	133	72	123	95	49	121	107
Por ninhada	11,00 (3,00)	12,50 (4,00)	12,00 (3,25)	12,00 (4,00)	11,50 (4,75)	12,00 (2,50)	11,50 (3,00)	12,50 (5,25)	12,50 (2,25)	11,00 (2,50)
<i>Reabsorções (N)</i>	11	12	18	14	8	16	11	2	14	16
Por sítios de implantação (%)	5,85	7,02	15,93	10,53	11,11	13,01	11,58	4,08	11,57	14,95
Por implantação por ninhada (%)	7,69 (9,55)	0,00 (15,32)	14,84 (18,94)	10,00 (7,15)	10,80 (8,18)	4,17 (22,50)	7,14 (13,00)	3,34 (7,02)	8,01 (17,79)	11,69 (25,45)
<i>Peso do útero gravídico (g)</i>	74,95 ± 14,58	76,70 ± 11,71	35,12 ± 11,75	41,28 ± 9,57	63,90 ± 17,25	36,96 ± 12,71	43,02 ± 10,86	81,40 ± 17,72	38,21 ± 3,41	41,57 ± 20,51
<i>Ganho de peso materno (Δg)</i>										
Dia 11-0	50,46 ± 19,06	44,47 ± 10,59	42,20 ± 6,44	43,16 ± 6,47	39,20 ± 7,95	47,60 ± 11,35	44,69 ± 7,70	46,95 ± 3,36	43,86 ± 8,96	43,11 ± 4,34
Dia 12-11	2,99 ± 5,12	1,85 ± 5,22	-3,39 ± 2,63	-3,31 ± 2,65	2,26 ± 4,57	-6,72 ± 4,65	-7,93 ± 7,55	4,62 ± 1,91	-5,25 ± 4,37	-4,43 ± 4,37
Dia 13-11	9,81 ± 4,67	6,81 ± 4,81	4,51 ± 4,23	4,96 ± 3,60	9,62 ± 4,78	5,43 ± 6,82	5,07 ± 4,00	10,55 ± 2,82	4,45 ± 4,16	4,43 ± 5,40
Dia 15-11	18,46 ± 5,91	16,39 ± 5,94	13,31 ± 4,86	12,14 ± 4,48	13,95 ± 3,83	13,84 ± 3,00	14,97 ± 4,10	17,33 ± 2,92	12,92 ± 5,46	11,38 ± 4,41
Dia 21-11	82,54 ± 16,22	80,40 ± 20,07	47,98 ± 13,67	50,62 ± 10,55	78,04 ± 8,72	51,06 ± 11,95	57,54 ± 8,40	90,93 ± 12,88	42,06 ± 18,85	54,24 ± 23,72
Dia 21-0	133,00 ± 23,68	121,57 ± 33,94	90,17 ± 14,97	93,78 ± 14,69	117,23 ± 13,59	98,66 ± 19,99	102,24 ± 14,20	137,88 ± 13,33	84,15 ± 25,86	96,29 ± 29,10
Dia 21-0 - (peso do útero)	58,05 ± 20,04	50,60 ± 11,82	55,45 ± 6,26	52,67 ± 11,63	53,34 ± 14,26	61,70 ± 9,31	59,21 ± 11,87	56,48 ± 7,55	47,06 ± 22,66	54,72 ± 17,52
<i>Fetos mortos (N)</i>	0	0	7	11	0	6	5	0	18	2
Por sítios de implantação (%)	0,00	0,00	6,19	8,27	0,00	4,88	5,26	0,00	14,88	1,87
Por ninhada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (1,25)	1,00 (2,00)	0,00 (0,00)	0,00 (1,00)	0,00 (1,00)	0,00 (0,00)	1,50 (2,25)	0,00 (0,25)
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	159	88	108	64	101	79	47	89	89
Por sítios de implantação (%)	94,15	92,98	77,88	81,20	88,89	82,11	83,16	95,92	73,55	83,18
Por ninhada	11,00 (3,00)	11,50 (3,25)	9,50 (3,00)	9,00 (5,00)	11,00 (3,00)	10,00 (5,25)	10,00 (5,00)	12,00 (4,25)	9,00 (2,25)	10,00 (5,50)
<i>Fetos malformados (%)</i>	8,47	5,03	77,27	31,48	0,00	85,15	31,65	0,00	67,42	30,34
<i>Peso fetal (g)</i>										
Individual	4,97 ± 0,38	4,78 ± 0,41	2,43 ± 0,50	2,64 ± 0,53	4,49 ± 0,28	2,20 ± 0,40	2,74 ± 0,38	4,73 ± 0,47	2,32 ± 0,43	3,20 ± 0,71
Por ninhada (média ± d.p.)	5,00 ± 0,24	4,79 ± 0,28	2,46 ± 0,44	2,61 ± 0,41	4,49 ± 0,11	2,24 ± 0,30	2,71 ± 0,22	4,71 ± 0,25	2,38 ± 0,39	3,10 ± 0,67
<i>Peso das placentas (g)</i>										
Individual	0,49 ± 0,08	0,44 ± 0,07	0,17 ± 0,03	0,17 ± 0,04	0,39 ± 0,04	0,17 ± 0,03	0,19 ± 0,03	0,48 ± 0,06	0,17 ± 0,05	0,20 ± 0,04
Por ninhada (média ± d.p.)	0,50 ± 0,05	0,44 ± 0,05	0,18 ± 0,03	0,17 ± 0,02	0,39 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,47 ± 0,04	0,17 ± 0,04	0,20 ± 0,04
<i>Peso placenta/peso fetal (%)</i>										
Individual	9,98 ± 1,61	9,14 ± 1,45	7,31 ± 1,83	6,58 ± 1,35	8,71 ± 0,96	7,72 ± 1,49	6,83 ± 1,11	10,10 ± 1,40	7,36 ± 1,73	6,46 ± 1,48
Por ninhada (média ± d.p.)	10,36 ± 1,18	9,09 ± 0,64	7,30 ± 1,08	6,75 ± 0,77	8,69 ± 0,50	7,85 ± 0,84	6,97 ± 0,81	10,12 ± 0,89	7,40 ± 1,29	6,72 ± 1,38

Anexo 29: Tipos e frequências de anomalias fetais visíveis ao exame externo induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11, nos horários de 11:00, 13:00 e 15:00 hs.

PARÂMETROS AVALIADOS	NADA	11:00 hs			13:00 hs			15:00 hs		
		HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>	177	159	88	108	64	101	79	47	89	89
<i>Ninhadas</i>	17	14	9	11	6	10	8	4	10	9
<i>Malformações (%)</i>										
Posição irregular PTE e/ou PTD	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	4,55 (22,22)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	5,94 (40,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,74 (40,00)	1,19 (11,11)
Posição irregular PDE e/ou PDD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	8,99 (20,00)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 1º dedo PTE e/ou PTDPTD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 2º dedo PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,63 (7,14)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 3º dedo PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,14 (11,11)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 4º dedo PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,63 (7,14)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 5º dedo PTE e/ou PTD	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,97 (30,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Polidactilia PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	26,14 (66,67)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	31,68 (90,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	21,35 (70,00)	8,99 (44,44)
Sindactilia PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Sindactilia PDE e/ou PDD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,97 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (10,00)	0,00 (0,00)
1º dedo da PTE e/ou PTD maior	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	7,95 (33,33)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	5,94 (30,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,74 (30,00)	0,00 (0,00)
Ausência de 1 ou mais dedos PTE e/ou PTD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ausência de 1 ou mais dedos PDE e/ou PDD	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,96 (20,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (10,00)	0,00 (0,00)
Cauda curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,95 (30,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (10,00)	0,00 (0,00)
Cauda encrespada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,41 (22,22)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,95 (40,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,49 (30,00)	0,00 (0,00)
Cauda curta e encrespada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,68 (22,22)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	9,90 (40,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	8,99 (30,00)	1,19 (11,11)
Cauda curta com ponta curva	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,82 (33,33)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,93 (50,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,49 (30,00)	0,00 (0,00)
Cauda com ponta curva	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,41 (22,22)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,97 (20,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,62 (30,00)	0,00 (0,00)
Cauda curta, encrespada, com ponta curva	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ponta de cauda	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,25 (10,00)	0,00 (0,00)
Forma irregular da orelha direita	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,19 (11,11)
Protusão da língua	0,00 (0,00)	4,40 (21,43)	71,59 (100,00)	29,63 (81,82)	0,00 (0,00)	77,23 (100,00)	31,65 (62,50)	0,00 (0,00)	57,30 (90,00)	23,81 (55,56)
Micrognatia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	5,94 (30,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)

Anexo 30: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do esqueleto axial induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11, nos horários de 11:00, 13:00 e 15:00 hs.

CRÂNIO	NADA	11:00 hs			13:00 hs			15:00 hs		
PARÂMETROS AVALIADOS		HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>		177	159	88	108	64	101	79	47	89
<i>Ninhadas</i>	17	14	9	11	6	10	8	4	10	9
<i>Malformações (%)</i>										
Osso zigom. + proc. jug. max.	0,56 (5,88)	7,55 (57,14)	31,82 (77,78)	12,04 (63,64)	0,00 (0,00)	29,70 (80,00)	11,39 (75,00)	6,38 (50,00)	26,97 (80,00)	19,10 (77,78)
Osso timpânico torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,85 (18,18)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Osso zigomático torto	0,00 (0,00)	0,63 (7,14)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ausência do osso gonial	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,78 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Forma irreg. do interparietal	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,56 (16,67)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (11,11)
Forma irreg. do supraoccipital	1,69 (11,76)	13,84 (64,29)	0,00 (0,00)	14,81 (63,64)	25,00 (66,67)	3,96 (30,00)	27,85 (75,00)	8,51 (75,00)	12,36 (50,00)	14,61 (55,56)
Forma irreg. do exooccipital	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	7,81 (33,33)	1,98 (20,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Forma irreg. do basooccipital	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,85 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Forma irreg. do timpânico	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Forma irreg. do escamoso	29,94 (94,12)	22,64 (78,57)	17,05 (77,78)	17,59 (72,73)	20,31 (83,33)	23,76 (90,00)	20,25 (87,50)	23,40 (100,00)	16,85 (80,00)	24,72 (88,89)
Forma irreg. do zigomático	0,00 (0,00)	1,89 (14,29)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	1,98 (20,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (10,00)	0,00 (0,00)
Forma irreg. do presfenoide	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Forma irreg. do basoesfenoide	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Assimetria do escamoso	5,65 (35,29)	5,66 (42,86)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	6,25 (50,00)	0,00 (0,00)	1,27 (12,50)	4,26 (25,00)	1,12 (10,00)	0,00 (0,00)
Osso nasal incompleto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	69,32(100,00)	52,78 (100,00)	0,00 (0,00)	77,23(100,00)	67,09 (100,00)	0,00 (0,00)	53,93 (100,00)	24,72 (88,89)
Osso frontal incompleto	2,26 (11,76)	0,63 (7,14)	96,59(100,00)	92,59 (100,00)	4,69 (33,33)	90,10 (100,00)	94,94 (100,00)	6,38 (50,00)	77,53 (100,00)	55,06(88,89)
Osso parietal incompleto	8,47 (47,06)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,95 (10,00)	0,00 (0,00)	2,13 (25,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Osso interparietal incompleto	8,47 (47,06)	2,52 (14,29)	1,14 (11,11)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	6,93 (40,00)	5,06 (37,50)	6,38 (50,00)	2,25 (10,00)	0,00 (0,00)
Osso supraoccipital incompleto	80,79 (100,00)	53,46 (100,00)	89,77(100,00)	97,22 (100,00)	79,69(100,00)	90,10 (100,00)	97,47 (100,00)	74,47 (100,00)	96,63 (100,00)	89,89 (100,00)
Osso exooccipital incompleto	0,00 (0,00)	3,14 (28,57)	45,45 (88,89)	57,41 (100,00)	3,13 (33,33)	66,34 (100,00)	59,49 (100,00)	4,26 (50,00)	73,03 (100,00)	35,96 (88,89)
Osso timpânico incompleto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,41 (11,11)	1,85 (9,09)	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Osso escamoso incompleto	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	1,27 (12,50)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Osso zigomático incompleto	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)

(Cont.) Anexo 30: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do esqueleto axial induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11, nos horários de 11:00, 13:00 e 15:00 hs.

CRÂNIO	NADA	11:00 hs			13:00 hs			15:00 hs		
PARÂMETROS AVALIADOS		HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>	177	159	88	108	64	101	79	47	89	89
<i>Ninhadas</i>	17	14	9	11	6	10	8	4	10	9
<i>Malformações (%)</i>										
Proc. Jug. maxilar incompleto	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,56 (5,88)	2,13 (25,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Osso basoesfenoide incompleto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (10,00)	0,00 (0,00)
Mandíbula incompleta	2,26 (17,65)	40,25 (85,71)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	57,81 (83,33)	0,99 (10,00)	2,26 (17,65)	91,49 (100,00)	1,12 (10,00)	3,37 (22,22)
Osso timpânico mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	10,23 (55,56)	15,74 (72,73)	0,00 (0,00)	3,96 (20,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Osso gonialo mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Mandíbula curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	5,94 (30,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Osso timpânico menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Osso gonialo menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Osso hyoide menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Osso presfenoide menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Osso pterigoide menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Osso zigomático mais largo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,14 (11,11)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Fissura nos ossos palatinos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Fissura no basoesfenoide	2,26 (23,53)	1,26 (14,29)	27,27 (88,89)	30,56 (100,00)	6,25 (50,00)	23,76 (80,00)	2,26 (23,53)	2,13 (25,00)	15,73 (70,00)	12,36 (55,56)
Ossific. adicional próxima ao nasal	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ossific. adicional próxima ao parietal	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ossific. adicional próxima ao interparietal	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	1,56 (16,67)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,13 (25,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ossific. adicional próxima ao escamoso	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,56 (16,67)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ossos nasais mais distantes	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ossos parietais mais distantes	0,56 (5,88)	0,63 (7,14)	93,18 (100,00)	92,59 (100,00)	6,25 (50,00)	78,22 (90,00)	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	83,15 (100,00)	1,12 (11,11)
Proc. maxilar do palatino incompleto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (11,11)
Distância maior entre ossos palatinos	0,00 (0,00)	0,63 (7,14)	15,91 (55,56)	12,04 (45,45)	0,00 (0,00)	2,97 (20,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	42,70 (70,00)	5,62 (22,22)
Distância maior entre ossos mandíbula	0,00 (0,00)	11,32 (42,86)	79,55 (100,00)	68,52 (100,00)	0,00 (0,00)	73,27 (100,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	83,15 (100,00)	26,97 (66,67)

(Cont.) Anexo 30: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do esqueleto axial induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11, nos horários de 11:00, 13:00 e 15:00 hs.

