

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**Avaliação dos efeitos da vitamina D e da sua associação
com o cálcio sobre o desempenho reprodutivo,
desenvolvimento embriofetal e integridade do DNA em
camundongos *Swiss***

Mestranda: Silvia Cordeiro das Neves

Orientador: Rodrigo Juliano Oliveira

Abril/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Programa de Pós-graduação em Farmácia

Silvia Cordeiro das Neves

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Farmácia da Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul
como requisito para obtenção do
título de Mestre.

Orientador: Rodrigo Juliano Oliveira

Abril/2017

Silvia Cordeiro das Neves

Avaliação dos efeitos da vitamina D e da sua associação com o cálcio sobre o desempenho reprodutivo, desenvolvimento embrionário e integridade do DNA em camundongos *Swiss*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito para obtenção do título de Mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Prof^a. Dra. Marciana Sanabria
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Prof^a. Dra. Karine de Cássia Freitas Gielow
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Abril/2017

Dedicatória

Aos meus pais por todo amor, carinho e respeito que sempre tiveram comigo e por sempre me incentivarem a correr atrás dos meus sonhos e nunca desistir. Muito obrigada por tudo. Apesar de não estarem presente fisicamente, sei que de onde estiverem estão torcendo e vibrando com mais essa etapa concluída. Amo vocês.

Agradecimento

Agradeço a Deus por me proporcionar boas oportunidades na vida e sempre conduzir meu caminho me dando forças para prosseguir nas dificuldades.

Ao meu orientador Rodrigo por todo ensinamento transmitido, por toda paciência e disponibilidade na produção do meu trabalho e principalmente pela oportunidade de poder cursar um mestrado.

Ao meu amigo Rodrigo que sempre me apoiou e acreditou em mim me incentivando a sempre melhorar, que sempre cuidou de mim quando eu precisei. Pelas viagens, vários almoços e jantares. Enfim por ser minha família em Campo Grande. Muito obrigada por tudo.

A Daniela que me ajudou principalmente nos meus momentos de maior estresse, por sempre me acalmar e incentivar a continuar e acreditar em mim. Pela ajuda na conferência das minhas diversas tabelas. Enfim por toda amizade e amor que sempre teve por mim.

As minhas amigas Aline e Edna as irmãs que a vida me deu, por todo incentivo, por sempre vibrarem comigo no sucesso e por sempre estarem presente quando eu precisei. Amo vocês.

Ao meu amigo Willian pode sempre me incentivar e acreditar em mim, por ouvir minha lamentações e nunca reclamar. Obrigada por tudo.

Aos colegas e técnicos do laboratório por toda ajuda durante esse processo.

As amigas Bruna, Juliana, Joyner, Raissa e Yasmim por toda ajuda durante os experimentos, por toda risada e pão com mortadela depois de um dia todo no laboratório. Obrigada meninas.

As minhas amigas Jô Ribes, Kelly e Rose que me apoiaram quando decide mudar de vida e que sempre me acolhem quando decido voltar para casa nos feriados e férias.

As professoras Karine de Cássia Freitas Gielow e Marciana Sanabria que aceitaram compor minha banca de defesa.

A agência financiadora Capes.

SUMÁRIO

1. Revisão Bibliográfica	1
1.1. Vitamina D	1
1.2. Cálcio	4
2. Ensaio Biológicos	5
2.1 Ensaio de Genotoxicidade.....	5
2.2 Ensaio de Teratogênese	6
3. Objetivos	118
3.1 Objetivos específicos	118
4. Referências	129
Manuscrito.....	1945
6 - Referências	3228
7. Considerações Gerais	3634
Anexos	3732

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Desenvolvimento ponderal das fêmeas tratadas com vitamina D e vitamina D associada ao cálcio.....	37 <u>32</u>
Tabela 2. Pesos absoluto e relativo dos órgãos das fêmeas tratadas com vitamina D e vitamina D associada a cálcio.....	38 <u>33</u>
Tabela 3. Parâmetros reprodutivos relativos as fêmeas tratadas com vitamina D e vitamina D associada ao cálcio.....	39 <u>34</u>
Tabela 4. Relação e frequência de malformações externas na prole de fêmeas tratadas com vitamina D e vitamina D associada a cálcio.	41 <u>36</u>
Tabela 5. Relação e frequência de malformações viscerais na prole de fêmeas tratadas com vitamina D e vitamina D associada a cálcio.	43 <u>38</u>
Tabela 6. Relação e frequência de malformações esqueléticas na prole de fêmeas tratadas com vitamina D e vitamina D associada a cálcio.	44 <u>39</u>
Tabela 7. Frequência de micronúcleos no 11º, 12º e 13º dias gestacionais em fêmeas tratadas com vitamina D e vitamina D associada ao cálcio.	47 <u>42</u>

Resumo

Neves, Sílvia Cordeiro das. Avaliação dos efeitos da vitamina D e da sua associação com o cálcio sobre o desempenho reprodutivo, desenvolvimento embriofetal e integridade do DNA em camundongos *Swiss*. 2016. Dissertação (Mestrado Farmácia). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS.

A deficiência de Vitamina D durante a gravidez pode causar efeitos adversos no desenvolvimento embriofetal e pós-natais, além de acarretar aumento de doenças infecciosas, diabetes do tipo 1 e de associar-se ao desenvolvimento de síndrome metabólica e obesidade. Assim, tem se tornado cada vez mais comum a indicação da suplementação dessa vitamina em gestantes. No entanto, a literatura não indica dose de segurança para o período gestacional. Frente ao exposto o presente estudo avaliou os efeitos da vitamina D e da vitamina D associada ao cálcio no desempenho reprodutivo, no desenvolvimento embriofetal e na integridade do DNA em camundongos *Swiss*. Foram utilizados 140 camundongos fêmeas prenhes tratadas com vitamina D e vitamina D associada ao cálcio em dois experimentos com suplementação via intramuscular (i.m) nas doses de 600.000, 6.000.000 e 60.000.000 UI, e outro, via oral (v.o., gavage), nas doses de 6.000, 60.000 e 600.000 UI, em dose única no 10º dia gestacional. Os resultados demonstram que nas diferentes doses testadas (mesmo 10x maior que as recomendadas para suplementações em seres humanos), tanto pela via intramuscular quanto a via oral, a vitamina D e vitamina D associada a cálcio não alteraram o desempenho reprodutivo, o desenvolvimento embriofetal e nem a integridade do DNA. Esses resultados que são pioneiros reforçam a segura de uso desse tipo de suplementação inclusive durante a gestação.

Palavras-chave: Receptores de Calcitriol, anormalidades congênitas, dano ao DNA, [camundongos *Swiss*](#).

Formatado: Fonte: Itálico

Abstract

Neves, Silvia Cordeiro das. Evaluation of the effects of vitamin D and its association with calcium on reproductive performance, embryofetal development and DNA integrity in Swiss mice. 2016. Dissertação (Mestrado Farmácia). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS.

Vitamin D deficiency during pregnancy may have adverse effects on embryo-fetal and postnatal development, and the development of metabolic syndrome and obesity is associated an increase in infectious diseases and type 1 diabetes. Thus, vitamin D supplementation has been increasingly indicated for pregnant women. However, the literature fails to indicate the safe dose of this supplementation during the gestational period. Therefore, the present study assessed the effects of vitamin D and vitamin D combined with calcium on reproductive performance, embryo-fetal development, and DNA integrity in Swiss mice. A total of 140 pregnant female mice treated with vitamin D and vitamin D combined with calcium were used in two experiments. In one experiment, mice received intramuscular supplementation at doses of 600,000, 6,000,000, or 60,000,000 IU, whereas in the other experiment, mice received a single oral dose of 6,000, 60,000, or 600,000 IU on the 10th gestational day. The results show that neither intramuscularly nor orally administered vitamin D and vitamin D combined with calcium affected reproductive performance, embryo-fetal development, or DNA integrity at the different doses tested. These pioneering results confirm the safety of using this type of supplementation, including during pregnancy.

Keyword: Receptors, Calcitriol, Congenital Abnormalities, DNA Damage, [Swiss mice.](#)

Formatado: Inglês (Estados Unidos)

1. Revisão Bibliográfica

1.1. Vitamina D

A vitamina D é um grupo de secosteroides solúveis em gordura existente em duas formas: colecalciferol ou vitamina D₃ e ergocalciferol ou vitamina D₂. A vitamina D₃ é produzida por exposição ao sol e por meio de alimentos de origem animal, enquanto a vitamina D₂ é obtida somente por alimentos de origem vegetal (JONES, 2013).

A exposição ao sol em um adulto produz níveis de vitamina D entre 10.000 UI e 25.000 UI, mas para isso é preciso uma ligeira mudança da cor de toda a pele após 24h da ocorrência da exposição. Assim, durante o inverno ou em latitudes abaixo de 33°, onde a incidência solar é baixa, a produção de vitamina D₃ na pele é ausente ou muito baixa (HOLICK et al., 2011).

Existe um número limitado de alimentos com alta quantidade de vitamina D, entre eles estão o salmão, a sardinha, o atum e o óleo de fígado de bacalhau, além de cogumelos que são irradiados com UV para aumentar o teor de vitamina D₂ (HOLICK, 2007).

Produzida na pele ou adquirida por meio da dieta, a vitamina D é transportada para fora da membrana plasmática, ou seja, para o espaço extracelular. No plasma, a vitamina D e seus metabólitos são ligados à proteína ligadora de Vitamina D (*Vitamin D binding protein* - DBP) (HOLICK, 2007) e sofre duas alterações bioquímicas por meio da adição de dois grupos hidroxilas (DIXON; MASON, 2009). No fígado ocorre a primeira reação onde a vitamina D sofre hidroxilação no carbono 25 pela ação da enzima CYP27A1, formando a 25(OH)D, conhecida como pré-hormônio ou vitamina D circulante. A segunda reação ocorre pela ação da enzima CYP27B1 no rim onde a 25(OH)D é metabolizada formando a 1,25 dihidroxivitamina D (1,25(OH)D) conhecida como hormônio secoesteroide ou vitamina ativa (EBERT et al., 2006; CHAGAS et al., 2011).