CRÂNIO	NADA	11:00 hs			13:00 hs			15:00 hs		
PARÂMETROS AVALIADOS		HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>	177	159	88	108	64	101	79	47	89	89
<i>Ninhadas</i>	17	14	9	11	6	10	8	4	10	9
<i>Malformações (%)</i>										
Buraco no osso nasal	0,00 (0,00)	0,63 (7,14)	1,14 (11,11)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Buraco no osso interparietal	0,00 (0,00)	1,26 (7,14)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Buraco no osso supraoccipital	0,56 (5,88)	6,29 (42,86)	3,41 (22,22)	9,26 (45,45)	15,63 (83,33)	0,99 (10,00)	0,56 (5,88)	12,77 (50,00)	7,87 (40,00)	26,97 (55,56)
Buraco no osso timpânico	2,82 (23,53)	2,52 (28,57)	3,41 (22,22)	0,93 (9,09)	7,81 (66,67)	4,95 (20,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (11,11)
Buraco no osso hioide	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (11,11)
Buraco no osso escamoso	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (11,11)
Buraco no osso zigomático	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00(0,00)	25,53 (100,00)	7,87 (60,00)	23,60 (88,89)
Buraco no osso presfenoide	0,56 (5,88)	30,82 (92,86)	12,50 (66,67)	28,70 (90,91)	21,88 (83,33)	15,84 (90,00)	26,58 (87,50)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Buraco no osso basoesfenoide	7,91 (64,71)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (11,11)
Buraco na mandíbula	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (11,11)

Anexo 31: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do esqueleto axial induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11, nos horários de 11:00, 13:00 e 15:00 hs.

COLUNA VERTEBRAL	NADA	11:00 hs			13:00 hs			15:00 hs		
PARÂMETROS AVALIADOS		HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU/6-MP ou 6-MP/HU	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>	177	159	88	108	64	101	79	47	89	89
<i>Ninhadas</i>	17	14	9	11	6	10	8	4	10	9
<i>Malformações (%)</i>										
Atlas torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Forma irreg. do atlas	0,00 (0,00)	2,52 (28,57)	2,27 (22,22)	0,00 (0,00)	3,13 (33,33)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Atlas mais largo	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,25 (11,11)
Atlas mais estreito	0,00 (0,00)	0,63 (7,14)	1,14 (11,11)	0,93 (9,09)	1,56 (16,67)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Buraco no atlas	0,00 (0,00)	0,63 (7,14)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Forma irreg. do axis	14,12(41,18)	18,87(78,57)	64,77 (88,89)	65,74 (100,00)	20,31 (83,33)	77,23 (100,00)	75,15 (100,00)	19,15 (75,00)	59,55 (100,00)	58,43 (88,89)
Ossific. incompleta 1- todos arcos vert. cervicais	1,69 (11,76)	1,26 (14,29)	67,05 (100,00)	71,30 (100,00)	1,56 (16,67)	87,13 (100,00)	67,09 (100,00)	0,00 (0,00)	77,53 (90,00)	32,58 (77,78)
Fusão de 1-2 arcos vert. torácicos	0,00 (0,00)	0,63 (7,14)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Hemivértebra - ausência de 1-2 arcos vert. torácicos	0,00 (0,00)	0,63 (7,14)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ossific. unilateral de 1-2 corpos vert. torácicos	0,00 (0,00)	0,63 (7,14)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Forma irreg. de 1-2 corpos vert. torácicos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,96 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,25 (22,22)
Fusão de 1-2 corpos vert. torácicos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Interrup. processo fechamento 1 ou mais corpos vert. torácicos	0,00 (0,00)	1,89 (14,29)	4,55 (44,44)	12,04 (45,45)	14,06 (16,67)	4,95 (30,00)	21,52 (75,00)	0,00 (0,00)	11,24 (40,00)	3,37 (33,33)
1-2 corpos vert. torácicos divididos assimetricamente	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	2,27 (22,22)	1,85 (18,18)	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	1,27 (12,50)	0,00 (0,00)	1,12 (10,00)	0,00 (0,00)
1-2 corpos vert. torácicos divididos simetricamente	1,69 (11,76)	0,63 (7,14)	1,14 (11,11)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,27 (12,50)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (11,11)
Centros ossif. de 1 ou mais corpos vert. torácicos forma de <i>dumbbell</i>	4,52 (29,41)	3,14 (35,71)	29,55 (66,67)	15,74 (54,55)	1,56 (16,67)	18,81 (80,00)	7,59 (50,00)	0,00 (0,00)	11,24 (60,00)	5,62 (33,33)
1-2 corpos vert. torácicos desalinados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,14 (11,11)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,27 (12,50)	0,00 (0,00)	2,25 (10,00)	0,00 (0,00)
Ossif. antecipada cartilagem de 1-2 arcos vert. torácicos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (10,00)	0,00 (0,00)
Forma irreg. de 1 ou mais corpos vert. lombares	0,00 (0,00)	1,26 (14,29)	3,41 (22,22)	4,63 (27,27)	3,13 (16,67)	5,94 (40,00)	3,80 (37,50)	0,00 (0,00)	11,24 (50,00)	0,00 (0,00)
Fusão do corpo de 1-2 vertebrae lombares	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,25 (20,00)	0,00 (0,00)
Interrup. processo fechamento de 1-todos corpos vert. lombares	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	9,09 (44,44)	8,33 (36,36)	3,13 (16,67)	29,70 (80,00)	11,39 (62,50)	0,00 (0,00)	40,45 (60,00)	13,48 (55,56)
1-2 corpos vert. lombares divididos simetricamente	0,00 (0,00)	2,52 (21,43)	11,36 (33,33)	14,81 (63,64)	1,56 (16,67)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,25 (10,00)	0,00 (0,00)
1-2 corpos vert. lombares divididos assimetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,41 (22,22)	6,48 (45,45)	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,37 (10,00)	0,00 (0,00)

(Cont.) Anexo 31: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do esqueleto axial induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11, nos horários de 11:00, 13:00 e 15:00 hs.

COLUNA VERTEBRAL	NADA	11:00 hs			13:00 hs			15:00 hs		
PARÂMETROS AVALIADOS		HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>	177	159	88	108	64	101	79	47	89	89
<i>Ninhadas</i>	17	14	9	11	6	10	8	4	10	9
<i>Malformações (%)</i>										
Adição de 1 vértebra lombar	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Centros ossif. de 1 ou mais corpos vert. lombares em forma <i>dumb-bell</i>	1,69 (11,76)	0,63 (7,14)	2,27 (22,22)	3,70 (63,64)	3,13 (33,33)	12,87 (40,00)	10,13 (75,00)	0,00 (0,00)	6,74 (40,00)	8,99 (44,44)
1 ou mais corpos vert. lombares desalinhados	0,00 (0,00)	0,63 (7,14)	1,14 (11,11)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	12,87 (60,00)	3,80 (12,50)	0,00 (0,00)	8,99 (40,00)	1,12 (11,11)
Ossific. unilateral de 1-2 corpos vert. lombares	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Forma irreg. de 1-2 arcos vert. sacrais	0,00 (0,00)	0,63 (7,14)	0,00 (0,00)	1,85 (9,09)	26,56 (83,33)	0,00 (0,00)	17,72 (37,50)	10,64 (50,00)	0,00 (0,00)	4,49 (44,44)
Forma irreg. de 1-todos corpos vert. sacrais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,27 (22,22)	1,85 (18,18)	0,00 (0,00)	24,75 (40,00)	5,06 (37,50)	0,00 (0,00)	26,97 (80,00)	11,24 (66,67)
Pos. irreg. de 1-2 arcos vert. sacrais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,85 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
1-2 corpos vert. sacrais fundidos	0,00 (0,00)	0,63 (7,14)	2,27 (11,11)	5,56 (36,36)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,37 (33,33)
Interrup. processo fechamento de 1- todos corpos vert. sacrais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	15,84 (60,00)	2,53 (25,00)	0,00 (0,00)	37,08 (70,00)	15,73 (55,56)
1-2 corpos vert. sacrais divididos simetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,95 (40,00)	3,80 (37,50)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Centros ossif. de 1-2 corpos vert. sacrais em forma de <i>dumb-bell</i>	0,00 (0,00)	0,63 (7,14)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
1-2 corpos vert. sacrais desalinhados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,14 (11,11)	0,93 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Interrup. processo fechamento de 1-2 corpos vert. caudais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	8,99 (40,00)	2,25 (22,22)

Anexo 32: Tipos e frequências de anomalias da costela induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11, nos horários de 11:00, 13:00 e 15:00 hs.

COSTELAS	NADA	11:00 hs			13:00 hs			15:00 hs		
PARÂMETROS AVALIADOS		HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>	177	159	88	108	64	101	79	47	89	89
<i>Ninhadas</i>	17	14	9	11	6	10	8	4	10	9
<i>Malformações (%)</i>										
1-2 costelas tortas	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,25 (20,00)	0,00 (0,00)
Ausência de 1-2 costelas	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,14 (11,11)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,13 (25,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Fusão entre 2 costelas	0,00 (0,00)	1,26 (14,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,13 (25,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
1-2 costelas bifurcadas	0,00 (0,00)	0,63 (7,14)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
1-6 costelas onduladas	6,21 (41,18)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
1 ou mais costelas descontínuas	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,25 (20,00)	0,00 (0,00)
Pos. irreg. pontos de inserção de 1-2 costelas ao	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,14 (11,11)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
1 a todas as costelas mais curtas	15,82 (76,47)	16,35 (85,71)	75,00 (88,89)	64,81 (100,00)	45,31 (100,00)	92,08 (100,00)	94,41 (100,00)	29,79 (50,00)	93,26 (100,00)	71,91 (100,00)
Costela extra rudimentar na coluna cervical	5,08 (41,18)	3,77 (28,57)	1,14 (11,11)	2,78 (27,27)	3,13 (16,67)	3,96 (20,00)	1,27 (12,50)	2,13 (25,00)	0,00 (0,00)	2,25 (22,22)
Costela extra rudimentar na coluna lombar	46,89 (94,12)	24,53 (78,57)	14,77 (55,56)	14,81 (54,55)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	16,46 (62,50)	34,04 (100,00)	15,73 (60,00)	11,24 (44,44)

Anexo 33: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do esterno induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11, nos horários de 11:00, 13:00 e 15:00 hs.

ESTERNO	NADA	11:00 hs			13:00 hs			15:00 hs		
PARÂMETROS AVALIADOS		HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>	177	159	88	108	64	101	79	47	89	89
<i>Ninhadas</i>	17	14	9	11	6	10	8	4	10	9
<i>Malformações (%)</i>										
Esterno deslocado	14,69 (88,24)	18,87 (92,86)	15,91 (16,67)	12,04 (63,64)	20,31 (83,33)	8,91 (50,00)	16,46 (75,00)	19,15 (100,00)	23,60 (0,00)	37,08 (100,00)
1ª esternebra torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (11,11)
Forma irregular da 1ª esternebra	1,13 (11,76)	3,14 (21,43)	19,32 (55,56)	11,11 (72,73)	3,13 (33,33)	18,81 (60,00)	5,06 (37,50)	2,13 (25,00)	11,24 (50,00)	8,99 (55,56)
1ª esternebra menor	0,56 (5,88)	0,63 (7,14)	20,45 (77,78)	16,67 (72,73)	0,00 (0,00)	44,45 (100,00)	11,39 (37,50)	0,00 (0,00)	34,83 (90,00)	3,37 (22,22)
1ª esternebra dividida	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,14 (11,11)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
2ª esternebra torta	0,00 (0,00)	0,63 (7,14)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Forma irregular da 2ª esternebra	18,08 (88,24)	18,87 (92,86)	28,41 (77,78)	37,96 (100,00)	17,19 (66,67)	25,74 (100,00)	22,78 (87,50)	17,02 (100,00)	16,85 (70,00)	16,85 (88,89)
2ª esternebra menor	1,69 (11,76)	0,63 (7,14)	14,77 (77,78)	21,30 (81,82)	1,56 (16,67)	49,50 (100,00)	24,05 (87,50)	0,00 (0,00)	16,85 (70,00)	5,62 (33,33)
2ª esternebra dividida	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,82 (44,44)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	11,88 (70,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	12,36 (60,00)	1,12 (11,11)
Forma irregular da 3ª esternebra	20,34 (88,24)	14,47 (78,57)	34,09 (88,89)	44,44 (90,91)	14,06 (66,67)	42,57 (100,00)	32,91 (100,00)	31,91 (100,00)	35,96 (100,00)	21,35 (100,00)
3ª esternebra menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,27 (11,11)	1,85 (9,09)	0,00 (0,00)	7,92 (50,00)	1,27 (12,50)	0,00 (0,00)	5,62 (40,00)	0,00 (0,00)
3ª esternebra dividida	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,82 (33,33)	1,85 (18,18)	0,00 (0,00)	20,79 (50,00)	1,27 (12,50)	0,00 (0,00)	8,99 (60,00)	1,12 (11,11)
Forma irregular da 4ª esternebra	33,33 (100,00)	30,19 (100,00)	29,55 (77,78)	39,81 (100,00)	45,31 (100,00)	38,61 (80,00)	51,90 (100,00)	34,04 (100,00)	28,09 (100,00)	32,58 (100,00)
4ª esternebra menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	10,23 (44,44)	16,67 (63,64)	0,00 (0,00)	17,82 (80,00)	7,59 (50,00)	0,00 (0,00)	11,24 (60,00)	3,37 (33,33)
4ª esternebra dividida	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,82 (55,56)	7,41 (54,55)	0,00 (0,00)	21,78 (60,00)	6,33 (25,00)	0,00 (0,00)	15,73 (80,00)	6,74 (44,44)
Ausência da 5ª esternebra	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,55 (11,11)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Forma irregular da 5ª esternebra	50,28 (100,00)	49,06 (100,00)	1,14 (11,11)	6,48 (27,27)	50,00 (83,33)	0,99 (10,00)	13,92 (87,50)	51,06 (100,00)	4,49 (30,00)	16,85 (44,44)
5ª esternebra menor	27,12 (76,47)	30,19 (71,43)	6,82 (55,56)	20,37 (45,45)	23,44 (100,00)	7,92 (40,00)	36,71 (87,50)	21,28 (100,00)	0,00 (0,00)	35,96 (77,78)
5ª esternebra dividida	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	7,59 (37,50)	2,13 (25,00)	2,25 (20,00)	0,00 (0,00)
Forma irregular da 6ª esternebra	1,13 (11,76)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Bifurcação na 6ª esternebra	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)

Anexo 34: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros anteriores induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11, nos horários de 11:00, 13:00 e 15:00 hs.

MEMBROS ANTERIORES	NADA	11:00 hs			13:00 hs			15:00 hs		
PARÂMETROS AVALIADOS		HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>	177	159	88	108	64	101	79	47	89	89
<i>Ninhadas</i>	17	14	9	11	6	10	8	4	10	9
<i>Malformações (%)</i>										
Buraco no úmero	33,33 (94,12)	36,48 (85,71)	20,45 (100,00)	25,93 (90,91)	25,00 (100,00)	8,91 (70,00)	24,05 (75,00)	29,79 (100,00)	8,99 (50,00)	15,73 (66,67)
Úmero torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (10,00)	0,00 (0,00)
Forma irregular do úmero	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,25 (10,00)	0,00 (0,00)
Osso úmero mais curto	0,00 (0,00)	0,63 (7,14)	1,14 (11,11)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,25 (20,00)	0,00 (0,00)
Ulna torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,93 (50,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,62 (30,00)	0,00 (0,00)
Ulna mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,94 (30,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	10,11 (20,00)	2,25 (11,11)
Buraco na ulna	0,00 (0,00)	0,63 (7,14)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Osso rádio torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,95 (30,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,74 (20,00)	0,00 (0,00)
Osso rádio mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,97 (20,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,74 (30,00)	0,00 (0,00)
Constricção no osso rádio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (10,00)	0,00 (0,00)
Buraco no proc. deltoide	75,71 (100,00)	78,62 (100,00)	82,95 (100,00)	73,15 (100,00)	93,35 (100,00)	91,09 (100,00)	74,48 (100,00)	85,11 (100,00)	89,89 (100,00)	86,52 (100,00)
Ausência do proc. deltoide	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (10,00)	0,00 (0,00)
Forma irreg. do proc. deltoide	23,16 (82,35)	27,04 (92,86)	1,14 (11,11)	2,78 (18,18)	10,94 (66,67)	5,94 (30,00)	0,00 (0,00)	6,38 (25,00)	6,74 (30,00)	12,36 (55,56)
Posição irreg. do proc. deltoide	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,85 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Processo deltoide incompleto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,27 (12,50)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Processo deltoide menor	0,00 (0,00)	1,89 (21,43)	0,00 (0,00)	1,85 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,27 (12,50)	2,13 (25,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ausência do 3º dedo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ausência do 4º dedo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,97 (20,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 4º dedo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,56 (16,67)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 5º dedo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (10,00)	0,00 (0,00)

(Cont.) Anexo 34: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros anteriores induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11, nos horários de 11:00, 13:00 e 15:00 hs.

MEMBROS ANTERIORES	NADA	11:00 hs			13:00 hs			15:00 hs		
PARÂMETROS AVALIADOS		HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>	177	159	88	108	64	101	79	47	89	89
<i>Ninhadas</i>	17	14	9	11	6	10	8	4	10	9
<i>Malformações (%)</i>										
Falanges proximais menores	0,00 (0,00)	0,63 (7,14)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Falange prox. do 1º dedo menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (11,11)
Falange prox. do 2º dedo menor	25,42 (82,35)	15,09 (64,29)	4,55 (22,22)	12,04 (36,36)	23,44 (66,67)	0,00 (0,00)	1,27 (12,50)	23,40 (100,00)	5,62 (10,00)	0,00 (0,00)
Falange prox. do 3º dedo menor	2,26 (23,53)	1,26 (14,29)	18,18 (66,67)	10,19 (54,55)	3,13 (33,33)	33,66 (90,00)	17,72 (75,00)	10,64 (100,00)	26,97 (80,00)	7,87 (44,44)
Falange prox. do 4º dedo menor	10,17 (58,82)	5,66 (28,57)	17,05 (44,44)	7,41 (45,45)	10,94 (66,67)	28,71 (90,00)	12,66 (75,00)	23,40 (100,00)	20,22 (7,00)	3,37 (11,11)
Falange prox. do 5º dedo menor	28,25 (82,35)	20,42 (85,71)	4,55 (33,33)	12,04 (27,27)	28,13 (66,67)	10,89 (40,00)	2,53 (12,50)	25,23 (100,00)	3,37 (20,00)	21,35 (77,78)
3º Metacarpo menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,27 (12,50)	0,00 (0,00)	1,12 (10,00)	0,00 (0,00)
4º Metacarpo menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,27 (12,50)	0,00 (0,00)	1,12 (10,00)	0,00 (0,00)
5º Metacarpo menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	29,55 (77,78)	33,33 (100,00)	0,00 (0,00)	38,61 (60,00)	58,23 (100,00)	0,00 (0,00)	35,96 (80,00)	19,10 (55,56)
Metacarpos mais largos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (10,00)	0,00 (0,00)
Fusão entre 2º e 3º metacarpos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,25 (10,00)	0,00 (0,00)
Fusão entre 3º e 4º metacarpos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,97 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (10,00)	0,00 (0,00)
Constricção na clavícula	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Buraco na clavícula	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)

Anexo 35: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros posteriores induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11, nos horários de 11:00, 13:00 e 15:00 hs.

MEMBROS POSTERIORES	NADA	11:00 hs			13:00 hs			15:00 hs		
		HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>	177	159	88	108	64	101	79	47	89	89
<i>Ninhadas</i>	17	14	9	11	6	10	8	4	10	9
<i>Malformações (%)</i>										
Ausência de osso pubiano	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Osso pubiano mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,25 (20,00)	0,00 (0,00)
Constricção do pubis	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,14 (11,11)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Forma irreg. do ílio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,97 (20,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (10,00)	0,00 (0,00)
Ílio mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (10,00)	0,00 (0,00)
Buraco no ílio	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,26 (50,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ausência de ísquio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Forma irreg. do ísquio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (10,00)	0,00 (0,00)
Ísquio mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,14 (11,11)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ísquio menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,14 (11,11)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ausência de fêmur	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,27 (22,22)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,93 (30,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Fêmur mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,55 (22,22)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	12,87 (60,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	8,99 (30,00)	0,00 (0,00)
Constricção no fêmur	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,14 (11,11)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,94 (30,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,74 (30,00)	0,00 (0,00)
Ausência de tíbia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,14 (11,11)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,97 (20,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Tíbia torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,27 (22,22)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,98 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,37 (10,00)	0,00 (0,00)
Tíbia mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,27 (22,22)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,37 (20,00)	0,00 (0,00)
Constricção da tíbia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Fíbula torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (10,00)	0,00 (0,00)
Fíbula mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,37 (10,00)	0,00 (0,00)

(Cont.) Anexo 35: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros posteriores induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11, nos horários de 11:00, 13:00 e 15:00 hs.

MEMBROS POSTERIORES	NADA	11:00 hs			13:00 hs			15:00 hs		
PARÂMETROS AVALIADOS		HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>	177	159	88	108	64	101	79	47	89	89
<i>Ninhadas</i>	17	14	9	11	6	10	8	4	10	9
<i>Malformações (%)</i>										
1º metatarso menor	3,95 (23,53)	9,43 (50,00)	10,23 (55,56)	12,04 (45,45)	37,50 (66,67)	1,98 (20,00)	2,53 (12,50)	0,00 (0,00)	3,37 (20,00)	30,34 (77,78)
5º metatarso menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,27 (22,22)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,96 (20,00)	1,27 (12,50)	0,00 (0,00)	1,12 (10,00)	0,00 (0,00)
Pos. irreg. falange prox. 5º dedo	0,00 (0,00)	0,63 (7,14)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ausência do 1º dedo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 1º dedo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,14 (11,11)	2,78 (18,18)	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,25 (20,00)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 2º dedo	0,00 (0,00)	0,63 (7,14)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (10,00)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 4º dedo	0,00 (0,00)	0,63 (7,14)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 5º dedo	0,56 (5,88)	1,89 (21,43)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	1,56 (16,67)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
1º dedo mais longo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	39,77 (66,67)	6,48 (18,18)	0,00 (0,00)	37,62 (90,00)	1,27 (12,50)	0,00 (0,00)	32,58 (80,00)	6,74 (22,22)
1º dedo mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Fusão entre 2º e 3º dedos	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Polidactilia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	25,00 (66,67)	0,00 (0,00)	1,56 (16,67)	29,70 (90,00)	1,27 (12,50)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Falanges proximais tortas	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Falange prox. 2º dedo menor	19,21 (82,35)	12,58 (50,00)	0,00 (0,00)	1,85 (18,18)	7,81 (50,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,74 (44,44)
Falange prox. 3º dedo menor	11,30 (52,94)	10,69 (64,29)	1,14 (11,11)	3,70 (27,27)	20,31 (83,33)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	8,99 (44,44)
Falange prox. 4º dedo menor	8,47 (52,94)	6,29 (50,00)	1,14 (11,11)	1,85 (18,18)	12,50 (66,67)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	10,11 (44,44)
Falange prox. 5º dedo menor	9,04 (47,06)	8,81 (50,00)	0,00 (0,00)	0,93 (9,09)	6,25 (33,33)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	7,87 (22,22)

Anexo 36: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do do crânio induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas</i>	17	24	29	28
<i>Malformações (%)</i>				
Fusão do osso zigomático com processo jugular do maxilar	0,56 (5,88)	5,56 (33,33)	29,50 (79,31)	14,13 (71,43)
Osso timpânico torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,72 (7,14)
Osso zigomático torto	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ausência do osso gonialo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,09 (3,57)
Forma irregular do osso interparietal	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	0,00 (0,00)	0,36 (3,57)
Forma irregular do osso supraoccipital	1,69 (11,76)	15,56 (54,17)	5,40 (27,59)	18,48 (64,29)
Forma irregular do osso exoccipital	0,56 (5,88)	1,85 (8,33)	0,72 (6,90)	0,36 (3,57)
Forma irregular do osso basoccipital	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,72 (3,57)
Forma irregular do osso timpânico	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Forma irregular do osso escamoso	29,94 (94,12)	22,22 (66,67)	19,42 (82,76)	20,65 (82,14)
Forma irregular do osso zigomático	0,00 (0,00)	1,11 (8,33)	1,08 (10,34)	0,36 (3,57)
Forma irregular do osso presfenoide	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Forma irregular do osso basoesfenoide	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,57)
Assimetria do osso escamoso	5,65 (35,29)	5,56 (37,50)	0,36 (3,45)	0,72 (7,14)
Osso nasal incompleto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	67,27 (100,00)	47,83 (96,43)
Osso frontal incompleto	2,26 (11,76)	2,59 (12,50)	88,13 (100,00)	81,16 (96,43)
Osso parietal incompleto	8,47 (47,06)	0,00 (0,00)	1,80 (3,45)	0,00 (0,00)
Osso interparietal incompleto	8,47 (47,06)	2,59 (8,33)	3,60 (20,69)	1,81 (14,29)
Osso supraoccipital incompleto	80,79 (100,00)	63,33 (83,33)	92,09 (100,00)	94,93 (100,00)
Osso exoccipital incompleto	0,00 (0,00)	3,33 (25,00)	61,87 (96,55)	51,09 (96,43)
Osso timpânico incompleto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,44 (6,90)	0,72 (3,57)

(Cont.) Anexo 36: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do crânio induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas</i>	17	24	29	28
<i>Malformações (%)</i>				
Osso escamoso incompleto	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,36 (3,57)
Osso zigomático incompleto	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Processo jugular do maxilar incompleto	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Osso basoesfenoide incompleto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
Mandíbula incompleta	2,26 (17,65)	53,33 (70,83)	0,72 (6,90)	1,09 (7,14)
Osso timpânico mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,24 (17,24)	7,61 (33,33)
Osso gonialo mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,57)
Mandíbula curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,16 (10,34)	0,36 (3,57)
Osso timpânico menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,57)
Osso gonialo menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,57)
Osso hioide menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,57)
Osso presfenoide menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,36 (3,57)
Osso pterigoide menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,57)
Osso zigomático mais largo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
Fissura nos ossos palatinos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
Fissura no basoesfenoide	2,26 (23,53)	2,59 (20,83)	22,30 (79,31)	22,10 (78,57)
Ossificação adicional próxima ao osso nasal	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ossificação adicional próxima ao osso parietal	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,57)
Ossificação adicional próxima ao osso interparietal	0,00 (0,00)	0,74 (4,17)	0,00 (0,00)	0,72 (7,14)
Ossificação adicional próxima ao osso escamoso	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)