A vitamina D apresenta funções como efeito pró-apoptótico, anti-angiogênico, anti-proliferação, anti-inflamatório e regula a resposta imunológica (CHIANG et al., 2011). As ações da vitamina D são mediada pelo VDR, um receptor nuclear de vitamina D que regula a expressão de vários genes envolvidos na homeostase do cálcio e do fosfato, regulação imunológica, diferenciação e proliferação celular

(WANG et al., 2012). Além de possuir ação autócrina e parácrina e por estar presente numa variedade de tecidos humanos pode afetar diretamente inúmeras células e funções (LIPS, 2006). O secosteroide 1,25(OH)D atuam como um interruptor molecular, ativando mais de 200 genes alvos, regulando assim diversas expressões gênicas o que demonstra o importante papel da vitamina D (CANNELL; HOLLIS, 2008, ENTRENAS et al., 2016).

O nível sérico de deficiência de vitamina D considerado normal é de 30 a 70 ng/mL. Assim, são considerados deficientes aqueles indivíduos que apresentam níveis séricos de 25(OH)D abaixo de 20 ng/ml e a insuficientes aqueles que apresentam níveis séricos entre 21-29 ng/ml (HOLICK et al., 2011). A literatura ainda relata que níveis séricos de 25(OH)D acima de 150 ng/ml são tóxicos (HOLICK, 2007). Considerado um evento raro, a intoxicação por suplementação de vitamina D é caracterizado por hipercalcêmica, hipercalcúria e nefrocalcinose e geralmente acontece por uma sobredosagem acidental (HOPPE et al., 1992; QUERFELD; MAK, 2010).

Baixos níveis de vitamina D durante a gravidez nos últimos anos tornou-se um problema significativo da obstetrícia moderna (YATES; CREW; WYRWOLL, 2007). Nas últimas décadas houve um aumento nas taxas de deficiência de vitamina D (LOOKER et al., 2008) e estudos indicam que 18 a 84% das mulheres grávidas são acometidas por deficiência de vitamina D em todo o mundo (DAWODU; WAGNER, 2007). Isso pode relacionar-se com efeitos adversos para a saúde materna, para o desenvolvimento embriofetal, (HARVEY et al., 2014; MOON; HARVEY; COOPER, 2015; MOON et al., 2016) e pós-natais, para o parto prematuro, (KARRAS et al., 2016) e a longo prazo para a saúde esquelética das crianças (JAVAID et al., 2006; HARVEY et al., 2014; MOON et al., 2016). Dentre as alterações registradas e associadas a baixos níveis séricos de vitamina D e gravidez destacam-se o aumento de complicações associadas como pré-eclampsia (BODNAR et al., 2007; ACHKAR et al., 2015; YATES; RACHEL; WYRWOLL, 2017), vaginose bacteriana (BODNAR; KROHN; SIMHAN, 2009; YATES; RACHEL; WYRWOLL, 2017) e diabetes gestacional (BURRIS; CAMARGO et al., 2014; YATES; RACHEL; WYRWOLL, 2017), além de restrição ao crescimento intra-uterino (GERNAND et al., 2014; CHEN et al., 2015, YATES; RACHEL; WYRWOLL, 2017). Dentre as alterações pós-natais cita-se um aumento nas taxas de asma (ZOSKY et al., 2014; YATES; RACHEL;

WYRWOLL, 2017), hipertensão (TARE et al., 2011; YATES; RACHEL; WYRWOLL, 2017), desenvolvimento neurológico comprometido (WHITEHOUSE et al., 2012; EYLES et al., 2013; HAWES et al., 2015; PET; BROUWER-BROLSMA, et al., 2016) ocorrência de raquitismo (DAWODU et al., 2005; HOLMES et al., 2009) e o atraso da mineralização óssea que persiste até os 9 anos de idade (JAVAID et al., 2006; HOLMES et al, 2009). Outros estudos preocupam-se também com o fato de crianças nascerem com deficiência de vitamina D adquirida ainda no útero, devido a relação entre os níveis circulantes de 25(OH)D materna e fetal (DAWODU; WAGNER, 2007).

Chama ainda atenção a associação entre a deficiência/insuficiência de vitamina D e o desenvolvimento da síndrome metabólica e obesidade, duas importantes questões de saúde pública atuais (ENTRENAS et al., 2016), bem como o fato de grande parte das gestantes terem dificuldade de voltar ao peso habitual após o parto (ULRICH; PETERMANN, 2016). Vale resaltar que mulheres com baixo níveis séricos de vitamina D no começo da gravidez, tendem a ganhar mais peso (MOON et al., 2016). A deficiência de vitamina D também está associada a doenças como o câncer, doença cardiovascular, hipertensão, acidente vascular cerebral (AVC), diabetes, esclerose múltipla, inflamação, gengivite, doença mental, dor crônica, osteoporose e artrite reumatóide (HOLICK, 2004; PETERLIK; CROSS, 2005; HOLICK, 2006; PETERLIK; CROSS, 2006; ZITTERMANN; GUMMERT, 2010). Estudos ainda indicam que doenças como gripe ou resfriado podem relacionar-se a deficiências sazonais de vitamina D (PETERLIK; CROSS, 2006). Assim, principalmente, em meses onde existe pouca incidência de sol, os resultados de uma suplementação diária de 2.000UI de vitamina D indicam importantes relatos de prevenção de resfriado e gripe (CANNEL et al., 2006).

Esse fatos indicam a necessidade e a importância da suplementação de vitamina D, principalmente porque a sua produção pela exposição à luz solar é insuficiente [por conta da vida moderna \(baixa exposição ao sol, por exemplo, dentre outros hábitos\)](#) bem como a obtenção por meio da dieta (HOLICK, 2007; JONES, 2013). Em adultos deficientes, sugere-se a suplementação com 50.000 UI de vitamina D, com doses semanais durante 8 semanas ou 6.000 UI de vitamina D por dia até atingir um nível sanguíneo de 25(OH)D acima de 30 ng/ml. Após a normalização faz-se a manutenção de 1.500 a 2.000 UI por dia (HOLICK et al., 2011).

Em casos de deficiência grave em que seja necessário aumentar rapidamente a concentração de vitamina D no sangue para um nível eficaz, como é o caso do raquitismo, o tratamento pode ser realizado com 600.000UI intramuscular em uma única dose (MONDAL et al., 2014).

Em mulheres grávidas ou que pensam em engravidar, [já que estudam indicam a importância de alto níveis de vitamina D para a fertilidade feminina estimulando a produção de progesterona, estradiol e estrona, além de reduzir a síndrome de ovário policístico \(VOULGARIS, et al., 2017; REIS et al., 2017\)](#) o nível de vitamina D deve ser verificado a cada três meses e se necessário a suplementação deve ser feita com 5.000UI ou mais por dia. Já em mulheres lactantes é necessário 7.000UI por dia, para garantir uma rica fonte de vitamina D no leite materno (CANNELL; HOLLIS, 2008). No entanto, a literatura pesquisada não possui estudos que demonstre a segurança dessas suplementações durante o período gestacional. Doses ainda mais altas podem ser requeridas no tratamento de pacientes com doenças autoimunes visto que esses metabolizam mal a vitamina D (MUSCOGIURI et al., 2016). [Diante desse estudo ter-se-á melhores condições de indicar a suplementação da vitamina D durante a gravidez.](#)

1.2. Cálcio

O cálcio é um dos elementos mais abundantes no corpo humano e funciona em processos fisiológicos, incluindo mineralização esquelética, contração muscular, transmissão de impulsos nervosos, coagulação sanguínea e secreção hormonal (VELDURTHY et al., 2016). Na metabolização e mineralização óssea do cálcio, a vitamina D desempenha um importante papel, assim quando os níveis de cálcio estão baixo existe um aumento na forma ativa de vitamina D na absorção de cálcio do intestino para normalizar para níveis ideais (VAZIRI et al., 2016). O sistema homeostático de cálcio-fosfato liga a vitamina D ao hormônio da paratireóide (PTH) controlando assim baixos níveis de cálcio e fósforo no sangue, regulando o aumento do PTH e estimulando o rim a produzir calcitriol (PRENTICE; GOLDBERG; SCHOENMAKERS, 2008; AVENELL; MAK; O'CONNELL, 2014; VAZIRI et al., 2016).

O uso de vitaminas ou suplementos de cálcio contendo vitamina D é recomendado atualmente, principalmente, para mulheres durante a gravidez para aumentar a absorção de vitamina D (HARVEY et al., 2014; LIU et al., 2017).

Mulheres durante a gravidez e a lactação ~~absovem precisam de~~ um elevado volume de cálcio. Na gravidez exige-se uma alta demanda de cálcio, principalmente, no terceiro trimestre da gravidez quando o osso fetal atinge seu maior pico de crescimento. Assim, há a necessidade de um grande aumento da absorção de elemento na mucosa intestinal da mãe. Nesse processo fisiológico existe um aumento na síntese do metabolismo da vitamina D ativa 1,25 (OH) D (SALLE et al., 2000; OLIVERI et al., 2004; VAZIRI et al., 2016).

2. Ensaio Biológicos

2.1 Ensaio de Genotoxicidade

Mudanças no material genético podem causar alterações fenotípicas que se expressam como eventos genotóxicos e/ou teratogênese (OLIVEIRA et al., 2015). Agentes como temperatura, vírus, radiações e substâncias químicas (SALZANO, 2002) podem aumentar a probabilidade de desenvolvimento desses eventos aumentado assim as taxas de lesões no DNA (OLIVEIRA et al, 2015). Falhas no processo de reparo no DNA, estilo de vida e defeitos genômicos hereditários também podem ocasionar essa alterações (TORRES-BUGARÍN et al., 2015) e assim derivar em doenças genéticas ou alterações congênitas.

Atraso na segregação cromossômica, devido a erros na fixação correta de microtúbulos do fuso no cinetócoro, na anáfase, pode causar instabilidade cromossômica e resultar em micronúcleos (SALMON et al., 2005; THOMPSON; COMPTON, 2011, VÁZQUEZ-DIEZ et al., 2016) e esse tipo de dano é conhecido como aneugênico (TORRES-BUGARÍN et al., 2015). A formação de micronúcleos pode ser observada também quando se tem um dano clastogênico, ou seja, os cromossomos sofrem quebras durante o processo de mitose (TORRES-BUGARÍN et al., 2015).

O ensaio do micronúcleo é um marcador genético muito utilizado (VÁZQUEZ-DIEZ et al., 2016) e considerado de grande importância para as agências de pesquisa em genética toxicológica. Ele é usado para quantificar a exposição a

agentes físicos e químicos, e permite inferir a capacidade carcinogênica de um composto em teste. Bem estabelecido, é capaz de detectar quebras e mau funcionamento no fuso mitótico durante a divisão celular (OLIVEIRA et al., 2009; KANG et al., 2013; NAVARRO et al., 2014). Logo, o ensaio do micronúcleo é de grande importância para avaliar a aneuploidia e/ou a clastogênese causada por compostos genotóxicos por meio de biomonitoramento (LE BIHANIC et al., 2016).