(Cont.) Anexo 36: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do crânio induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas</i>	17	24	29	28
<i>Malformações (%)</i>				
Ossos nasais mais distantes	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,72 (7,14)
Ossos parietais mais distantes	0,56 (5,88)	1,85 (16,67)	84,53 (96,55)	60,14 (67,86)
Processo maxilar do osso palatino incompleto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,57)
Distância maior entre os ossos palatinos	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	19,78 (48,28)	7,61 (32,14)
Distância maior entre os ossos da mandíbula	0,00 (0,00)	6,67 (25,00)	78,42 (100,00)	50,00 (83,14)
Buraco no osso nasal	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	0,36 (3,45)	0,72 (7,14)
Buraco no osso interparietal	0,00 (0,00)	0,74 (4,17)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Buraco no osso supraoccipital	0,56 (5,88)	9,63 (45,83)	3,96 (24,14)	15,94 (50,00)
Buraco no osso supraoccipital	2,82 (23,53)	4,07 (33,33)	3,96 (20,69)	1,09 (10,71)
Buraco no osso basoccipital	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,72 (7,14)
Buraco no osso timpânico	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,57)
Buraco no osso hioide	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,57)
Buraco no osso escamoso	0,56 (5,88)	9,63 (37,50)	8,27 (72,41)	26,45 (89,29)
Buraco no osso zigomático	7,91 (64,71)	0,00 (0,00)	0,00a (0,00)	0,36 (3,57)
Buraco no osso presfenoide	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,57)
Buraco no osso basoesfenoide	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,72 (7,14)
Buraco na mandíbula	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)

Anexo 37: Tipos e frequências de anomalias dos ossos da coluna vertebral induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas</i>	17	24	29	28
<i>Malformações (%)</i>				
Atlas torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,57)
Forma irregular do atlas	0,00 (0,00)	2,22 (25,00)	1,08 (10,34)	0,00 (0,00)
Atlas mais largo	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,09 (7,14)
Atlas mais estreito	0,00 (0,00)	0,74 (8,33)	0,72 (6,90)	0,36 (3,57)
Buraco no atlas	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Forma irregular do axis	14,12 (41,18)	19,26 (79,17)	67,63 (96,55)	65,22 (96,43)
Ossificação incompleta de 1 a todos os arcos vertebrais cervicais	1,69 (11,76)	1,11 (12,50)	77,70 (93,10)	57,61 (92,86)
1-2 arcos vertebrais torácicos fundidos	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Hemivértebra - ausência de 1-2 arcos vertebrais torácicos	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ossificação unilateral de 1-2 corpos vertebrais torácicos	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Forma irregular de 1-2 corpos vertebrais torácicos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,44 (3,45)	0,72 (7,14)
Fusão de 1-2 corpos vertebrais torácicos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
Interrupção do processo de fechamento de 1-6 corpos vertebrais torácicos	0,00 (0,00)	4,44 (20,83)	7,04 (37,93)	11,96 (46,43)
1-2 corpos vertebrais torácicos divididos assimetricamente	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	1,44 (13,79)	1,09 (10,71)
1-2 corpos vertebrais torácicos divididos simetricamente	1,69 (11,76)	0,37 (4,17)	0,36 (3,45)	1,09 (10,71)
Centros de ossific. de 1-6 corpos vertebrais torácicos em forma de <i>dumb-bell</i>	4,52 (29,41)	2,22 (25,00)	20,37 (68,97)	10,14 (46,43)
1-2 corpos vertebrais torácicos desalinhados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,08 (6,90)	0,36 (3,57)
Ossificação antecipada de cartilagem de 1-2 arcos vertebrais torácicos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)

(Cont.) Anexo 37: Tipos e frequências de anomalias dos ossos da coluna vertebral induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas</i>	17	24	29	28
<i>Malformações (%)</i>				
Forma irregular de 1-6 corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	1,48 (16,67)	7,04 (37,93)	5,43 (39,29)
Fusão de 1-2 corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,72 (6,90)	0,00 (0,00)
Interrupção do processo de fechamento de 1 a todos os corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	0,74 (8,33)	26,62 (62,07)	10,87 (50,00)
1-2 corpos vertebrais lombares divididos simetricamente	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	0,72 (3,45)	0,00 (0,00)
Centros de ossific. de 1-6 corpos vertebrais lombares em forma de <i>dumb-bell</i>	1,69 (11,76)	2,22 (20,83)	10,74 (37,93)	11,96 (60,71)
1-2 corpos vertebrais lombares divididos assimetricamente	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	2,16 (13,79)	1,09 (10,71)
1-6 corpos vertebrais lombares desalinhados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	9,26 (44,83)	3,99 (25,00)
Ossificação unilateral de 1-2 corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Adição de 1 vértebra lombar	0,00 (0,00)	5,56 (87,50)	2,04 (41,38)	5,19 (60,71)
Forma irregular de 1-2 arcos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	15,56 (41,67)	0,00 (0,00)	9,06 (25,00)
Forma irregular de 1 a todos corpos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	18,35 (51,72)	6,16 (39,29)
Posição irregular de 1-2 arcos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,57)
Fusão de 1-2 corpos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,81 (14,29)
Interrupção do processo de fechamento de 1 a todos os corpos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	18,35 (51,72)	7,97 (39,29)
1-2 corpos vertebrais sacrais divididos simetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,80 (13,79)	1,09 (10,71)
Centros de ossific. de 1-2 corpos vertebrais sacrais em forma de <i>dumb-bell</i>	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
1-2 corpos vertebrais sacrais desalinhados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,36 (3,57)
Interrupção do processo de fechamento de 1-2 corpos vertebrais caudais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,72 (7,14)

Anexo 38: Tipos e frequências de anomalias da costela induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas</i>	17	24	29	28
<i>Malformações (%)</i>				
1-2 costelas tortas	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,72 (6,90)	0,00 (0,00)
Ausência de 1-2 costelas	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
Fusão entre 2 costelas	0,00 (0,00)	1,11 (12,50)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
1-2 costelas bifurcadas	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
1-6 costelas onduladas	6,21 (41,18)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
1 ou mais costelas descontínuas	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
Posição irregular dos pontos de inserção de 1-2 costelas ao esterno	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
1-13 (todas) costelas mais curtas	48,49 (76,47)	24,44 (87,50)	11,15 (96,55)	14,13 (100,00)
Costela extra rudimentar na coluna cervical	5,08 (41,18)	3,33 (25,00)	0,36 (3,45)	2,17 (21,43)
Costela extra rudimentar na coluna lombar	46,89 (94,12)	24,44 (79,17)	11,15 (44,83)	14,13 (53,57)

Anexo 39: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do esterno induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas</i>	17	24	29	28
<i>Malformações (%)</i>				
Esterno deslocado	14,69 (88,24)	19,26 (91,67)	15,83 (65,52)	21,38 (78,57)
1ª esternebra torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,57)
Forma irregular da 1ª esternebra	1,13 (11,76)	2,96 (25,00)	16,55 (55,17)	8,70 (57,14)
1ª esternebra menor	0,56 (5,88)	0,37 (4,17)	33,81 (89,66)	10,87 (46,43)
1ª esternebra dividida	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,72 (6,90)	0,36 (3,57)
2ª esternebra torta	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Forma irregular da 2ª esternebra	18,18 (88,24)	18,15 (87,50)	23,74 (82,76)	26,81 (92,86)
2ª esternebra menor	1,69 (11,76)	0,74 (8,33)	28,06 (82,76)	17,03 (67,86)
2ª esternebra dividida	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	10,43 (58,62)	0,72 (7,14)
Forma irregular da 3ª esternebra	20,34 (88,24)	17,41 (79,17)	37,77 (96,55)	33,70 (96,43)
3ª esternebra menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,40 (34,48)	1,09 (7,14)
3ª esternebra dividida	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	12,59 (48,28)	1,45 (14,29)
Forma irregular da 4ª esternebra	33,33 (100,00)	34,44 (100,00)	37,37 (86,21)	40,94 (100,00)
4ª esternebra menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	13,31 (62,07)	9,78 (50,00)
4ª esternebra dividida	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,11 (65,52)	6,88 (42,86)
Ausência da 5ª esternebra	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,80 (6,90)	0,00 (0,00)
Forma irregular da 5ª esternebra	50,28 (100,00)	49,63 (95,83)	2,16 (17,24)	11,96 (50,00)
5ª esternebra menor	27,12 (76,47)	27,04 (83,33)	5,04 (31,03)	30,07 (67,86)
5ª esternebra dividida	0,56 (5,88)	0,37 (4,17)	0,72 (6,90)	2,54 (14,29)
Forma irregular da 6ª esternebra	1,13 (11,76)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
Bifurcação na 6ª esternebra	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)

Anexo 40: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros anteriores induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas</i>	17	24	29	28
<i>Malformações (%)</i>				
Constricção na clavícula	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,57)
Buraco na clavícula	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Buraco no úmero	33,33 (94,12)	32,59 (91,67)	12,59 (72,41)	22,10 (78,57)
Úmero torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
Forma irregular do úmero	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,72 (3,45)	0,00 (0,00)
Ossos úmero mais curto	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	1,08 (10,34)	0,00 (0,00)
Ulna torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,32 (27,59)	0,00 (0,00)
Ulna mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,40 (17,24)	0,72 (3,57)
Buraco na ulna	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ossos rádio mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,24 (17,24)	0,00 (0,00)
Constricção no osso rádio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,72 (6,90)	0,00 (0,00)
Ossos rádio torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ausência do processo deltoide	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,72 (6,90)	0,00 (0,00)
Buraco no processo deltoide	75,71 (100,00)	8,33 (100,00)	88,13 (100,00)	78,99 (100,00)
Forma irregular do processo deltoide	23,16 (82,35)	19,63 (75,00)	4,68 (24,14)	5,07 (25,00)
Posição irregular do processo deltoide	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,72 (3,57)
Processo deltoide incompleto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,72 (7,14)
Processo deltoide menor	0,00 (0,00)	1,48 (16,67)	0,00 (0,00)	1,09 (7,14)

(Cont.) Anexo 40: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros anteriores induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas</i>	17	24	29	28
<i>Malformações (%)</i>				
Ausência do 3º dedo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
Ausência do 4º dedo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,08 (6,90)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 4º dedo	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 5º dedo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Metacarpos mais largos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
Fusão entre 2º e 3º metacarpos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,72 (3,45)	0,00 (0,00)
Fusão entre 3º e 4º metacarpos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,44 (6,90)	0,00 (0,00)
3º Metacarpo menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,36 (3,57)
4º Metacarpo menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,36 (3,57)
5º Metacarpo menor	0,00 (0,00)	0,74 (8,33)	34,89 (72,41)	35,87 (85,71)
Falanges proximais menores	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Falange proximal do 1º dedo menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,57)
Falange proximal do 2º dedo menor	25,42 (82,35)	18,52 (70,83)	3,24 (10,34)	10,87 (35,71)
Falange proximal do 3º dedo menor	2,26 (23,53)	3,33 (33,33)	26,62 (79,31)	11,59 (57,14)
Falange proximal do 4º dedo menor	10,17 (58,82)	10,00 (50,00)	22,30 (68,97)	7,61 (42,86)
Falange proximal do 5º dedo menor	28,25 (82,35)	26,67 (83,88)	6,47 (31,03)	12,32 (39,29)

Anexo 41: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros posteriores induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas</i>	17	24	29	28
<i>Malformações (%)</i>				
Ausência de osso pubiano	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
Osso pubiano mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,72 (6,90)	0,36 (3,57)
Constrição do púbis	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
Forma irregular do ílio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,44 (10,34)	0,00 (0,00)
Ílio mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,72 (6,90)	0,00 (0,00)
Buraco no ílio	0,56 (5,88)	0,74 (8,33)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ausência de ísquio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
Forma irregular do ísquio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
Ísquio mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (6,90)	0,00 (0,00)
Ísquio menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (6,90)	0,00 (0,00)
Ausência de fêmur	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,24 (17,24)	0,00 (0,00)
Fêmur mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	8,99 (37,93)	0,00 (0,00)
Constrição no fêmur	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,68 (24,14)	0,00 (0,00)
Ausência de tíbia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,44 (10,34)	0,00 (0,00)
Tíbia torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,52 (13,79)	0,00 (0,00)
Tíbia mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,88 (20,69)	0,00 (0,00)
Constrição da tíbia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
Fíbula torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,72 (6,90)	0,00 (0,00)
Fíbula mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,08 (3,45)	0,00 (0,00)

(Cont) Anexo 41: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros posteriores induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas</i>	17	24	29	28
<i>Malformações (%)</i>				
1º metatarso menor	3,95 (23,53)	16,30 (54,17)	5,04 (31,03)	15,22 (46,43)
5º metatarso menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,52 (17,24)	0,36 (3,57)
Posição irregular da falange proximal do 5º dedo	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ausência do 1º dedo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 1º dedo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,44 (13,79)	1,09 (7,14)
Posição irregular do 2º dedo	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 4º dedo	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Posição irregular do 5º dedo	0,56 (5,88)	1,48 (16,67)	0,36 (3,45)	0,36 (3,57)
1º dedo mais longo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	36,69 (79,31)	5,07 (17,86)
1º dedo mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
Fusão entre 2º e 3º dedos	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Polidactilia	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	25,54 (75,86)	3,26 (17,86)
Falanges proximais tortas	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,57)
Falange proximal do 2º dedo menor	19,21 (82,35)	13,70 (58,33)	0,00 (0,00)	2,90 (21,43)
Falange proximal do 3º dedo menor	11,30 (52,94)	15,56 (75,00)	0,72 (6,90)	4,35 (25,00)
Falange proximal do 4º dedo menor	8,47 (52,94)	11,11 (58,33)	0,72 (6,90)	3,99 (21,43)
Falange proximal do 5º dedo menor	9,04 (47,06)	8,15 (41,67)	0,00 (0,00)	2,90 (10,71)