Um micronúcleo é identificado como um pequeno núcleo localizado no citoplasma em células que concluíram a divisão celular (LE BIHANIC et al., 2016), por isso devem ser analisados em hemácias jovens. Esses possuem forma arredondada e coloração características que facilitam a análise (OLIVEIRA et al., 2009; NAVARRO et al., 2014). Esse ensaio permite estudos agudos, crônicos e subcrônicos, pois pode utilizar sangue periférico o qual é coletado sem a necessidade de se fazer eutanásia. Quando do uso do sangue periférico, a coloração nesse tipo de estudo é por alaranjado de acridina, que exclui a possibilidade de artefatos não específicos gerados por coloração. O alaranjado de acridina se intercala com o DNA que emite uma fluorescência quando submetido à radiação ultravioleta, apontando assim os micronúcleos fixados no citoplasma dos eritrócitos (HAYASHI et al., 1990; OLIVEIRA et al., 2009; KANG et al., 2013). Em geral, as regiões ricas em RNA, onde a acridina se liga sem se intercalar, fluorescem em vermelho e as regiões ricas em DNA, quando a acridina se intercala, fluorescem em verde. Assim, torna-se fácil a identificação (HAYASHI et al., 1990, OLIVEIRA et al., 2009). Destaca-se ainda que esse é o bioindicador mais empregado quando se deseja analisar amostras repetidas de um mesmo animal ou indivíduo (HAYASHI et al., 1990).

A contagem se faz com a leitura de 2.000 eritrócitos, pois a classificação faz parte de um processo contínuo de passagem de um eritrócito jovem (policromático) a um eritrócito maduro (normocromático), a contagem é feita com esse número de eritrócitos para diminuir o número de classificações subjetivas (RABELO-GAY et al., 1991).

2.2 Ensaio de Teratogênese

No passado acreditava-se que o embrião ou feto estavam protegidos pela placenta e eram imunes à interferência ambiental. Mas, no final do século XIX a teratologia experimental constatou que riscos externos poderiam afetar o embrião e o feto. Houve então a diferenciação do termo hereditário de congênito, que eram considerados sinônimos. Assim, passou-se a correlacionar anomalia congênita como defeitos originados no processo de embriogênese independente de origem genética (hereditária) (RABELO-GAY et al., 1991).

Anomalias congênitas ou malformações congênitas são defeitos observados ao nascimento ou que ocorrem antes do nascimento e podem envolver vários órgãos como o coração, o fígado, os pulmões, os ossos, o trato [gastrointestinal](#), entre outros (WLODARCZYK, 2011). Podemos dividir em três categorias as causas das malformações congênitas: causas ambientais, genéticas e desconhecidas. Sendo que um percentual considerável das malformações congênitas desconhecidas é propenso a ter componentes ambientais e genéticos (BRENT, 2004) envolvidos ao mesmo tempo. Fatores ambientais podem ser agentes infecciosos, problemas mecânicos, condições maternas e produtos químicos, como medicamentos prescritos e radiação ionizante em altas doses (BRENT, 2004). Esse fatores são considerados agentes teratogênicos e podem modificar a morfologia fetal. O tipo e o risco de malformações provocadas por agentes teratogênicos podem ocorrer por fatores que incluem o estado embrionário, a dose de exposição, o metabolismo do fármaco ou do produto químico, o transporte placentário e as diferenças genéticas maternas ou fetais (AL-SALEEM; AL-JOBAIR, 2016).

Cerca de 70% das causas de malformações são desconhecidas, a maioria dos defeitos congênitos não tem causa clara (BLOM et al., 2006). Os teratógenos atuam por meio de mecanismo específicos de forma direta ou indireta podendo causar anormalidades no embrião/feto (ROGERS et al., 2000), interferindo em alterações da expressão gênica, nos processos de crescimento, morfogênese e na diferenciação celular. Sendo assim, eventos genotóxicos e teratogênicos podem se correlacionar visto que ambos decorrem de alterações fixadas no DNA (OLIVEIRA et al., 2009).

Descrições de teratógenos em seres humanos, de modo geral, são feitas quando as malformações já não podem ser prevenidas por meio de estudos retrospectivos (HOLMES, 2011). Dessa forma, a melhor forma de prevenir os

possíveis efeitos teratogênicos são os testes em animais, e esses são importantes para prevenir possíveis efeitos dos agentes químicos, físicos ou biológicos em seres humanos e por esse motivo devem ser ampliados, afim de alertar sobre efeitos adversos a prole de mamíferos (MOORE; PERSUAD, 1995; OLIVEIRA et al., 2009).

Os teratógenos podem influenciar o período gestacional em três diferentes janelas: I) no período de fertilização até a implantação; II) no momento da diferenciação de tecidos, órgãos e sistemas; e III) no crescimento celular e maturação (RABELO-GAY et al., 1991). Além disso a literatura discorre sobre o uso de dias específicos para se atingir o maior número de malformações. Isso, em geral, se deve ao fato, de se escolher um dia em que o maior número de tecidos e sistemas estejam em grande atividade morfogênica (OLIVEIRA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015). Assim, de acordo com a literatura o 10 dia gestacional [em camundongos](#) tem sido eleito para esse tipo de estudo (OLIVEIRA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015).

Segundo o *Guidelines for Reproduction Studies for Safety Evaluation of Drugs for Human Use*, para a avaliação do efeito tóxico de uma determinada substância no desenvolvimento pré-natal utiliza-se de fêmeas virgens, saudáveis, em peso e idade semelhantes e para que se possa administrar a substância testada no estágio de interesse é necessário identificar o dia 0 de gestação. Em camundongos, o dia 0 da gestação é detectado pela presença do tampão vaginal que é encontrado no dia da cópula e tampão é uma mistura de material ejaculado com células epiteliais corneificadas da vagina no período do estro (RABELO-GAY et al., 1991). No 18º dia gestacional é realizada a laparotomia, [sendo](#) essa retirada dos fetos ~~é~~-feita alguns dias antes do nascimento para a análise das perdas gestacionais e dos defeitos estruturais, pois recém nascidos malformados ou com baixa vitalidade são frequentemente mortos e canibalizados pela mães (GLEICH e FROHBERG, 1971). Após a laparotomia, os fetos são submetidos à análise de malformações externas e divididos para análise esquelética e análise visceral (RABELO-GAY et al., 1991).

As fêmeas são eutanasiadas por deslocamento cervical, após o período gestacional de 18 dias, seguido da retirada dos órgãos (coração, pulmão, fígado, rins, baço e placenta) que são pesados para análise de possível toxicidade materna. Uma histerectomia deve ser realizada para registro do número de implantes, número de fetos mortos e vivos e a presença de reabsorção. Os parâmetros de fertilidade são calculados baseados nesses dados: taxas de perdas pós-implantacionais

Formatado: Fonte: Itálico

(número de implantações – número de fetos vivos x 100/número de implantações); taxa de reabsorção (número de reabsorções x 100/número de implantações) avaliando assim o perfil reprodutivo (OLIVEIRA et al., 2009; GONÇALVES et al., 2013; DAVID et al., 2014; GONÇALVES et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015a).

Uma análise externa (cabeça, tronco, membros, cauda e genitais) deve ser realizada logo após a retirada dos fetos para verificar a vitalidade dos mesmos através de estímulos táteis, a presença/ausência de anomalias externas (conformação craniana, implantação das orelhas, presença de olhos fechados, boca adequadamente posicionada e com ausência de fendas, posição *in situ* dos membros anteriores e posteriores, número de dácilos, região torácica, abdominal e dorsal, presença de hemorragias, hematoma e defeito de fechamento de tubo neural, tamanho, forma e inserção da cauda). Além do tamanho e o peso dos fetos e sua sexagem (OLIVEIRA et al., 2009; GONÇALVES et al., 2013; DAVID et al., 2014; GONÇALVES et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015a).

Logo após a análise externa, os fetos devem ser distribuídos em dois grupos. O primeiro para a análise visceral, onde os fetos permanecem em solução de Bodian's e o segundo grupo para análise esquelética onde os fetos permaneceram em acetona.

Para a análise visceral são realizadas microdissecções propostas por Wilson (1965) e Taylor (1986) com modificações de Oliveira et al., (2009) e classificadas segundo Taylor (1986), e-Manson e Kang (1994), e Damasceno et al., (2008). O primeiro corte é realizado na região da cabeça entre a maxila e a mandíbula alcançando as regiões ~~cerebri~~ cerebral na sua porção distal; o segundo corte passa pela porção mediana das fossas nasais; o terceiro, sobre os olhos; e o quarto, na parte mais alta da abóbada craniana. É possível observar, por meio destes cortes, o polo cefálico, em seu terço superior, as órbitas e globos oculares, córtex e os ventrículos cerebrais: laterais, terceiro e quarto, e no polo cefálico, em seu terço médio, as narinas, palato e bulbo olfatório. Na região do pescoço um corte transversal deve ser realizado para exame do posicionamento e morfologia da traquéia, esôfago e da medula espinhal. Na região do tórax os cortes realizados são feitos na porção superior da cavidade abdominal, transversalmente, próximo ao diafragma. No sentido proximal, depois de retirada da porção superior do fígado, observa-se a integridade da superfície inferior da cúpula diafragmática, os vasos supra-hepáticos, a passagem da aorta e da veia cava inferior. Após a remoção do

diafragma, é possível também uma avaliação da superfície superior. Em seguida, por meio de torocotomia anterior, pode-se observar o timo e pulmões, bem como a área e o posicionamento do coração. Subseqüente ao exame e à retirada do timo, dos lobos pulmonares e das aurículas, observa-se as dimensões e a disposição dos grandes vasos da base do coração. [Para a](#) morfologia de coração deve ser realizado a microdissecção por meio de dois cortes longitudinais. Um destes, parte do ápice do coração, ventrículo esquerdo, ao encontro da válvula mitral, e [e a](#) ~~segundo~~ ~~segunda~~ parte da porção do ventrículo direito para a válvula tricúspide, o qual, por sua vez, permite ainda a observação do septo interventricular. As vias de saídas das grandes artérias são observadas com relação às cavidades ventriculares (OLIVEIRA et al., 2009).

A análise da cavidade abdominal, primeiro observa-se os lobos do fígado, a artéria aorta e veia cava inferior. Com a retirada dos lobos hepáticos, são visualizados o estômago, com as suas curvaturas, pâncreas, baço, duodeno e alças intestinais. Após a retirada das alças intestinais, pode-se observar o trato urogenital (OLIVEIRA et al., 2009).