Anexo 42: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos do crânio induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas</i>	17	24	29	28
<i>Malformações (%)</i>				
Osso nasal esponjoso	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,04 (6,90)	0,00 (0,00)
Osso interparietal pobremente calcificado	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	4,68 (17,24)	0,00 (0,00)
Osso supraoccipital esponjoso	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	72,66 (96,55)	40,58 (60,71)
Osso exoccipital esponjoso	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,80 (6,90)	21,38 (28,57)
Osso escamoso esponjoso	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,47 (37,93)	0,36 (3,57)
Osso nasal não calcificado	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	0,36 (3,45)	0,36 (3,57)
Osso nasal pobremente calcificado	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	98,56 (100,00)	80,80 (96,43)
Osso frontal pobremente calcificado	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	99,28 (100,00)	81,16 (96,43)
Osso parietal pobremente calcificado	1,13 (11,76)	0,00 (0,00)	99,28 (100,00)	83,70 (96,43)
Osso interparietal não calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,80 (17,24)	0,72 (3,57)
Osso interparietal pobremente calcificado	2,82 (29,04)	2,59 (25,00)	96,40 (100,00)	86,96 (96,43)
Osso supraoccipital não calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,04 (27,59)	1,09 (7,14)
Osso supraoccipital pobremente calcificado	31,64 (82,35)	46,67 (95,83)	93,88 (100,00)	96,38 (100,00)
Osso exoccipital pobremente calcificado	1,13 (11,76)	3,70 (37,50)	92,81 (100,00)	86,23 (100,00)
Osso basoccipital não calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,44 (10,34)	0,00 (0,00)
Osso basoccipital pobremente calcificado	7,91 (52,94)	36,67(75,00)	97,48 (100,00)	96,01 (100,00)
Osso timpânico pobremente calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	84,89 (100,00)	63,41 (100,00)
Osso gonialo pobremente calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	78,06 (100,00)	50,36 (100,00)
Osso hioide não calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,80 (13,79)	0,36 (3,57)

(Cont.) Anexo 42: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos do crânio induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas</i>	17	24	29	28
<i>Malformações (%)</i>				
Osso escamoso pobremente calcificado	1,13 (11,76)	1,85 (20,83)	98,20 (100,00)	95,29 (100,00)
Processo jugular do osso escamoso pobremente calcificado	0,56 (5,88)	1,48 (16,67)	97,48 (100,00)	92,03 (100,00)
Osso zigomático pobremente calcificado	0,56 (5,88)	1,48 (16,67)	97,48 (100,00)	92,39 (100,00)
Osso maxilar pobremente calcificado	0,56 (5,88)	0,74 (8,33)	97,84 (100,00)	88,77 (100,00)
Processo jugular do maxilar pobremente calcificado	0,56 (5,88)	0,74 (8,33)	97,84 (100,00)	88,77 (100,00)
Osso premaxilar pobremente calcificado	0,56 (5,88)	0,74 (8,33)	97,84 (100,00)	89,13 (100,00)
Osso lacrimal pobremente calcificado	0,56 (5,88)	0,74 (8,33)	97,84 (100,00)	86,59 (100,00)
Lâmina orbital do osso frontal pobremente calcificada	0,56 (5,88)	0,74 (8,33)	97,84 (100,00)	86,96 (100,00)
Osso vômer pobremente calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	43,17 (72,41)	25,36 (42,86)
Processo maxilar do osso palatino pobremente calcificado	0,00 (0,00)	4,44 (25,00)	91,01 (93,10)	64,13 (78,57)
Osso palatino pobremente calcificado	3,39 (29,41)	4,07 (41,67)	98,20 (100,00)	89,49 (100,00)
Osso presfenoide não calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	8,99 (37,93)	1,09 (7,14)
Osso presfenoide pobremente calcificado	2,82 (23,53)	8,52 (41,67)	84,89 (96,55)	85,14 (100,00)
Osso orbitoesfenoide pobremente calcificado	3,39 (29,41)	5,56 (37,50)	94,24 (100,00)	89,13 (100,00)
Osso basoesfenoide pobremente calcificado	6,21 (41,18)	22,59 (70,83)	95,68 (100,00)	97,46 (100,00)
Osso hamulus pobremente calcificado	4,52 (29,41)	17,58 (62,50)	98,56 (100,00)	96,01 (100,00)
Osso pterigóide pobremente calcificado	4,52 (29,41)	17,58 (62,50)	98,56 (100,00)	96,01 (100,00)
Mandíbula pobremente calcificada	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	93,53 (100,00)	69,57 (100,00)

Anexo 43: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos da coluna vertebral induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas</i>	17	24	29	28
<i>Malformações (%)</i>				
1-todos os corpos vertebrais cervicais não calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	47,84 (86,21)	21,74 (53,57)
Coluna cervical pobremente calcificada	1,69 (17,65)	1,48 (16,67)	98,56 (100,00)	86,96 (100,00)
1-2 arcos vertebrais da coluna cervical pobremente calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
Todos os corpos vertebrais torácicos não calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,72 (6,90)	0,00 (0,00)
1 ou todas as vértebras torácicas pobremente calcificadas	5,05 (52,94)	1,48 (16,67)	98,56 (100,00)	90,22 (100,00)
1-2 vértebras lombares não calcificadas	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
1-todos os corpos vertebrais lombares não calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,44 (10,34)	0,00 (0,00)
todos os corpos vertebrais lombares pobremente calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,57)
1-2 vértebras lombares pobremente calcificadas	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,36 (3,57)
4 ou mais vértebras lombares pobremente calcificadas	0,00 (0,00)	1,11 (12,50)	0,00 (0,00)	1,45 (14,29)
1-todas as vértebras lombares pobremente calcificadas	2,26 (17,65)	2,59 (29,17)	98,56 (100,00)	92,75 (100,00)
1- todas as vértebras sacrais não calcificadas	0,00 (0,00)	1,11 (4,17)	15,47 (44,83)	0,00 (0,00)
1-2 arcos vertebrais sacrais não calcificadas	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,44 (10,34)	0,00 (0,00)
1-2 corpos vertebrais sacrais pobremente calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,57)
1-todos os corpos vertebrais sacrais não calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,24 (10,34)	0,00 (0,00)
1-todas as vértebras sacrais pobremente calcificadas	3,39 (29,41)	4,81 (41,67)	98,76 (100,00)	96,38 (100,00)
1 ou mais arcos vertebrais da coluna sacral pobremente calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,08 (3,45)	0,00 (0,00)
1-todas as vértebras caudais não calcificadas	2,82 (29,41)	0,37 (4,17)	64,39 (96,55)	40,94 (75,00)
1-todos os arcos vertebrais caudais não calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	16,55 (58,62)	29,35 (46,43)
1-todas as vértebras caudais pobremente calcificadas	22,60 (64,71)	15,69 (66,67)	31,29 (58,62)	80,80 (96,43)
1-2 arcos vertebrais da coluna caudal pobremente calcificados	0,56 (5,88)	0,37 (4,17)	18,71 (37,93)	0,00 (0,00)

Anexo 44: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos do esterno induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com 6-MP (24 mg/kg) e HU (250 mg/kg), no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas</i>	17	24	29	28
<i>Malformações (%)</i>				
1ª esternebra não calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	8,63 (41,38)	0,00 (0,00)
1ª esternebra pobremente calcificada	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	75,90 (100,00)	57,25 (89,29)
2ª esternebra não calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	14,03 (58,62)	3,26 (25,00)
2ª esternebra pobremente calcificada	0,00 (0,00)	0,74 (8,33)	71,22 (100,00)	53,99 (89,29)
3ª esternebra não calcificada	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	2,16 (17,24)	1,45 (10,71)
3ª esternebra pobremente calcificada	0,00 (0,00)	3,33 (20,83)	84,17 (100,00)	60,14 (100,00)
4ª esternebra não calcificada	0,00 (0,00)	1,11 (12,50)	16,55 (62,07)	5,43 (28,57)
4ª esternebra pobremente calcificada	3,39 (29,41)	10,74 (50,00)	73,38 (100,00)	63,77 (100,00)
5ª esternebra não calcificada	0,56 (5,88)	4,44 (20,83)	80,94 (100,00)	52,54 (89,29)
5ª esternebra pobremente calcificada	17,51 (64,71)	25,56 (66,67)	5,76 (20,29)	20,29 (60,71)
6ª esternebra não calcificada	0,00 (0,00)	5,19 (12,50)	64,75 (100,00)	45,29 (78,57)
6ª esternebra pobremente calcificada	38,98 (76,47)	39,63 (83,33)	18,35 (51,72)	24,28 (75,00)
Todas as esternebbras não calcificadas	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	7,55 (37,93)	2,17 (14,29)
Todas as esternebbras pobremente calcificadas	1,13 (11,76)	2,22 (16,67)	3,93 (31,03)	23,91 (64,29)

Anexo 45: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos dos membros anteriores induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com HU+NaOH, Salina+6-MP e HU+6MP, ou vice-versa, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas (N)</i>	17	24	29	28
<i>Malformações (%):</i>				
Clavícula pobremente calcificada	0,56 (5,88)	4,81 (33,33)	96,76 (100,00)	86,23 (100,00)
Escápula pobremente calcificada	0,56 (5,88)	5,19 (37,50)	96,40 (100,00)	86,23 (100,00)
Úmero pobremente calcificado	0,56 (5,88)	5,19 (37,50)	97,48 (100,00)	86,96 (100,00)
Ulna não calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,08 (3,45)	0,00 (0,00)
Ulna pobremente calcificada	0,56 (5,88)	5,56 (37,50)	96,76 (100,00)	87,32 (100,00)
Osso rádio pobremente calcificado	0,56 (5,88)	5,19 (37,50)	97,48 (100,00)	87,32 (100,00)
Metacarpos não calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,44 (10,34)	0,00 (0,00)
2º metacarpo não calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,54 (6,45)
4º metacarpo não calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,72 (3,57)
5º metacarpo não calcificado	0,56 (5,88)	3,33 (4,17)	45,32 (82,76)	26,45 (71,43)
Metacarpos pobremente calcificados	0,56 (5,88)	10,00 (62,50)	47,84 (96,55)	61,96 (89,29)
2º metacarpo pobremente calcificado	0,56 (5,88)	4,81 (12,50)	48,56 (93,10)	25,72 (82,14)
3º metacarpo pobremente calcificado	0,56 (5,88)	2,96 (12,50)	49,28 (93,10)	26,45 (82,14)
4º metacarpo pobremente calcificado	0,56 (5,88)	2,96 (12,50)	48,20 (93,10)	25,72 (82,14)
5º metacarpo pobremente calcificado	1,69 (11,76)	4,07 (4,17)	7,55 (51,72)	11,59 (46,43)

(Cont.) Anexo 45: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos dos membros anteriores induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com HU+NaOH, Salina+6-MP e HU+6MP, ou vice-versa, no DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas (N)</i>	17	24	29	28
<i>Malformações (%):</i>				
Falanges proximais não calcificadas	1,13 (5,88)	1,11 (8,33)	33,45 (79,31)	11,23 (46,43)
Falange proximal do 1º dedo não calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,57)
Falange proximal do 2º dedo não calcificada	16,38 (70,59)	15,93 (58,33)	63,31 (89,66)	67,75 (96,43)
Falange proximal do 3º dedo não calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,16 (13,79)	4,35 (32,14)
Falange proximal do 4º dedo não calcificada	1,69 (17,65)	1,85 (20,83)	7,91 (48,28)	30,43 (67,86)
Falange proximal do 5º dedo não calcificada	38,98 (94,12)	31,48 (70,83)	64,75 (89,66)	67,39 (92,86)
Falanges proximais pobremente calcificadas	1,13 (5,88)	1,11 (12,50)	1,80 (10,34)	4,35 (17,86)
Falange proximal do 2º dedo pobremente calcificada	53,67 (100,00)	52,59 (91,67)	1,80 (13,79)	16,30 (32,14)
Falange proximal do 3º dedo pobremente calcificada	24,86 (76,47)	17,41 (66,67)	63,67 (89,66)	67,03 (96,43)
Falange proximal do 4º dedo pobremente calcificada	35,59 (82,35)	25,56 (75,00)	59,35 (89,66)	61,23 (96,43)
Falange proximal do 5º dedo pobremente calcificada	46,89 (94,12)	52,22 (95,83)	1,08 (10,34)	14,49 (32,14)

Anexo 46: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos dos membros posteriores induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com HU+NaOH, Salina+6-MP e HU+6MP, ou vice-versa, no dia DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas (N)</i>	17	24	29	28
<i>Alterações (%):</i>				
Púbis não calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,16 (17,24)	0,00 (0,00)
Ísquio não calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,44 (10,34)	0,00 (0,00)
Ílio pobremente calcificado	1,69 (17,65)	7,78 (50,00)	98,20 (100,00)	96,74 (100,00)
Ísquio pobremente calcificado	1,69 (17,65)	7,78 (50,00)	97,12 (100,00)	96,74 (100,00)
Pubis pobremente calcificado	1,69 (17,65)	7,78 (50,00)	96,40 (100,00)	96,74 (100,00)
Fêmur pobremente calcificado	1,69 (17,65)	7,78 (50,00)	92,45 (100,00)	96,74 (100,00)
Fíbula pobremente calcificada	1,69 (17,65)	7,78 (50,00)	98,20 (100,00)	96,74 (100,00)
Tíbia pobremente calcificada	1,69 (17,65)	7,78 (50,00)	97,84 (100,00)	96,38 (100,00)
Fêmur não calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
Fíbula não calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
Tíbia não calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,57)
Metatarsos não calcificados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,52 (17,24)	2,54 (10,71)
1º metatarso não calcificado	4,52 (35,29)	6,30 (37,50)	55,76 (82,76)	77,54 (100,00)
2º metatarso não calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	20,86 (31,03)	0,00 (0,00)
5º metatarso não calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,04 (17,24)	2,54 (17,86)

(Cont.) Anexo 46: Tipos e frequências de alterações da ossificação dos ossos dos membros posteriores induzidas pelo tratamento concomitante de ratas grávidas com HU+NaOH, Salina+6-MP e HU+6MP, ou vice-versa, no dia DG11.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU+NaOH ou NaOH+HU	Sal+6-MP ou 6-MP+Sal	HU+6-MP ou 6-MP+HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	270	278	276
<i>Ninhadas (N)</i>	17	24	29	28
<i>Alterações (%)::</i>				
Metatarsos pobremente calcificados	5,08 (23,53)	36,67 (79,17)	12,95 (51,72)	18,12 (42,86)
1º metatarso pobremente calcificado	11,30 (41,18)	7,78 (41,67)	12,23 (55,17)	7,61 (32,14)
2º metatarso pobremente calcificado	5,65 (29,41)	4,44 (33,33)	76,26 (96,55)	78,62 (96,43)
3º metatarso pobremente calcificado	6,21 (29,41)	6,30 (37,50)	73,38 (93,10)	78,62 (96,43)
4º metatarso pobremente calcificado	6,78 (29,41)	6,30 (37,50)	76,62 (96,55)	78,62 (96,43)
5º metatarso pobremente calcificado	4,52 (29,41)	5,56 (33,33)	71,58 (96,55)	75,72 (96,43)
6º metatarso pobremente calcificado	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,36 (3,45)	0,00 (0,00)
Falanges proximais não calcificadas	12,43 (52,94)	21,48 (66,67)	98,56 (100,00)	88,77 (96,43)
Falange proximal do 1º dedo não calcificada	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	0,00 (0,00)
Falange proximal do 2º dedo não calcificada	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Falange proximal do 3º dedo não calcificada	5,65 (41,18)	5,93 (45,83)	0,00 (0,00)	1,09 (10,71)
Falange proximal do 4º dedo não calcificada	1,13 (11,76)	2,96 (25,00)	0,00 (0,00)	1,09 (7,14)
Falange proximal do 5º dedo não calcificada	51,98 (94,12)	45,19 (91,67)	1,08 (10,34)	8,70 (28,57)
Falanges proximais pobremente calcificadas	7,91 (41,18)	21,85 (54,17)	0,00 (0,00)	4,35 (17,86)
Falange proximal do 1º dedo pobremente calcificada	0,00 (0,00)	0,37 (4,17)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Falange proximal do 2º dedo pobremente calcificada	31,64 (88,24)	28,89 (91,67)	0,36 (3,45)	5,43 (25,00)
Falange proximal do 3º dedo pobremente calcificada	29,94 (76,47)	37,04 (91,67)	1,08 (10,34)	8,70 (28,57)
Falange proximal do 4º dedo pobremente calcificada	30,51 (70,59)	37,41 (91,67)	1,08 (10,34)	8,33 (25,00)
Falange proximal do 5º dedo pobremente calcificada	22,60 (70,59)	10,00 (54,17)	0,00 (0,00)	0,36 (3,57)

EXPOSIÇÃO SEQUENCIAL HU E 6-MP

INTERVALO ENTRE OS TRATAMENTOS: 2 HORAS

Anexo 47: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do esqueleto axial induzidas pelo tratamento sequencial de ratas grávidas (DG11) com HU→NaOH, SALINA→6-MP e HU→6-MP, com um intervalo de 2 horas entre os tratamentos. HU: 250 mg/kg, ip; 6-MP: 24 mg/kg, sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU→NaOH	Salina→6-MP	HU→6-MP
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	124	102	89
<i>Ninhadas (N)</i>	17	11	10	10
<i>Malformações (%):</i>				
CRÂNIO:				
Fusão do osso zigomático com processo jugular do maxilar	0,56 (5,88)	2,42 (27,27)	23,53 (90,00)	13,48 (60,00)
Mandíbula curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (10,00)
Distância maior entre os ossos da mandíbula	0,00 (0,00)	0,81 (9,09)	87,25 (100,00)	84,27 (100,00)
COLUNA VERTEBRAL:				
Forma irregular de 1-2 corpos vertebrais torácicos	0,00 (0,00)	0,81 (9,09)	0,98 (10,00)	3,37 (30,00)
Interrupção do processo de fechamento de 1-6 corpos vertebrais torácicos	0,00 (0,00)	9,68 (27,27)	9,80 (70,00)	11,24 (50,00)
Centros de ossific. de 1-6 corpos vertebrais torácicos em forma de <i>dumb-bell</i>	4,52 (29,41)	0,81 (9,09)	14,71 (60,00)	12,36 (60,00)
Corpo de 1-2 vertebrais torácicas dividido assimetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,96 (10,00)	0,00 (0,00)
Forma irregular de 1-6 corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	1,61 (18,18)	11,76 (90,00)	14,61 (70,00)
Fusão de 1-2 corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (10,00)	1,12 (10,00)
Interrupção do processo de fechamento do corpo de 1-6 vertebrais lombares	0,00 (0,00)	4,03 (18,18)	14,71 (90,00)	30,34 (40,00)
1-2 corpos vertebrais lombares divididos simetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,25 (20,00)
Centros de ossific. de 1-6 corpos vertebrais lombares em forma de <i>dumb-bell</i>	1,69 (11,76)	1,61 (18,18)	3,92 (50,00)	5,52 (30,00)
1-6 corpos vertebrais lombares desalinados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,88 (30,00)	19,10 (60,00)

(Cont.) Anexo 47 : Tipos e frequências de anomalias dos ossos do esqueleto axial induzidas pelo tratamento sequencial de ratas grávidas (DG11) com HU→NaOH, SALINA→6-MP e HU→6-MP, com um intervalo de 2 horas entre os tratamentos. HU: 250 mg/kg, ip; 6-MP: 24 mg/kg, sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU→NaOH	Salina→6-MP	HU→6-MP
<i>Malformações (%):</i>				
COLUNA VERTEBRAL:				
Forma irregular de 1-2 arcos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	20,97 (63,64)	0,00 (0,00)	28,09 (50,00)
Forma irregular de 1-4 corpos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	0,81 (9,09)	22,55 (80,00)	23,60 (40,00)
Interrupção do processo de fechamento de 1-4 corpos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	2,42 (27,27)	27,45 (70,00)	30,34 (60,00)
1-2 corpos vertebrais sacrais desalinhados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,12 (10,00)
Forma irregular de 1-todos os corpos vertebrais caudais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,25 (20,00)
Interrupção do processo de fechamento de 1 todos os corpos vertebrais caudais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (10,00)	3,37 (20,00)

Anexo 48: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros anteriores induzidas pelo tratamento sequencial de ratas grávidas (DG11) com HU→NaOH, SALINA→6-MP e HU→6-MP, com um intervalo de 2 horas entre os tratamentos. HU: 250 mg/kg, ip; 6-MP: 24 mg/kg, sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU→NaOH	Salina→6-MP	HU→6-MP
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	124	102	89
<i>Ninhadas (N)</i>	17	11	10	10
<i>Malformações (%):</i>				
Osso úmero mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (10,00)	0,00 (0,00)
Osso úmero mais largo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (10,00)	0,00 (0,00)
Osso rádio torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,37 (10,00)
Osso rádio mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (10,00)	0,00 (0,00)
Ulna torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (10,00)	3,37 (10,00)
Ulna mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,37 (10,00)
Forma irregular do processo deltoide	23,16 (82,35)	37,10 (90,91)	5,88 (50,00)	6,74 (40,00)
Fusão entre 3° e 4° metacarpo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (10,00)	3,37 (10,00)

Anexo 49: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros posteriores induzidas pelo tratamento sequencial de ratas grávidas (DG11) com HU→NaOH, SALINA→6-MP e HU→6-MP, com um intervalo de 2 horas entre os tratamentos. HU: 250 mg/kg, ip; 6-MP: 24 mg/kg, sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU→NaOH	Salina→6-MP	HU→6-MP
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	124	102	89
<i>Ninhadas (N)</i>	17	11	10	10
<i>Malformações (%):</i>				
Forma irregular do ílio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,25 (10,00)
Constricção no ílio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,25 (10,00)
Fíbula torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (10,00)	0,00 (0,00)
Tíbia mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (10,00)	0,00 (0,00)
Fêmur mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,96 (20,00)	1,12 (10,00)
Constricção no fêmur	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,98 (10,00)	1,12 (10,00)
1º dedo da pata traseira mais longo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	12,75 (60,00)	16,85 (50,00)
Polidactilia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	16,67 (70,00)	17,98 (30,00)

EXPOSIÇÃO SEQUENCIAL 6-MP E HU

INTERVALO ENTRE OS TRATAMENTOS: 2 HORAS

Anexo 50: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do esqueleto axial induzidas pelo tratamento sequencial de ratas grávidas (DG11) com NaOH→HU, 6-MP→SALINA e 6-MP→HU, com um intervalo de 2 horas entre os tratamentos. HU: 250 mg/kg, ip; 6-MP: 24 mg/kg, sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	NaOH→HU	6-MP→Salina	6-MP→HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	124	102	89
<i>Ninhadas (N)</i>	17	11	10	10
<i>Malformações (%):</i>				
CRÂNIO:				
Fusão do osso zigomático com processo jugular do maxilar	0,56 (5,88)	6,93 (60,00)	34,75 (100,00)	20,72 (90,00)
Forma irregular da mandíbula	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,90 (10,00)
Mandíbula curta	0,00 (0,00)	1,98 (10,00)	0,00 (0,00)	0,90 (10,00)
Distância maior entre os ossos da mandíbula	0,00 (0,00)	5,94 (30,00)	77,97 (100,00)	52,25 (100,00)
COLUNA VERTEBRAL:				
Forma irregular de 1-2 corpos vertebrais cervicais	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Forma irregular de 1-2 corpos vertebrais torácicos	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	5,08 (50,00)	3,60 (30,00)
Interrupção do processo de fechamento de 1-6 corpos vertebrais torácicos	0,00 (0,00)	7,92 (40,00)	12,71 (80,00)	9,01 (60,00)
Centros de ossific. de 1-2 corpos vertebrais torácicos em forma de <i>dumb-bell</i>	4,52 (29,41)	1,98 (20,00)	18,64 (50,00)	4,50 (50,00)
Ossificação unilateral de 1-2 corpos vertebrais torácicos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (10,00)	0,00 (0,00)
Escoliose na coluna torácica	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,80 (20,00)
Forma irregular de 1-2 corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,54 (30,00)	0,90 (10,00)
Interrupção do processo de fechamento do corpo de 1-2 vertebrais lombares	0,00 (0,00)	2,97 (20,00)	4,24 (20,00)	0,90 (10,00)
Centros de ossific. de 1-2 corpos vertebrais lombares em forma de <i>dumb-bell</i>	1,69 (11,76)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,90 (10,00)
1-2 corpos vertebrais lombares desalinhados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (10,00)	0,90 (10,00)
Forma irregular de 1-2 corpos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	2,54 (20,00)	0,90 (10,00)
Interrupção do processo de fechamento de 1-2 corpos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	1,98 (20,00)	5,93 (20,00)	1,80 (20,00)

Anexo 51: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros anteriores e posteriores induzidas pelo tratamento sequencial de ratas grávidas (DG11) com NaOH→HU, 6-MP→SALINA e 6-MP→HU, com um intervalo de 2 horas entre os tratamentos. HU: 250 mg/kg, ip; 6-MP: 24 mg/kg, sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	NaOH→HU	6-MP→Salina	6-MP→HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	124	102	89
<i>Ninhadas (N)</i>	17	11	10	10
<i>Malformações (%):</i>				
MEMBROS ANTERIORES:				
Osso úmero torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (10,00)	0,00 (0,00)
Osso úmero mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (10,00)	0,00 (0,00)
Constricção no rádio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (10,00)	0,00 (0,00)
Forma irregular do processo deltoide	23,16 (82,35)	21,78 (60,00)	10,17 (60,00)	19,82 (70,00)
Processo deltoide mais curto	0,00 (0,00)	0,99 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Processo deltoide menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,90 (10,00)
MEMBROS POSTERIORES:				
Forma irregular do ílio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,69 (10,00)	0,00 (0,00)
Fíbula torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (10,00)	0,00 (0,00)
Tíbia mais curta	23,16 (82,35)	37,10 (90,91)	1,69 (10,00)	0,00 (0,00)
Fêmur mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (10,00)	0,00 (0,00)
1º dedo da pata traseira mais longo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	12,71 (50,00)	4,50 (30,00)
1º dedo da pata traseira mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,85 (10,00)	0,00 (0,00)
Polidactilia pendular	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	12,71 (40,00)	10,81 (40,00)