Na região da pelve a análise possibilita a visualização das adrenais, os rins, a bexiga, os ureteres e as gônadas que confirmam o sexo externo. Em seguida, faz-se um corte transversal na região do hilo, permitindo a observação da papila renal (OLIVEIRA et al., 2009).

Para a análise esquelética, a preparação dos fetos é feita pelo método de diafanização e coloração por alizarina (coloração de ossos), segundo os procedimentos descritos por Staples e Schnell (1964) com modificações de Oliveira et al., (2009) e classificadas de acordo com Taylor (1986), Manson et al., (1982), Damasceno et al., (2008) e Oliveira et al., (2009). Esta análise permite identificar malformações, variações e ossificação reduzida dos ossos do crânio, das vértebras (cervicais, torácicas, lombares, sacrais e caudais), das costelas, do esterno (manúbrio, processo xifóide e centros esternais), dos membros anteriores (carpos, metacarpos e falanges), dos membros posteriores (tarsos, metatarsos e falanges) e da pélvis (DAMASCENO et al., 2008).

Todos os ossos da cabeça são examinados quanto ao tamanho, forma, adição ou ausência óssea e quantificação óssea. A análise da cabeça é realizada separando-se esta do restante do esqueleto e verificando-se a cabeça em vista superior, lateral e ventral (OLIVEIRA et al., 2009).

Formadas por um centro e dois arcos a análise da vértebra é feita quanto à adição ou ausência, fusão (entre os arcos e centros), malformações nos centros (fechamento interrompido, divisão simétrica ou assimétrica, forma irregular e ossificação adicional) e retardo ósseo (atraso no processo de ossificação). As vértebras analisadas são 7 cervicais (C1-C7), 13 torácicas (T1-T13), 6 lombares (L1-L6), 5 sacrais (S1-S5) e as caudais, que possuem número variável (OLIVEIRA et al., 2009).

A análise das costelas é realizada quanto ao número, comprimento, localização, fusão, forma e intensidade de ossificação. O número total de costelas torácicas de cada lado corresponde ao número de vértebras torácicas (DAMASCENO et al., 2008).

Seis pontos de ossificação são analisados no esterno adulto. Sendo assim, é avaliada a ausência ou adição do número dos centros esternais, fusão, forma, alinhamento e quantificação da calcificação dos mesmos (OLIVEIRA et al., 2009).

Na análise dos membros anteriores e posteriores, verifica-se a fusões dos ossos longos, alterações da forma, do comprimento ou ausência de ossos e sobreposições (DAMASCENO et al., 2008).

3. Objetivos

Avaliar os efeitos da vitamina D e da sua associação com o cálcio sobre o desempenho reprodutivo, desenvolvimento embrionário e integridade do DNA em camundongos *Swiss*

3.1 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da vitamina D e da sua associação com o cálcio sobre o desempenho reprodutivo por meio dos parâmetros reprodutivos.

Avaliar o efeito da vitamina D e da sua associação com o cálcio sobre o desenvolvimento embrionário por meio de ensaios de teratogênese.

Avaliar os efeitos da vitamina D e da sua associação com o cálcio sobre a integridade do DNA por meio do ensaio do micronúcleo em sangue periférico.

4. Referências Bibliográficas

ACHKAR, M.; DODDS, L.; GIGUÈRE, Y.; FOREST, J-C.; ARMSON, B.A.; WOOLCOTT, C.; AGELLON, S.; SPENCER, A.; WEILER, H.A. Vitamin D status in early pregnancy and risk of preeclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 212, pg. 511-517, 2015.

AL-SALEEM, A.; AL-JOBAIR, A.M.. Possible association between acetazolamide administration during pregnancy and multiple congenital malformations, **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 1471-1476, jun. 2016.

AVENELL, A.; MAK, J.C.; O'CONNELL, D. **Vitamin D and vitamin D analogues for preventing fractures in post-menopausal women and older men**. The Cochrane Database of Systematic Reviews, v. **14**, 2014.

BLOM, H.J.; SHAW, G.M.; DEN HEIJE, M.; FINNELL, R.H.. Neural tube defects and folate: Case far from closed. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, p.724-731, 2006.

BRENT, R.L.. Environmental causes of human congenital malformations: the pediatrician's role dealing with these complex clinical problems caused by a multiplicity of environmental and genetic factors. **Pediatrics**, v. 113, p. 957-968, 2004.

BRENT, R.L.; HOLMES, L.B. Clinical and basic science lessons from the thalidomide tragedy: what have we learned about the causes of limb defects? **Teratology**, v. 38, p. 241-251, 1988.

BODNAR, L.M.; CATOV, J.M.; SIMHAN, H.N.; HOLICK, M.F.; POWERS R.W.; ROBERTS, J.M. Maternal Vitamin D Deficiency Increases the Risk of Preeclampsia. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, p. 3517-3522, 2007.

BODNAR, L.M, KROHN, M.A.; SIMHAN, H.N. Maternal Vitamin D Deficiency Is Associated with Bacterial Vaginosis in the First Trimester of Pregnancy. **Journal of Nutrition**, v. 139, p. 1158=7-1161, 2009.

BURRIS, H.H.; CAMARGO, C.A. Vitamin D and Gestational Diabetes Mellitus. **Current diabetes reports**, v. 14, p. 451-451, 2014.

CANNELL, J.J.; HOLIS, B.W.. Use of Vitamin D in Clinical Practice—, **Alternative Medicine Review**, v. 13, p.6-20, mar. 2008.

CHAGAS, C.E.; BASSOLI, B.K.; DE SOUZA, C.A.; DEMINICE, R.; JORDÃO JÚNIOR, A.A.; PAIVA, S.A.; DAGLI, M.L.; ONG, T.P.; MORENA, F.S.

- Folic acid supplementation during early hepatocarcinogenesis: cellular and molecular effects. **International journal of cancer**, v. 129, p. 2073-2082, nov. 2011.
- CHEN, Y-H.; FU, L.; HAO, J-H.; YU, Z.; ZHU, P.; WANG, H.; XU, Y-Y.; HANG, C.; TAO, F-B.; XU, D-X. Maternal Vitamin D Deficiency During Pregnancy Elevates the Risks of Small for Gestational Age and Low Birth Weight Infants in Chinese Population. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 100, p. 1912-1919, 2015.
- CHIANG, K.; YE, C.N.; CHEN, M.F.; CHEN, T.C. Hepatocellular carcinoma and vitamin D: a review. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 26, p. 1597-1603, nov.2011.
- DAMASCENO, D.C.; KEMPINAS, W.G.; VOLPATO, G.T.; CONSONNI, M.; RUDGE, M.V.C.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Anomalias congênitas: estudos experimentais. **Coopmed Editora Médica**, Belo Horizonte, 2008.
- DAVID, N.DE.; MAURO, M.O.; GONÇALVES, C.A.; PESARINI, J.R.; STRAPASSON, R.L.B.; KASSUYA, C.A.L.; STÉFANELLO, M.É.A.; CUNHA-LAURA, A.L.; MONREAL, A.C.D.; OLIVEIRA, R.J. Gochnatia polymorpha ssp. floccosa: Bioprospecting of an anti-inflammatory phytotherapy for use during pregnancy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, p. 370-379, 2014.
- DAWODU, A.; AGARWAL, M.; SANKARANKUTTY, M.; HARDY, D.; KOCHIYIL, J.; BADRINATH, P.. Higher prevalence of vitamin D deficiency in mothers of rachitic than nonrachitic children. **Journal of Pediatrics**, v. 147, p. 109–111, 2005.
- DAWODU, A.; WAGNER, C.L. Mother-child vitamin D deficiency: an international perspective. **Archives of Disease in Childhood**, v. 92, p. 737-740, 2007.
- DIXON, K.M.; MASON, R.S. Vitamin d. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, p. 982–985, maio 2009.
- EBERT, R.; SCHÜTZE, N.; ADAMSKI, J.; JAKOB, F. Vitamin D signaling is modulated on multiple levels in health and disease. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 248, p. 149–159, mar. 2006.
- ENTRENAS, A.O.; TUBIO, D.L.; NAVARRO, F.L.; CARVAJAL, F.M.; ADAN, N.G.; BAUTISTA, M.R.; OSINAGA, J.A. Relationship Between Vitamin D Deficiency and the Components of Metabolic Syndrome in Patients with Morbid Obesity, Before and 1 Year After Laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass or Sleeve Gastrectomy. **Obesity Surgery**, nov.2016.
- EYLES, D.W.; BURNE, T.H.J.; MACGRATH, J.J. Vitamin D, effects on brain development, adult brain function and the links between low levels of vitamin D and neuropsychiatric disease. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 34, p. 47-64, 2013.
- GLEICH, J., FROBERG, W. IN: D.NEUBERT, MERKER, A.J., RWASIGROCH, J.E. (ed). Stuttgart: Georg Thieme Publishers, 1977.
- GERNAND, A.D.; SIMHAN, H.N.; CARITIS, S.; BODNAR, L.M. Maternal Vitamin D Status and Small-for-Gestational-Age Offspring in Women at High Risk fo Preeclampsia. **Obstetrics and Gynecology**, v. 123, p. 40-48, 2014.
- GONÇALVES, C.A.; SIQUEIRA, J.M.; CAROLLO, C.A.; MAURO, M.O.; DAVID, N.; CUNHA-LAURA, A.L.; MONREAL, A.C.D.; CASTRO, A.H.; FERNANDES, L.; CHAGAS, R.; AUHAREK, S.A.; OLIVEIRA, R.J. Gestational exposure to *Byrsonima*

verbascifolia: Teratogenicity, mutagenicity and immunomodulation evaluation in female Swiss mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 843-850, 2013.

GONÇALVES, C.A.; SILVA, N.L.; MAURO, M.O.; DAVID, N.; CUNHA-LAURA, A.L.; AUHAREK, S.A.; MONREAL, A.C.D.; VIEIRA, M.C.; SILVA, D.B.; SANTOS, F.J.L.; SIQUEIRA, J.M.; OLIVEIRA, R.J. Evaluation of mutagenic, teratogenic, and immunomodulatory effects of *Annona nutans* hydromethanolic fraction on pregnant mice. **Genetic Molecular Research**, v. 13, p. 4392-4405, 2014.

HARVEY, N.C.; HOLROYD, C.; NTANI, G.; JAVAID, K.; COOPER, P.; MOON, R.; COLE, Z.; TINATI, T.; GODFREY, K.; DENNISON, E.; BISHOP, N.J.; BAIRD, J.; COOPER, C. Vitamin D supplementation in pregnancy: a systematic review. **Health Technology Assessment**, v. 18, p. 1-190, 2014.

HAWES, J.E.; TESIC, D.; WHITEHOUSE, A.J.; ZOSKY, G.R.; SMITH, J.T.; WYRWOLL, C.S. Maternal vitamin D deficiency alters fetal brain development in the BALB/c mouse. **Behavioural Brain Research**, v. 286, p. 192-200, 2015.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNDI, T.; ISHIDATE JUNIOR, M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine Orange-coated slides. **Mutation Research**, v. 245, p. 245-249, 1990.

HOLICK, M.F. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, p. 1678S-1688S, 2004.

HOLICK, M.F. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 81, p. 353-373, 2006.

HOLICK, M.F. Vitamin D deficiency. **The News England Journal of Medicine**, v. 357, p. 266-281, jul. 2007.

HOLICK, M.F.; BINKLEY, N.C.; BISCHOFF-FERRARI, H.A.; GORDON, C.M.; HANLEY, D.A.; HEANEY, R.P.; MURAD, M.H.; WEAVER, C.M. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: An endocrine society clinical practice guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, p. 1911-1930, 2011.

HOLMES, A.V.; BARNES, M. S.; ALEXANDER, D.H.; MCFAUL, P.; WALLACE, J.M.W. Vitamin D deficiency and insufficiency in pregnant women: a longitudinal study. **British Journal of Nutrition**, v. 102, p. 876-881, 2009.

HOPPE, B.; GNEHM, H.E.; WOPMANN, M.; NEUHAUS, T.; WILLI, U.; LEUMANN, E. Vitamin D poisoning in infants: a preventable cause of hypercalciuria and nephrocalcinosis. **Schweizerische medizinische Wochenschrift**, v. 122, p. 257-262, fev. 1992.

JAVAID, M.K.; CROZIER, S.R.; HARVEY, N.C.; GALE, C.R.; DENNISON, E.M.; BOUCHER, B.J.; ARDEN, N.K.; GODFREY, K.M.; COOPER, C.; PRINCESS ANNE HOSPITAL STUDY GROUP. Maternal vitamin D status during pregnancy and childhood bone mass at age 9 years: a longitudinal study. **Lancet**, v. 367, p. 36-43, jan.2006.

JONES, G. Extrarenal vitamin d activation and interactions between vitamin d2, vitamin d3, and vitamin d analogs. **Annual Review of Nutrition**, v. 33, p. 23-44, jul. 2013.

KANG, S.H.; KWON, J.Y.; LEE, J.K.; SEO, Y.R. Recent advances in in vivo genotoxicity testing: prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. **Journal of Cancer Prevention**, v. 18, p. 277-288, 2013.

KARRAS, S.N.; FAKHOURY, H.; MUSCOGIURI, G.; GRANT, W.B.; OUWELAND, J.M.; CALAO, A.M.; KOSTA, K.. Maternal vitamin D levels during pregnancy and neonatal health: evidence to date and clinical implications. **Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease**, v. 4, p. 124-135, 2016.

LE BIHANIC, F.; DI BUCCHIANICO, S.; KARLSSON, H.L.; DREIJ, K.. In vivo micronucleus screening in zebrafish by flow cytometry, **Mutagenesis**, v. 31, p. 643-653, nov.2016.

LIPS, P. Vitamin D physiology. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 92, p. 4-8, 2006.

LITONJUA, A.A.; WEISS, S.T. Is vitamin D deficiency to blame for the asthma epidemic? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 120, p. 1031–1035, 2007.

LOOKER, A.C.; PFEIFFER, C.M.; LACHER, D.A.; SCHLEICHER, R.L.; PICCIANO, M.F.; YETLEY, E.A. Serum 25-hydroxyvitamin D status of the US population: 1988–1994 versus 2000–2004. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, p. 1519-1527, 2008.

LIU, Y.; JIN, Q.; BAO, Y.; LI, S.; WANG, J.; QUI, L. Investigation of the vitamin D nutritional status in women with gestational diabetes mellitus in Beijing. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, 2017.

MANSON, J.M.; ZENICK, H.; COSTLOW, R.D. Teratology test methods for laboratory animals. In: Hayes, A.W. (Ed.), **Principles and methods of toxicology**, Raven Press, New York, 1982.

MANSON, J.M.; KANG, Y.J. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: Hayes, A.W. (ED). **Principles and Methods of Toxicology**. Raven Press, New York, 1994.

MCGRATH, J.; SAARI, K.; HAKKO, H.; JOKELAINEN, J.; JONES, P.; JARVELIN, M.R.; CHANT, D.; ISOHANNI, M. Vitamin D supplementation during the first year of life and risk of schizophrenia: a Finnish birth cohort study. **Schizophrenia Research**, v. 67, p. 237–245, 2004.

MONDAL, K.; SETH, A.; MARWAHA, R.K.; DHANWAL, D.; ANEJA, S.; SINGH, R.; SONKARS, P. A Randomized Controlled Trial on Safety and Efficacy of Single Intramuscular versus Staggered Oral Dose of 600 000IU Vitamin D in Treatment of Nutritional Rickets. **Journal of tropical pediatrics**, v. 60, p. 203-210, jun. 2014.

MOON, R.J.; HARVEY, N.C.; COOPER, C. Endocrinology in pregnancy: influence of maternal vitamin D status on obstetric outcomes and the fetal skeleton. **European Journal Of Endocrinology**, v. 173, p. R69-R83, 2015.

MOON, R.J.; HARVEY, N.C.; COOPER, C.; D'ANGELO, S.; CROZIER, S.R.; INSKIP, H.M.; SCHOENMAKERS, I.; PRENTICE, A.; ARDEN, N.K.; BISHOP, N.J.; CARR, A.; DENNISON, E.M.; EASTELL, R.; FRASER, R.; GANDHI, S.V.; GODFREY, K.M.; KENNEDY, S.; MUGHAL, M.Z.; PAPAGEORGHIQUI, A.T.; REID, D.M.; ROBINSON, S.M.; JAVAID, M.K. Determinants of the Maternal 25-

Hydroxyvitamin D Response to Vitamin D Supplementation During Pregnancy. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 101, p. 5012-5020, 2016.

MUSCOGIURI, G.; MARI, D.; PROLO, S.; FATTI, L.M.; CANTONE, M.C.; CARAGNANI, P.; AROSIO, B.; DI SOMMA, C.; VITALE, G. 25 Hydroxyvitamin D Deficiency and Its Relationship to Autoimmune Thyroid Disease in the Elderly. **Internacional Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, p. 850-857, 2016.

NAVARRO, S.D.; BEATRIZ, A.; MEZA, A.; PESARINI, J.R.; GOMES, R.da S.; KARAZIACK, C.B.; CUNHA-LAURA, A.L.; MONREAL, A.C.; ROMÃO, W.; LACERDA, J. V.; MAURO, M.de O.; OLIVEIRA, R.J. A new synthetic resorcinolic lipid 3-heptyl-3,4,6-trimethoxy-3Hisobenzofuran-1-one: evaluation of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 132-142, mar. 2014.

OLIVEIRA, R.J.; KANNO, T.Y.N.; SALLES, M.J.S.; LOURENÇO, A.C.S.; RIBEIRO, L.R.; FREIRIA, G.A.; MATIAZI, H.J.O.; MANTOVANI, M.S.; SILVA, A.F. Effects of the polysaccharide β -glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 53, p. 164-73, 2009.

OLIVEIRA, R.J.; PESARINI, J.R.; MAURO, M.O.; FRONZA, L.S.; VICTORELLI, S.G.; CANTERO, W.B.; SENA, M.C.; ANTONIOLLI, A.C.M.B. Effects of phenylalanine on reproductive performance and teratogenesis in mice. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, p. 5606-5616, 2014.

OLIVEIRA, R.J.; MANTOVANI, M.S.; PESARINI, J.R.; MAURO, M.O.; DA SILVA, A.F.; SOUZA, T.R.; RIBEIRO, L.R. 6-Dimethylaminopurine and cyclohexamide are mutagenic and alter reproductive performance and intrauterine development *in vivo*. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, p. 834-849, 2015.

OLIVEIRA, R.J.; FRONZA, L.S.; HONDA, R.E.; AQUINO, M.T.; MIRON-VANI, J.; PESSATTO, L.R.; NEVES, S.C.; PESARINI, J.R. Effects of Avena sativa L. supplementation on ponderal development, reproductive performance and embryo-fetal development of pregnant rats exposed to cyclophosphamide. **Perspectivas Experimentais e Clínicas, Inovações Biomédicas e Educação em Saúde**, v. 1, p. 1-8, 2015a.

OLIVERI, B.; PARISI, M.S.; ZENI, C.; MAUTALEN, C. Mineral and bone mass changes during pregnancy and lactation. **Nutrition**, v. 20, p. 235-240, 2004.

PET, M.A.; BROUWER-BROLSMA, E.M. The Impact of Maternal Vitamin D Status on Offspring Brain Development and Function: a Systematic Review. **Advances in Nutrition: An Internacional Review Journal**, v. 7, p. 665-678, 2016.

PETERLIK, M.; CROSS, H.S. Vitamin D and calcium deficits predispose for multiple chronic diseases. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 35, p. 290-304, 2005.

PETERLIK, M.; CROSS, H.S. Dysfunction of the vitamin D endocrine system as common cause for multiple malignant and other chronic diseases. **Anticancer Research**, v. 26, p. 2581-2588, 2006.

PRENTICE, A.; GOLDBERG, G.R.; SCHOENMAKERS, I. Vitamin D across the lifecycle: physiology and biomarkers. **The American journal of clinical nutrition**, v. 88, p. 500s-506s, 2008.

QUERFELD, U.; MAK, R.H. Vitamin D deficiency and toxicity in chronic kidney disease: in search of the therapeutic window. **Pediatric Nephrology**, v. 25, p. 2413-2430, 2010.

RABELO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.L.R.; MONTELEONE-NETO R. Mutagênese, teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avaliação. **Sociedade Brasileira de Genética**, p. 241, 1991.

REIS, G.V.O.P.; GONTJO, N.A.; RODRIGUES, K.F.; ALVES, M.T.; FERREIRA, C.N.; GOMES, K.B. Vitamin D receptor polymorphisms and the polycystic ovary syndrome: A systematic review. **The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 43, p. 436-446, 2017.