EXPOSIÇÃO SEQUENCIAL HU E 6-MP

INTERVALO ENTRE OS TRATAMENTOS: 4 HORAS

Anexo 52: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do esqueleto axial induzidas pelo tratamento sequencial de ratas grávidas (DG11) com HU→NaOH, SALINA→6-MP e HU→6-MP, com um intervalo de 4 horas entre os tratamentos. HU: 250 mg/kg, ip; 6-MP: 24 mg/kg, sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU→NaOH	Salina→6-MP	HU→6-MP
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	136	110	100
<i>Ninhadas (N)</i>	17	12	11	10
<i>Malformações (%):</i>				
CRÂNIO:				
Fusão do osso zigomático com processo jugular do maxilar	0,56 (5,88)	6,62 (41,67)	32,73 (90,91)	24,00 (80,00)
Distância maior entre os ossos da mandíbula	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	81,82 (100,00)	80,00 (100,00)
COLUNA VERTEBRAL:				
Forma irregular de 1-2 corpos vertebrais torácicos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,64 (36,36)	1,00 (10,00)
Interrupção do processo de fechamento de 1-6 corpos vertebrais torácicos	0,00 (0,00)	11,76 (75,00)	9,09 (45,45)	20,00 (70,00)
Centros de ossific. de 1-2 corpos vertebrais torácicos em forma de <i>dumb-bell</i>	4,52 (29,41)	2,21 (25,00)	10,91 (63,64)	8,00 (40,00)
Corpo de 1-2 vertebrais torácicas dividido assimetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,00 (20,00)
1-6 corpos vertebrais torácicos desalinhados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,91 (9,09)	2,00 (10,00)
Forma irregular de 1-6 corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	1,47 (16,67)	8,18 (63,64)	40,00 (80,00)
1-2 corpos vertebrais lombares deslocados	0,00 (0,00)	0,74 (8,33)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ausência de 1-2 corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,00 (10,00)
Fusão de 1-2 corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,00 (20,00)
Interrupção do processo de fechamento do corpo de 1-6 vertebrais lombares	0,00 (0,00)	2,21 (33,33)	21,82 (81,82)	56,00 (90,00)
1-2 corpos vertebrais lombares divididos simetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,00 (40,00)

(Cont.) Anexo 52: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do esqueleto axial induzidas pelo tratamento sequencial de ratas grávidas (DG11) com HU →NaOH, SALINA→6-MP e HU→6-MP, com um intervalo de 4 horas entre os tratamentos. HU: 250 mg/kg, ip; 6-MP: 24 mg/kg, sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU→NaOH	Salina→6-MP	HU→6-MP
<i>Malformações (%):</i>				
COLUNA VERTEBRAL:				
Centros de ossific. de 1-2 corpos vertebrais lombares em forma de <i>dumb-bell</i>	1,69 (11,76)	0,74 (8,33)	0,00 (0,00)	20,72 (90,00)
Corpo de 1-2 vertebrais lombares dividido assimetricamente	0,00 (0,00)	0,74 (8,33)	0,00 (0,00)	3,60 (30,00)
1-6 corpos vertebrais lombares desalinhados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	7,27 (27,27)	9,01 (60,00)
Posição irregular de 1-2 arcos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,90 (10,00)
Forma irregular de 1-4 corpos vertebrais sacrais (uni e/ou bilateral)	0,00 (0,00)	0,74 (8,33)	7,27 (45,45)	0,90 (10,00)
Interrupção do processo de fechamento de 1-4 corpos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	1,47 (16,67)	18,18 (81,82)	59,00 (80,00)
1-4 corpos vertebrais sacrais divididos simetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	10,00 (30,00)
1-2 corpos vertebrais sacrais desalinhados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,00 (10,00)
Interrupção do processo de fechamento de 1- todos corpos vertebrais caudais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,00 (20,00)

Anexo 53: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros anteriores induzidas pelo tratamento sequencial de ratas grávidas (DG11) com HU→NaOH, SALINA→6-MP e HU→6-MP, com um intervalo de 4 horas entre os tratamentos. HU: 250 mg/kg, ip; 6-MP: 24 mg/kg, sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU→NaOH	Salina→6-MP	HU→6-MP
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	137	110	100
<i>Ninhadas (N)</i>	17	13	11	10
<i>Malformações (%):</i>				
Ulna torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,82 (18,18)	8,00 (30,00)
Ausência de ulna	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,00 (20,00)
Ulna mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,73 (18,18)	8,00 (20,00)
Constrição na ulna	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,00 (10,00)
Ausência de úmero	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,00 (10,00)
Ossó rádio torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,91 (9,09)	4,00 (20,00)
Ossó rádio mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,00 (10,00)
Ausência do processo deltoide	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,00 (10,00)
Forma irregular do processo deltoide	23,16 (82,35)	29,20 (76,92)	1,82 (18,18)	14,00 (50,00)
Processo deltoide mais curto	0,00 (0,00)	1,46 (7,69)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Processo deltoide menor	0,00 (0,00)	0,73 (7,69)	0,00 (0,00)	1,00 (10,00)
Ausência do 4º dedo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,00 (10,00)
Fusão entre 3º e 4º dedos (c/ ou s/ fusão de metacarpos)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,00 (20,00)

Anexo 54: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros posteriores induzidas pelo tratamento sequencial de ratas grávidas (DG11) com HU→NaOH, SALINA→6-MP e HU→6-MP, com um intervalo de 4 horas entre os tratamentos. HU: 250 mg/kg, ip; 6-MP: 24 mg/kg, sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	HU→NaOH	Salina→6-MP	HU→6-MP
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	136	110	100
<i>Ninhadas (N)</i>	17	12	11	10
<i>Malformações (%):</i>				
Forma irregular do ílio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,82 (18,18)	4,00 (20,00)
Ílio menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,00 (20,00)
Constricção no ílio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,00 (20,00)
Ísquio torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,00 (10,00)
Forma irregular do ísquio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,91 (9,09)	1,00 (10,00)
Ausência de tíbia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,91 (9,09)	0,00 (0,00)
Tíbia mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,91 (9,09)	0,00 (0,00)
Ausência de fêmur	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,82 (18,18)	0,00 (0,00)
Fêmur mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,82 (18,18)	10,00 (30,00)
Constricção no fêmur	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,82 (18,18)	5,00 (20,00)
Ausência de púbis	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,00 (10,00)
Forma irregular do púbis	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,00 (10,00)
1º dedo da pata traseira mais longo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	12,73 (81,82)	3,00 (20,00)
Polidactilia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	11,82 (63,64)	16,00 (50,00)

EXPOSIÇÃO SEQUENCIAL 6-MP E HU

INTERVALO ENTRE OS TRATAMENTOS: 4 HORAS

Anexo 55: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do esqueleto axial induzidas pelo tratamento sequencial de ratas grávidas (DG11) com NaOH→HU, 6-MP→SALINA e 6-MP→HU, com um intervalo de 4 horas entre os tratamentos. HU: 250 mg/kg, ip; 6-MP: 24 mg/kg, sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	NaOH→HU	6-MP→Salina	6-MP→HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	102	109	140
<i>Ninhadas (N)</i>	17	9	11	14
<i>Malformações (%):</i>				
CRÂNIO:				
Fusão do osso zigomático com processo jugular do maxilar	0,56 (5,88)	0,00 (0,00)	35,78 (90,91)	31,43 (85,71)
Mandíbula curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	6,42 (18,18)	0,00 (0,00)
Distancia maior entre os ossos da mandíbula	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	92,66 (100,00)	75,00 (92,86)
COLUNA VERTEBRAL:				
Forma irregular de 1-2 corpos vertebrais torácicos	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	6,42 (54,55)	0,71 (7,14)
Interrupção do processo de fechamento de 1-6 corpos vertebrais torácicos	0,00 (0,00)	7,84 (77,78)	15,60 (63,64)	24,29 (50,00)
1-2 corpos vertebrais torácicos divididos simetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,71 (7,14)
Centros de ossific. de 1-2 corpos vertebrais torácicos em forma de <i>dumb-bell</i>	4,52 (29,41)	0,00 (0,00)	6,42 (45,45)	7,86 (42,86)
Corpo de 1-2 vertebrais torácicas dividido assimetricamente	1,69 (11,76)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
1-6 corpos vertebrais torácicos desalinhados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,92 (9,09)	0,00 (0,00)
Forma irregular de 1-2 corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	2,94 (33,33)	3,67 (27,27)	2,14 (21,43)
1-2 corpos vertebrais torácicos deslocados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ausência de 3-6 corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Fusão de 1-2 corpos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Interrupção do processo de fechamento do corpo de 1-6 vertebrais lombares	0,00 (0,00)	1,96 (22,22)	18,50 (45,45)	8,57 (28,57)
1-2 corpos vertebrais lombares divididos simetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Forma irregular de 1-2 arcos vertebrais lombares	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)

(Cont.) Anexo 55: Tipos e frequências de anomalias dos ossos do esqueleto axial induzidas pelo tratamento sequencial de ratas grávidas (DG11) com NaOH→HU, 6-MP→SALINA e 6-MP→HU, com um intervalo de 4 horas entre os tratamentos. HU: 250 mg/kg, ip; 6-MP: 24 mg/kg, sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	NaOH→HU	6-MP→Salina	6-MP→HU
<i>Malformações (%):</i>				
COLUNA VERTEBRAL:				
Centros de ossific. de 1-2 corpos vertebrais lombares em forma de <i>dumb-bell</i>	1,69 (11,76)	0,00 (0,00)	0,92 (9,09)	6,43 (50,00)
Corpo de 1-2 vertebbras lombares dividido assimetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,92 (9,09)	0,00 (0,00)
1-2 corpos vertebrais lombares desalinhados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,83 (18,18)	2,86 (28,57)
Forma irregular de 1-2 arcos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	14,71 (55,56)	0,92 (9,09)	7,14 (28,57)
Posição irregular de 1-2 arcos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Forma irregular de 1-4 corpos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	0,98 (11,11)	9,17 (27,27)	13,57 (42,86)
Interrupção do processo de fechamento de 1-4 corpos vertebrais sacrais	0,00 (0,00)	1,96 (22,22)	18,35 (54,55)	27,86 (57,14)
1-4 corpos vertebrais sacrais divididos simetricamente	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
1-2 corpos vertebrais sacrais desalinhados	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,43 (14,29)
Forma irregular de 1-2 corpos vertebrais caudais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,57 (7,14)
Interrupção do processo de fechamento de 1-2 corpos vertebrais caudais	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,29 (7,14)

Anexo 56: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros anteriores induzidas pelo tratamento sequencial de ratas grávidas (DG11) com NaOH→HU, 6-MP→SALINA e 6-MP→HU, com um intervalo de 4 horas entre os tratamentos. HU: 250 mg/kg, ip; 6-MP: 24 mg/kg, sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	NaOH→HU	6-MP→Salina	6-MP→HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	102	109	140
<i>Ninhadas (N)</i>	17	9	11	14
<i>Malformações (%):</i>				
Ulna torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,75 (9,09)	0,00 (0,00)
Ausência de ulna	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Posição irregular da ulna	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,92 (9,09)	0,00 (0,00)
Ulna mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,59 (9,09)	0,00 (0,00)
Constricção da ulna	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Úmero torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,92 (9,09)	0,00 (0,00)
Ausência de úmero	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Osso rádio torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,67 (9,09)	0,00 (0,00)
Osso rádio mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,67 (9,09)	0,00 (0,00)
Ausência do processo deltoide	23,16 (82,35)	32,24 (100,00)	1,83 (9,09)	0,00 (0,00)
Forma irregular do processo deltoide	0,00 (0,00)	0,74 (8,33)	3,67 (27,27)	5,71 (35,71)
Processo deltoide mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Processo deltoide menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Ausência do 3º dedo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,92 (9,09)	0,00 (0,00)
Ausência do 4º dedo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,83 (9,09)	0,00 (0,00)
Fusão entre 2º e 3º dedos - c/ ou s/ fusão de metacarpos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,92 (9,09)	0,00 (0,00)
Fusão entre 3º e 4º dedos - c/ ou s/ fusão de metacarpos	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,92 (9,09)	0,00 (0,00)