ROGERS, J.F.; THOMPSON, S.J.; ADDY, C.L.; McKEOWN, R.E.; COWEN, D.J.; DEOUFLE, P. Association of very low birth weight with exposures to environmental sulfur dioxide and total suspended particulates. **American Journal of Epidemiology**, v.151, p.602-13, 2000.

SALLE, B.L.; DELVIN, E.E.; LAPILLONNE, A. BISHOP, N.J.; GLORIEUX, F.H. Perinatal metabolism of vitamin D. **The American journal of clinical nutrition**, v. 71, p. 1317s-1324s, 2000.

SALMON, E.D.; CIMINI, D.; CAMERON, L.A.; DELUCA, J.G. Merotelic kinetochores in mammalian tissue cells. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, v. 360, p. 553-568, 2005.

SALZANO, F.M. Public health in the First and Third Worlds: challenges and perspectives. **Ciências & Saúde Coletiva**, v. 7, p. 7-16, 2002.

STAPLES, R.E.; SCHNELL, V.L. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-Alizarin red S method for fetal bone. **Stain Technology**, v.39, p.61-3, 1964.

TARE, M.; EMMETT, S.J.; COLEMAN, H.A.; SKORDILIS, C.; EYLES, D.W.; MORLEY, R.; PARKINGTON, H.C. Vitamin D insufficiency is associated with impaired vascular endothelial and smooth muscle function and hypertension in young rats. **The Journal of Physiology**, v. 589, p. 4777-4786, 2011.

TAYLOR, P. Pratical Teratology. **Academic Press**, New York, 1986.

THOMPSON, S.L.; COMPTON, D.A. Chromosomes and cancer cells. **Chromosome Research**, v. 19, p. 433-444, 2011.

TORRES-BUGARÍN, O.; MACRIZ ROMERO, N.; RAMOS IBARRA, M.L.; FLORES-GARCÍA, A.; VALDEZ ABURTO, P.; ZAVALA-CERNA, M.G. Genotoxic Effect in Autoimmune Diseases Evaluated by the Micronucleus Test Assay: Our Experience and Literature Review. **Biomed Research Internacional**, v. 2015:194031, ago. 2015.

ULRICH, F.; PETERMANN, F. Consequences and Possible Predictors of Health-damaging Behaviors and Mental Health Problems in Pregnancy - A Review. **Geburtshilfe Frauenheilkd**, v. 76, p. 1136-1156, nov. 2016.

VAZIRI, F.; DABBAGHMANESH, M.H.; SAMSAMI, A.; NASIRI, S.; SHIRAZI, P.T. Vitamin D supplementation during pregnancy on infant anthropometric

measurements and bone mass of mother-infant pairs: A randomized placebo clinical trial. **Early Human Development**, v. 103, p. 61-68.

VÁZQUEZ-DIEZ, C.; YAMAGATA, K.; TRIVEDI, S.; HAVERFIELD, J.; FITZHARRIS, G. Micronucleus formation causes perpetual unilateral chromosome inheritance in mouse embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, p. 623-631, jan.2016.

VELDURTHY, V.; WEI, R.; OZ, L.; DHAWAN, P.; JEON, Y.H.; CHRISTAKOS, S. Vitamin D, calcium homeostasis and aging. **Bone Research**, v. 4, oct. 2016.

VOULGARIS, N.; PAPANASTASIOU, L.; PIADITIS, G.; ANGELOUSI, A.; KALTSAS, G.; MASTORAKOS, G.; KASSI, E. Vitamin D and aspects of female fertility. **Hormones**, v. 16, p. 5-21, 2017.

WANG, Y.; ZHU, J.; DELUCA, H. F. Where is the vitamin D receptor? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 523, p. 123–133, jul. 2012.

WILSON, J.G. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. In: WILSON, J.G.; WAEKANY, J. (Eds.). **Teratology: Principles and Techniques**. The University of Chicago Press, Chicago, 1965.

WHITEHOUSE, A.J.O.; HOLT, B.J.; SERRALHA, M.; HOLT, P.G.; KUSEL, M.M.H.; HART, P.H. Maternal Serum Vitamin D Levels During Pregnancy and Offspring Neurocognitive Development. **Pediatrics**, v. 129, p. 485-493, 2012.

WLODARCZYK, B.J.; PALACIOS, A.M.; CHAPA, C.J.; ZHU, H.; GEORGE, T.M.; FINNELL, R.H. Genetic basis of susceptibility to teratogen induced birth defects. **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 157C, p. 215-226, 2011.

YATES, N.; RACHEL, C.; WYRWOLL, C.S. Vitamin D deficiency and impaired placental function: potential regulation by glucocorticoids?. **Society for Reproduction and Fertility**, 2017.

ZIPITIS, C.S.; AKOBENG, A.K. Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Archives of Disease in Childhood**, v. 93, p. 512-517, jun.2008.

ZITTERMANN, A.; GUMMERT, J.F. Nonclassical vitamin D action. **Nutrients**, v. 4, p. 408-425, 2010.

ZOSKY, G.R.; HART, P.H.; WHITEHOUSE, A.J.O.; KUSEL, M.M.; ANG, W.; FOONG, R.E.; CHEN, L.; HOLT, P.G.; SLY, P.D.; HALL, G.L. Vitamin D Deficiency at 16 to 20 Weeks Gestation Is Associated with Impaired Lung Function and Asthma at 6 Years of Age. **Annals of The American Thoracic Society**, v. 11, p. 571-577, 2014.

Manuscrito

Suplementação com altas doses de vitamina D e cálcio durante o período gestacional não causam danos reprodutivos, teratogênicos e genotóxicos

Ausência de danos reprodutivos, teratogênicos e genotóxicos em suplementações com altas doses de vitamina D e cálcio durante o período gestacional

Silvia Cordeiro das Neves^{1,2}, Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli-Silva^{1,3}, Antônio Carlos Duenhas Monreal², Rodrigo Juliano Oliveira^{1,3,4}

¹Centro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica (CeTroGen), Núcleo de Hospital Universitário (NHU), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

²Programa de Mestrado em Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

³Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Faculdade de Medicina "Dr. Hélio Mandetta" (FAMED), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁴Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil.

Resumo

A deficiência de Vitamina D durante a gravidez pode causar efeitos adversos no desenvolvimento embriofetal e pós-natais, além de acarretar aumento de doenças infecciosas, diabetes do tipo 1 e de associar-se ao desenvolvimento de síndrome metabólica e obesidade. Assim, tem se tornado cada vez mais comum a indicação da suplementação dessa vitamina em gestantes. No entanto, a literatura não indica dose de segurança para o período gestacional. Frente ao exposto o presente estudo avaliou os efeitos da vitamina D e da vitamina D associada ao cálcio no desempenho reprodutivo, no desenvolvimento embriofetal e na integridade do DNA em camundongos *Swiss*. Foram utilizados 140 camundongos fêmeas prenhes tratadas com vitamina D e vitamina D associada ao cálcio em dois experimentos com suplementação via intramuscular (i.m) nas doses de 600.000, 6.000.000 e 60.000.000 UI, e outro, via oral (v.o., gavage), nas doses de 6.000, 60.000 e 600.000 UI, em dose única no 10º dia gestacional. Os resultados demonstram que nas diferentes doses testadas (mesmo 10x maior que as recomendadas para suplementações em seres humanos), tanto pela via intramuscular quanto a via oral, a vitamina D e vitamina D associada a cálcio não alteraram o desempenho reprodutivo, o desenvolvimento embriofetal e nem a integridade do DNA. Esses resultados que são pioneiros reforçam a segura de uso desse tipo de suplementação inclusive durante a gestação.

Palavras-chave: Receptores de Calcitriol, anormalidades congênitas, dano ao DNA.

1. Introdução

Baixos níveis de vitamina D durante a gravidez podem relacionar-se a efeitos adversos no desenvolvimento embriofetal e pós-natais, e ao parto prematuro (KARRAS et al., 2016). Dentre as alterações registradas em humanos cita-se também a correlação entre baixos níveis séricos de vitamina D e o aumento do risco de doenças infecciosas, alterações no desenvolvimento dos dentes (KARRAS et al., 2016), esquizofrenia (McGRATH et al., 2004; HOLMES et al., 2009), diabetes tipo 1 (ZIPITIS; AKOBENG, 2008; HOLMES et al., 2009) e asma (LITONJUA; WEISS, 2007; HOLMES et al., 2009). Dentre as alterações pós-natais cita-se a ocorrência de raquitismo (DAWODU et al., 2005; HOLMES et al., 2009) e o atraso da mineralização óssea que persiste até os 9 anos de idade (JAVAID et al., 2006; HOLMES et al., 2009). Chama ainda atenção a associação entre a deficiência/insuficiência de vitamina D e o desenvolvimento da síndrome metabólica e obesidade (ENTRENAS et al., 2016), duas importantes questões de saúde pública atuais (ENTRENAS et al., 2016), bem como o fato de grande parte das gestantes terem dificuldade de voltar ao peso habitual após o parto (ULRICH; PETERMANN, 2016). Esses fatos indicam a necessidade e a importância da suplementação de vitamina D, principalmente porque a sua produção pela exposição à luz solar é insuficiente [por conta da vida moderna \(baixa exposição ao sol, por exemplo, dentre outros hábitos\)](#) bem como a obtenção por meio da dieta (HOLICK, 2007; JONES, 2013), [assim como os benefícios da saúde ao longo da vida que estão relacionados ao fato da vitamina d ter efeito sobre a programação fetal e a regulação do genes.](#)(HOLICK, 2007; HOSSEIN-NEZHAD; HOLICK, 2012; HOSSEIN-NEZHAD; HOLICK, 2013)-

Em adultos deficientes em vitamina D sugere-se suplementação de 50.000 UI de vitamina D, com doses semanais durante 8 semanas, ou 6.000 UI de vitamina D por dia até atingir níveis séricos de 25(OH)d acima de 30 ng/ml. Após a normalização, faz-se manutenção de 1.500 a 2.000 UI por dia (HOLICK et al., 2011). Em mulheres grávidas ou que pensam em engravidar os níveis de vitamina D devem ser acompanhados a cada três meses e se necessário o tratamento deve ser feito com 5.000 UI ou mais por dia, já em mulheres lactantes é necessário 7.000 UI por dia, para garantir uma rica fonte de vitamina D no leite materno (CANNELL; HOLLIS,

2008). Em casos de deficiências graves de vitamina D, doses de até 600.000UI intramuscular, em dose única, são registradas pela literatura como doses terapêuticas (MONDAL et al., 2014). No entanto, a literatura pesquisada não possui estudos que demonstre a segurança dessas suplementações durante o período gestacional. Doses ainda mais altas podem ser requeridas no tratamento de pacientes com ~~doses~~ doenças autoimunes visto que esses apresentam metaboli~~smozam~~ insuficiente de mal a-vitamina D (MUSCOGIURI et al., 2016).

Frente ao exposto, o presente estudo avaliou os efeitos da suplementação de vitamina D, e da sua associação com cálcio, sobre o desempenho reprodutivo, desenvolvimento embionário fetal e integridade do DNA em camundongos *Swiss* prenhas prenhez.

2. Material~~is~~ e métodos

2.1. Agentes químicos

A vitamina D, colecalciferol 25(OH)D, (Lote 1408221), de responsabilidade da farmacêutica Sandra Kuniyoshi, foi fornecida pela Formédica Farmácia de Manipulação LTDA (CNPJ 82.342.403/0001-83)

Dois experimentos foram realizados, um com suplementação intramuscular (i.m.) com a dose a 600.000 UI (MONDAL et al., 2014) considerando um paciente de 70kg, e outro, via oral (v.o., gavage), com uma dose correspondente a 6.000 UI (HOLICK et al., 2011) também considerando um paciente de 70kg. Posteriormente, fez a adequação da dose ao peso do camundongo, usando a seguinte fórmula ((Quantidade unidades de vitamina D em UI x 30g)/70.000g). A administração foi realizada em dose única no 10º dia gestacional visto que nesse dia um grande número de órgãos e/ou sistemas estão em desenvolvimento.

Em seguida, extrapolou-se a dose em progressão geométrica e razão igual a dez. Essas doses foram escolhidas porque os guidilines guidelines na área de toxicologia reprodutiva (OECD, 2009) e toxicologia genética (OECD, 1997; OECD, 2012), bem como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2010), indicam que ensaios pré-clínicos devem ser conduzidos com as doses que se

pretende usar em humanos (ou promover a sua exposição) e outra dose 10 vezes maior. Somente se essa segunda dose estiver livre de efeitos adversos, a **dose** menor dose será considerada segura e para tanto deve-se comprovar ausência de efeitos genotóxicos e teratogênicos, bem como a relação custo x benefício da sua utilização, devem ser avaliados (RAHEJA et al., 1998; OECD, 2001; ANVISA, 2010).

Por fim as doses de vitamina D testadas foram correspondentes à 600.000, 6.000.000 e 60.000.000 UI, por via intramuscular e 6.000, 60.000 e 6000.000 UI por via oral. Em associação à vitamina D foi usado o Cálcio Quelado na dose de 8,56 mg/kg de peso corpóreo (p.c.) (v.o.). Esse produto também foi fornecido pela Formédica, bem como os veículos usados nesse experimento.

2.2. Animais Experimentais

Foram utilizados camundongos *Swiss (Mus Musculus)* de ambos os sexos (140 fêmeas e 70 machos), em idade reprodutiva (8-10 semanas), com peso médio de 30g, provenientes da Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal (IAGRO). A presente pesquisa foi realizada de acordo com a Declaração Universal do Direitos do Animais e aprovada pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob parecer #789/2016.

Os camundongos machos foram mantidos isoladamente em caixas de propileno e as fêmeas em duplas. Todos os animais passaram por um período mínimo de adaptação correspondente a sete dias. A luminosidade e a temperatura foram controladas com a utilização de sistema de fotoperíodo de 12 horas (12 horas de claro: 12 horas de escuro) com temperatura em torno de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ em *rack* ventilada Ventilife ALESCO® e alimentados com ração comercial (Nuvital®) e água filtrada, *ad libitum*.

O acasalamento foi *overnight*, na proporção de 1 macho: 2 fêmeas, e a detecção da prenhez foi feita por meio da observação do *plug* vaginal, sendo este dia considerado o dia zero de gestação (OLIVEIRA et al., 2009; GONÇALVES et al., 2013; DAVID et al., 2014; GONÇALVES et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015a).

2.3. Delineamento Experimental

Os agentes químicos foram administrados em dose única no 10º dia gestacional visto que nesse dia um grande número de órgãos e/ou sistemas estão em desenvolvimento e, por isso, o embrião se está susceptível à ocorrência de [disrupção-desreguladores químicos química](#) ou teratogênese (OLIVEIRA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2015a,b). A escolha por uma dose única se deve às suplementação que são feitas em altas doses acontecer uma vez por ano (HOLICK et al., 2011; HOLICK et al., 2011; MONDAL et al., 2014) ou até mesmo uma vez por trimestre (MANASERI-HOLLAND, et al., 2016).

As fêmeas prenhes foram divididas em 2 lotes:

Experimento 1: Via Intramuscular (IM) - As fêmeas foram divididas em 7 grupos experimentais (n=10): Grupo Controle – foi administrado aos animais óleo de girassol qsp (quantidade suficiente para) (veículo da vitamina D); Grupos Vitamina D 600.000 UI, 6.000.000UI e 60.000.000 UI – as fêmeas foram suplementadas com doses correspondentes à 600.000, 6.000.000 e 60.000.000 UI de vitamina D, intramuscular, respectivamente; Grupos Vitamina D + Cálcio – as fêmeas foram suplementadas com as mesmas doses de vitamina D que os grupos anteriores e, em seguida, foi administrada uma dose de cálcio quelado [por via oral na dose de 8,56 mg/kg](#).

Experimento 2: Via Oral (VO): As fêmeas foram divididas em 7 grupos experimentais (n=10): Grupo Controle – foi administrado aos animais óleo de girassol qsp (veículo da vitamina D); Grupos Vitamina D 6.000 UI, 60.000UI e 600.000 UI – as fêmeas foram suplementadas com doses correspondentes à 6.000, 60.000 e 600.000 UI de vitamina D, via oral, respectivamente; Grupos Vitamina D + Cálcio – as fêmeas foram suplementadas com as mesmas doses de vitamina D que os grupos anteriores e, em seguida, foi administrada uma dose de cálcio quelado [por via oral na dose de 8,56 mg/kg](#).

2.4 Ensaios Biológicos

2.4.1. Desempenho reprodutivo e desenvolvimento embriofetal

Os animais foram pesados no começo e no final do experimento. Calculou-se o ganho de peso (peso final – peso inicial). No 18º dia de gestação os animais foram

submetidos à eutanásia seguida de laparotomia, histerectomia e onfalectomia. O baço, coração, fígado, pulmões, rins, útero, fetos e placentas foram coletados e pesados. Calculou-se o ganho de peso líquido (ganho de peso – peso do útero). O peso relativo dos órgãos foi calculado pela relação entre o peso absoluto do órgão e o peso final do animal.

Uma análise externa sistematizada dos fetos foi realizada para a detecção de possíveis malformações. Posteriormente, os fetos foram sexados. Registrou-se o número de implantações, reabsorções, fetos vivos e fetos mortos. Com base nesses dados obteve-se viabilidade fetal (número de fetos vivos/número de implantações x 100), taxa de perdas pós-implantação (número de implantações – número de fetos vivos x 100/número de implantações), taxa de reabsorção (número de reabsorções x 100/número de implantações), índice placentário (peso placentário/peso fetal) e razão sexual (número de fetos machos/número de fetos fêmeas) (OLIVEIRA et al., 2009; GONÇALVES et al., 2013; DAVID et al., 2014; GONÇALVES et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015a). Em seguida, fez-se a adequação do peso dos fetos à idade de prenhez. Para tanto os fetos foram classificados como fetos com peso adequado para a idade da prenhez (PAIP) – peso compreendido entre média de peso dos fetos do grupo controle mais ou menos o desvio padrão; fetos de baixo peso para a idade de prenhez (BPIP) – peso corporal inferior à média de peso dos fetos do grupo controle menos o desvio padrão deste mesmo grupo; fetos acima do peso para a idade de prenhez (APIP) – peso corporal superior à média do peso dos fetos do grupo controle mais o desvio padrão deste mesmo grupo (OLIVEIRA et al., 2009).

Posteriormente, os fetos foram distribuídos aleatoriamente em dois subgrupos. O primeiro foi destinado à análise visceral sendo os fetos fixados em solução de Bodian's (água destilada (142 ml), ácido acético (50 ml), formol (50 ml) e álcool 95% (758 ml)) por pelo menos sete dias. Já o segundo subgrupo foi destinado à análise esquelética pela técnica de alizarina vermelha proposta por Staples; Schnell (1964), com modificações de Oliveira et al. (2009). Os fetos foram fixados em acetona por pelo menos sete dias. Para o processo de diafanização, os fetos foram eviscerados e colocados em uma solução de KOH (0,8%). Em seguida, quatro gotas de alizarina foram acrescentadas. Esta solução foi trocada a cada 24h ao longo de quatro dias. Após esse período a solução de KOH foi descartada e os fetos

foram colocados em solução de clareadora (1litro de glicerina: 1 litro de álcool etílico: 0,5 litro de álcool benzílico) e trocadas por 24h durante sete dias.

A análise visceral foi realizada por meio de microdissecação com cortes estratégicos para o estudo do tórax e do abdômen segundo Barrow; Taylor (1969), e para estudo da cabeça segundo Wilson (1965), com modificações de Oliveira et al. (2009). As alterações viscerais foram baseadas nos estudos de Taylor (1986), Manson; Kang (1994), Damasceno et al. (2008), Oliveira et al. (2009). Alterações esqueléticas foram classificadas segundo os estudos de Taylor (1986), Manson et al. (1982), Damasceno et al. (2008) e Oliveira et al. (2009).

Todas as análises foram realizadas em estereomicroscópio (NIKON SMZ745T).

2.4.2. Ensaio do Micronúcleo

A análise do micronúcleo foi realizada 24, 48 e 72 horas após a administração da vitamina D, portanto no 11º, 12º e 13º dias gestacionais.

A técnica utilizada foi baseada em Hayashi et al. (1990) com modificações de Oliveira et al. (2009). Foram coletados 20µL de sangue periférico, por punção da veia caudal e depositado em lâmina previamente corada com Alaranjado de Acridina (1mg/mL) e, em seguida, recoberta por lamínula. As lâminas foram armazenadas em freezer a -20°C por pelo menos 15 dias. Analisou-se 2.000 células/animal em microscópio de epifluorescência (Motic®; Modelo BA 410) em aumento de 400 vezes.