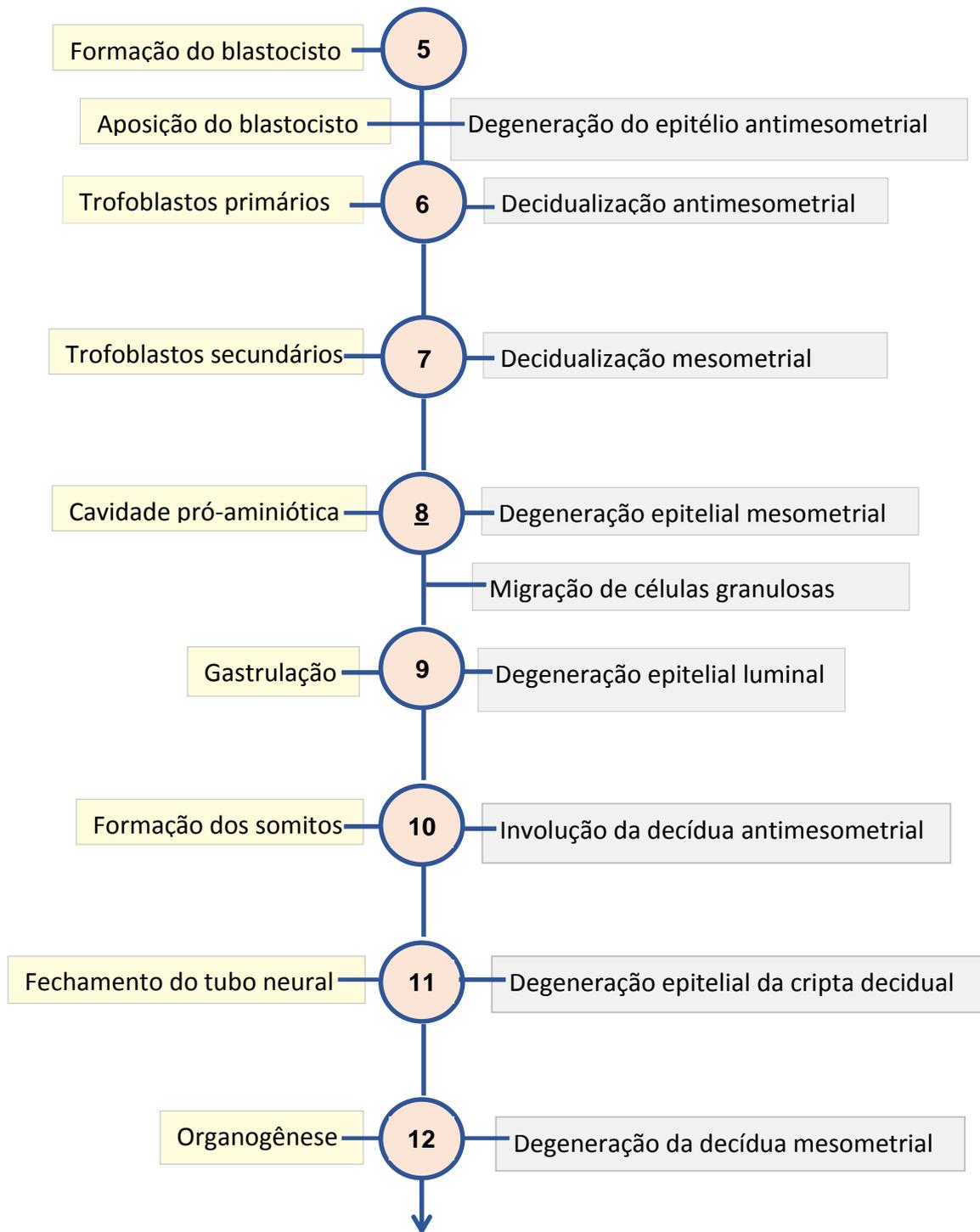
Anexo 57: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros posteriores induzidas pelo tratamento sequencial de ratas grávidas (DG11) com NaOH→HU, 6-MP→SALINA e 6-MP→HU, com um intervalo de 4 horas entre os tratamentos. HU: 250 mg/kg, ip; 6-MP: 24 mg/kg, sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	NaOH→HU	6-MP→Salina	6-MP→HU
<i>Fetos vivos (N)</i>	177	102	109	140
<i>Ninhadas (N)</i>	17	9	11	14
<i>Malformações (%):</i>				
Fusão do ílio com ísquio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,92 (9,09)	0,00 (0,00)
Forma irregular do ílio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,50 (27,27)	0,00 (0,00)
Constricção no ílio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,92 (9,09)	0,00 (0,00)
Ísquio torto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Forma irregular do ísquio	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,71 (7,14)
Ísquio menor	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,92 (9,09)	0,00 (0,00)
Ausência de púbis	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Forma irregular do púbis	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,83 (9,09)	0,00 (0,00)
Ausência de fêmur	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	2,75 (18,18)	0,00 (0,00)
Fêmur mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	15,60 (36,36)	0,71 (7,14)
Constricção no fêmur	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,83 (9,09)	0,00 (0,00)
Fíbula torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,83 (18,18)	0,00 (0,00)
Fíbula mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,92 (9,09)	0,00 (0,00)

(Cont.) Anexo 57: Tipos e frequências de anomalias dos ossos dos membros posteriores induzidas pelo tratamento sequencial de ratas grávidas (DG11) com NaOH→HU, 6-MP→SALINA e 6-MP→HU, com um intervalo de 4 horas entre os tratamentos. HU: 250 mg/kg, ip; 6-MP: 24 mg/kg, sc.

PARÂMETROS AVALIADOS	TRATAMENTO			
	NADA	NaOH→HU	6-MP→Salina	6-MP→HU
<i>Malformações (%):</i>				
Tíbia torta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	3,67 (18,18)	1,43 (14,29)
Ausência de tíbia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	4,59 (27,27)	1,43 (14,29)
Forma irregular da tíbia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,71 (7,14)
Tíbia mais curta	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	7,34 (18,18)	8,57 (14,29)
Tíbia mais fina	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,92 (9,09)	0,00 (0,00)
Constricção na tíbia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,43 (14,29)
1º dedo mais longo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	28,44 (27,27)	22,86 (64,29)
1º dedo mais curto	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,83 (9,09)	0,00 (0,00)
Polidactilia	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	23,85 (63,64)	59,29 (85,71)
Fusão entre 1º e 2º dedo	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,92 (9,09)	0,71 (7,14)

Dias pós-concepção



(Adaptado de PAMPFER AND DONNAY, 1999)

Anexo 58: Cronograma dos processos de implantação e decidualização (em dias pós-concepção), em ratos.

Anexo 59: Desenvolvimento embrionário de ratos no período de implantação (DGs 5 a 7 pós-concepção), de acordo com a descrição de HEBEL & STROMBERG (1986). O dia da intervenção (DG10) encontra-se identificado em azul.

DIAS DE GESTAÇÃO (DG)	EVENTOS
DG5	<ul style="list-style-type: none"> - Maioria dos blastocistos encontram-se livres da zona pelúcida e próximos à superfície uterina. Cada blastocisto está posicionado em uma depressão epitelial rasa, do lado antimesometrial do corno uterino. - Blastocistos entram em contato com a superfície de uma depressão do epitélio do lume uterino, do lado antimesometrial, com suas MCIs orientadas mesometrialmente. - Desenvolvimento de protusões apicais citoplasmáticas no blastocisto.
DG6	<ul style="list-style-type: none"> - Alongamento do blastocisto e formação da câmara de implantação. - O blastocisto toca o epitélio uterino em muitos pontos, com interdigitação entre os microvilos trofoblásticos e os de células epiteliais – Aposição. - Decidualização. - Desprendimento de células epiteliais em torno da câmara de implantação e fagocitose dessas células por células trofoblásticas – exposição da membrana basal.
DG6/7	<ul style="list-style-type: none"> - Diferenciação do blastocisto. No polo mesometrial, células trofoblásticas em proliferação formam o cone ectoplacentário. Dentro da MCI um grupo central de células forma o nódulo ectodérmico, enquanto células subjacentes formam o endoderma. Ambas as porções movem-se para dentro da blastocele – Formação do ovo cilíndrico.
DG7	<ul style="list-style-type: none"> - Formação do endoderma parietal (distal), a partir das bordas do endoderma visceral . - Separação entre endoderma distal e células trofoblásticas por uma membrana (membrana de Reichert). - Processo de decidualização prossegue. - Células trofoblásticas penetram a lâmina basal.

(Cont.) Anexo 59: Desenvolvimento embrionário de ratos no período pós-implantação (DGs 8 a 11, pós-concepção), de acordo com a descrição de HEBEL & STROMBERG (1986). O dia da intervenção (DG10) encontra-se identificado em azul.

DIAS DE GESTAÇÃO (DG)	EVENTOS
<p>DG8</p>	<p><u>Crescimento e diferenciação do embrião:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Alongamento do cone ectoplacentário e do ovo cilíndrico. - A cavidade blastocística se transforma em cavidade do saco vitelino. - Dentro do ectoderma aparecem espaços que crescem e coalescem, formando a cavidade pró-amniótica. - Entipia - ectoderme envolvido pelo endoderma, e disco germinativo adquire formato de taça. <p><u>Início da gastrulação:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Formação da linha primitiva - Mesoderma começa a ser formado, com a migração de células provenientes do ectoderma para a linha primitiva. - Mesoderma recém-formado prolifera-se rapidamente, avançando contra o ectoderma (na borda entre o ectoderma extraembrionário e o ectoderma primitivo), e formando a fenda amniótica caudal (que se projeta para dentro da cavidade pró-amniótica). <p><u>Início do desenvolvimento da placenta e membranas fetais:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Neste momento, ao longo da superfície antimesometrial, o embrião está relacionado ao tecido materno através de uma camada de células gigantes derivadas do trofoblasto.
<p>DG8/9</p>	<p><u>Prosseguimento do desenvolvimento da placenta e membranas fetais:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Uma camada de células se estende a partir do endoderma distal, formando a parede mais externa da cavidade vitelina (separada do trofoblasto pela membrana de Reichert). - Na base do cone ectoplacentário, este epitélio funde-se com a porção periférica do ectoderma que cobre a parede do saco vitelino. - O saco vitelino circunda parcialmente o celoma extraembrionário (exoceloma), que é inicialmente localizado ao longo do aspecto dorsal (mesometrial) do embrião.

(Cont.) Anexo 59: Desenvolvimento embrionário de ratos no período pós-implantação (DGs 8 a 11, pós-concepção), de acordo com a descrição de HEBEL & STROMBERG (1986). O dia da intervenção (DG10) encontra-se identificado em azul.

DIAS DE GESTAÇÃO (DG)	EVENTOS
DG9	<p><u>Prosseguimento do desenvolvimento embrionário:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Formação do arquêntero a partir do endoderma da região em forma de taça. - A linha primitiva ainda é observada na região caudal. - Na fenda aminiótica caudal, o tecido mesodérmico se prolifera. Uma porção antimesometrial da cavidade pró-aminiótica é separada da cavidade ectoplacentária, formando a cavidade aminiótica definitiva. - Dentro do mesoderma uma nova cavidade é formada - celoma extraembrionário. - Início da formação do alantoide, que cresce rapidamente através do celoma extraembrionário em direção ao cone ectoplacentário (será parte do tecido mesodérmico vascularizado da placenta). - Dentro do embrião, o mesoderma se estende de cada lado da placa notocordal, como duas asas laterais. As porções paraxial e lateral ainda não estão separadas. O mesoderma se divide, perifericamente, nas camadas somática e esplâncnica. - As pregas neurais se elevam. - As folhas de mesoderma laterais, ao nível do futuro primeiro somito, encontram-se parcialmente divididas em placa somática mediana e porção pericárdica lateral (unida às camadas mesodérmicas do âmnio e do saco vitelino). - As placas pericárdicas tomam uma posição mediana e seus espaços intramesodérmicos coalescem, formando a cavidade pericárdica. - Formação do coração a partir do primórdio lateral e do ventrículo médio. <p><u>Prosseguimento do desenvolvimento da placenta e membranas fetais:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Células decíduais mesometriais se degeneram, ou se fundem formando células gigantes maternas. - O sangue materno flui entre a decídua e as células trofoectodérmicas, e depois, dentro do cone ectoplacentário. - Aparecimento de ilhas de sangue dentro do mesoderma subjacente ao endoderma visceral do saco vitelino. Desaparecimento da parede parietal do saco vitelínico e da membrana de Reichert. - O mesoderma alantóico cresce através do celoma extraembrionário.

(Cont.) Anexo 59: Desenvolvimento embrionário de ratos no período pós-implantação (DGs 8 a 11, pós-concepção), de acordo com a descrição de HEBEL & STROMBERG (1986). O dia da intervenção (DG10) encontra-se identificado em azul.

DIAS DE GESTAÇÃO (DG)	EVENTOS
<p style="text-align: center;">D R A T A M E N T O</p> <p style="text-align: center;">DG10</p>	<p><u>Prosseguimento do desenvolvimento embrionário:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Vasos sanguíneos começam a ser formados e a circulação é iniciada. - O alantoide estabelece contato com o cório. - Início da formação dos somitos, com a formação de 0-4 somitos, mais ou menos ao mesmo tempo. - Formação do tubo intestinal em embriões de 2 somitos. O intestino anterior é uma elevação do ectoderma, em forma de cone. <p><u>Prosseguimento do desenvolvimento da placenta e membranas fetais:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - O embrião torna-se fechado pela cavidade amniótica, que é circundada pelo exoceloma. - Desaparecimento da cavidade ectoplacentária. - Formação de uma lâmina, a partir do epitélio da cavidade ectoplacentária e do mesoderma extraembrionário (mesoderma coriônico), que separa o agora mesoderma alantoico, do sangue materno que preenche a lacuna ectoplacentária.

(Cont.) Anexo 59: Desenvolvimento embrionário de ratos no período pós-implantação (DGs 8 a 11, pós-concepção), de acordo com a descrição de HEBEL & STROMBERG (1986). O dia da intervenção (DG10) encontra-se identificado em azul.

DG11

Prosseguimento do desenvolvimento embrionário:

- Embriões apresentam de 4 -13 somitos.
- Em embriões de 5 somitos, as cavidades pericárdicas direita e esquerda coalescem na frente, abaixo da placa neural nascente.
- Inicialmente, a fenda neural está aberta. Mais tarde, o fechamento começa, a partir da porção central.
- Pró- e mesencéfalo tornam-se visíveis.
- A vesícula optica é formada. A placa nasal aparece como uma invaginação coberta por epitélio.
- O coração adquire forma de S e está conectado com o primeiro e segundo arcos aórticos.
- A primeira bolsa faríngeal está em contato com o ectoderma. As membranas faríngeais se rompem.
- A notocorda perde a conexão com o ectoderma. Intestinos anterior e posterior tornam-se visíveis, e a conexão com o saco vitelino é ampla.
- O primeiro trabéculo do fígado e o pâncreas dorsal aparecem. A terminação caudal do tubo intestinal está alargada para formar a cloaca.
- O investimento da pata dianteira é formado como uma crista longitudinal.

Prosseguimento do desenvolvimento da placenta e membranas fetais:

- O cone ectoplacentário se estende lateralmente formando um disco.
- A lâmina coriônica é penetrada por vasos fetais.
- A placenta logo consiste de: porção labiríntica interna, contendo vasos maternos e fetais; zona juncional externa (espongiotrofoblasto), contendo apenas vasos maternos.
- Formação de vilos sobre o ectoderma adjacente à porção mesometrial do saco vitelino (esplancopleura), que se tornam vascularizados por vasos sanguíneos fetais.
- Dentro da porção antimesometrial do saco vitelino o suprimento vascular é pobre, e a superfície permanece lisa.
- Dentro das cordas trabeculares do labirinto, o sangue materno penetrado através da zona juncional, circula. Os trabéculos são cobertos por células trofoblásticas (de origem coriônica) e contém centros vasculares que, coletivamente, constituem a circulação alantóica periférica.