2.4.3. Análise estatística

Os dados foram apresentados em média \pm erro padrão da média (EPM) e foram avaliados de acordo com a natureza de sua distribuição (teste paramétrico - ANOVA/Tukey e não paramétricos - Kruskal-Wallis/Dunn). ~~Para as comparações entre as frequências (porcentagens) utilizou o teste de Quiquadrado comparando as frequências entre o grupo controle e os grupos experimentais.~~ O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Avaliação de toxicologia reprodutiva

3.1.1. Parâmetro biométricos

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos diferentes lotes e grupos experimentais. No entanto, os grupos Vitamina D, nas duas maiores doses, associados ao cálcio, apresentaram redução de peso se comparados ao grupo controle no experimento em que a vitamina foi administrada por via intramuscular. Para o experimento onde a vitamina foi administrada via oral não houve diferença ($p>0,05$) entre os grupos experimentais. Quando avaliados o peso final, ganho de peso, ganho de peso, peso do útero e ganho de peso líquido não houve diferenças ($p>0,05$) entre os grupos independentemente do lote em análise (Tabela 1).

Ao avaliar o peso absoluto e o peso relativo dos órgãos não houve diferenças significativas, exceto para o peso relativo do baço dos animais tratados com vitamina D na menor dose, via intramuscular, e cálcio, que aumentou ($p<0,05$) em relação ao grupo controle (Tabela 2).

3.1.2. Desempenho reprodutivo

O número de implantes, fetos vivos, viabilidade fetal, taxa de perda pós-implantacionais, reabsorção, taxa de reabsorção e razão sexual não apresentaram diferenças ($p>0,05$) entre os grupos experimentais dos dois lotes (Tabela 3).

Em relação ao experimento 1 (IM) observou-se aumento ($p<0,05$) do peso fetal nos grupos tratados com a menor dose de vitamina D e com a maior dose da vitamina D em associação com o cálcio em relação ao grupo controle. Verificou-se também redução ($p<0,05$) do peso placentário dos animais tratados com a vitamina D na dose intermediária e dessa mesma dose em associação com o cálcio. Observou-se ainda redução ($p<0,05$) do índice placentário para os animais tratadas com as duas menores doses de vitamina D isoladamente ou em associação com cálcio (Tabela 3).

Em relação ao experimento 2 (VO) observou-se redução do índice placentário para as duas menores doses de vitamina D e para as duas maiores doses em associação com o cálcio (Tabela 3).

Quando avaliada a adequação do peso à idade de prenhez, todos os fetos, independentemente do tratamento demonstraram peso adequado para a idade da prenhez (Tabela 3).

3.1.3. Avaliação do desenvolvimento embrifetal: malformações externas, viscerais e esqueléticas

A frequência de malformações externas (Tabela 4), viscerais (Tabela 5) e esqueléticas (Tabela 6) observadas para os grupos tratados com vitamina D, seja pela via intramuscular ou oral, não diferiram dos seus respectivos controles.

As malformações externas observadas no experimento 1 (IM) foram retroversão posterior unilateral e posterior bilateral, retroversão anterior unilateral, estiramento anterior e posterior unilateral, hematoma nos membros posteriores, cauda em vírgula, hidropsia, gastrosquise e escoliose. Já experimento 2 (VO) as malformações observadas foram retroversão posterior unilateral e bilateral, hematoma nos membros posteriores, cauda em vírgula e gastrosquise (Tabela 4).

Quando avaliada a malformação visceral, no experimento 1 (IM) foram observadas hidrocefalia, hidronefrose e fenda palatina. Já no experimento 2 (VO) observou-se hidronefrose e fenda palatina (Tabela 5).

A análise de malformações esqueléticas, no experimento 1 (IM), demonstraram a presença de ossificação reduzida e agenesia de falanges distais e de falanges proximais em membros anteriores e posteriores; ossificação reduzida do púbis; rotação da fíbula sobre a tíbia; agenesia, disgenesia (bipartidos e em formato de borboleta) e redução de ossificação dos centros esternais. Observou-se também agenesia e redução de ossificação do manúbrio e processo xifóide. No Crânio observou-se ossificação reduzida do presfenióide, palato, supraoccipital, parietal, interparietal. Nas vértebras observou-se agenesia ou ossificação reduzida dos centros vertebrais (Tabela 6).

No experimento 2 (VO) observou-se agenesia e ossificação reduzida das falanges distais e proximais e do metacarpo em membros anteriores; e agenesia e ossificação reduzida das falanges distais e proximais, do metatarso e do púbis em membros inferiores além de agenesia do ísquio e rotação da fíbula sobre a tíbia.

O esterno apresentou um gama de alterações e dentre elas cita-se agenesia, ossificação reduzida dos centros externos além de ossificação bipartidas e em formato de borboleta. Também foi observada agenesia ou ossificação reduzida do manúbrio e do processo xifoide. Dentre as alterações do crânio observou-se ossificação reduzida do presfenóide, palato, supraccipital, parietal, interparietal e nasal. Nas vértebras observou-se ossificação reduzida de centro vertebrais e nas costelas projeções e junções das costelas flutuantes (Tabela 6).

3.1.4. Avaliação toxicogenética: ensaio do micronúcleo

A avaliação da integridade do DNA demonstrou ausência de danos toxicogenéticos exceto para a maior dose de vitamina D, administrada isoladamente, na primeira análise realizada (24h após o tratamento). No entanto, nas demais análises de 48 e 72h esse aumento de danos genotóxicos não se manteve (Tabela 7).

4. Discussão

À medida que os conhecimentos na área de medicina são construídos novas terapias assumem destaque na busca de melhorias na qualidade de vida. No entanto, algumas vezes faltam estudos que garantam a segurança dessas novas terapias e assim é o caso de algumas suplementações em períodos específicos. Isso acontece com a vitamina D que é usada na suplementação, inclusive de mulheres grávidas e/ou em ~~gestantes~~lactantes que ainda não possuem conhecimento dessa condição, em doses de até 600.000 UI. Diante do exposto, a presente pesquisa avaliou os efeitos da suplementação da vitamina D isolada e em associação com o cálcio no desempenho reprodutivo e desenvolvimento embrionário em modelo pré-clínico. De acordo com a literatura estudos de desempenho reprodutivo e desenvolvimento embrionário (teratogênese) são realizados comumente em 4 janelas sendo pré-acasalamento (pelo menos 15 dias anteriores ao acasalamento para cobrir 3 ciclos estrais) (MOREIRA et al., 2005; GONÇALVES et al., 2013; DAVID et al., 2014; GONÇALVES et al., 2014), pré-implantacional (do 1º ao 4º dia gestacional), organogênese (GONÇALVES et al., 2013; DAVID et al., 2014;

GONÇALVEZ et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015a) e gestacional (GONÇALVEZ et al., 2013; DAVID et al., 2014; GONÇALVEZ et al., 2014). Além dessas janelas alguns autores ainda fazem tratamentos exclusivamente no 10º dia gestacional no intuito de atingir um maior número de órgãos e/ou sistemas em desenvolvimento sendo então considerado o 10º dia gestacional um dia crítico para o desenvolvimento embrionário (OLIVEIRA et al., 2009; MAURO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2015b). Baseado na literatura e porque as altas doses de vitamina D são suplementadas em dose única (HOLICK et al., 2011; MONDAL et al., 2014) optou-se pela administração da vitamina D, isolada ou em associação com o cálcio, no décimo dia gestacional.

A avaliação dos parâmetros biométricos não indicaram nenhum sinal de toxicidade materna. A única variação significativa apresentada foi o peso relativo do baço dos animais do grupo tratado com a menor dose de vitamina D em associação com o cálcio. No entanto, essa parece ser uma ocorrência isolada. Essa ausência de variações nos parâmetros biométricos associados à ausência de sinais clínicos de intoxicação (opacidade de olhos e pêlos, ressecamento de mucosa, eriçamento de pelo, alteração de comportamento, alteração da deambulação (hipo e hiperatividade locomotora), morbidade, tremores, diminuição da ingestão de ração e água e ~~diarréia~~diarreia) (DAMASCENO et al., 2002; FREITAS et al., 2005; BRUGUIOLO et al., 2010; CUNHA-LAURA et al., 2013, AUHAREK et al., 2013) sugerem a segurança da suplementação.

Corroborando ainda a segurança de uso a ausência de alterações no número de implantes, número de fetos vivos, viabilidade fetal, taxa de perdas pós-implantacionais, reabsorção, taxa de reabsorção, adequação do peso à idade de prenhez e razão sexual. Apesar de ocorrer aumento do peso fetal e redução do peso placentário e do índice placentário no lote (IM), todos os fetos tiveram crescimento adequado para a idade de prenhez. Logo, esses dados não são indicativos de toxicidade. Já no lote (VO) não houve variação no peso fetal. Mas, aconteceu de forma esporádica, aumento do peso placentário e redução do índice placentário.

Variações no peso fetal, peso das placentas e/ou no índice placentário podem significar adaptações do organismo materno para ~~manter a~~manutenção adequada dos embriões/fetos e isso pode ocorrer ~~em decorrência~~, por exemplo, devido aos diferentes números de fetos por ninhada (DAVID et al., 2014; ERIKSSON;

JANSSON, 1984; GONÇALVEZ et al., 2013). Não obstante se essas adaptações estiverem associadas a outras mudanças no organismo materno e fetal podem ser indicativos de toxicidade (SAITO et al., 2013; SINZATO et al., 2011). Mas, no presente estudo não temos mais variáveis que sugiram efeitos materno ou embrio/fetotóxicos que possam fomentar essa assertiva.

As malformações externas, viscerais e esqueléticas observadas nos grupos tratados com a vitamina D, por via intramuscular ou via oral, isoladamente ou em associação com o cálcio são consideradas variantes da normalidade, pois são encontradas na mesma frequência no grupo controle (TAYLOR, 1986; GONÇALVES et al., 2013; DAVID et al., 2014). Apenas na maior dose de vitamina D, por via oral, houve diferença significativa ($p < 0,05$) ~~na~~ ao analisar o processo xifoide que apresentou ossificação reduzida ou agenesia. Principalmente, no que se refere as alterações esquelética deve se considerar que os fetos eram prematuros, ainda que os procedimentos tenham sido realizados como indicado pela literatura específica (TAYLOR, 1986; GONÇALVES et al., 2013). Assim, essa mesma literatura indica que essas alterações viscerais e/ou esqueléticas regredem ao final da gestação ou após o nascimento (TAYLOR, 1986; OLIVEIRA et al., 2009) corroborando a afirmativa de que são variantes da normalidade.

Os resultados ainda indicam que, mesmo diante das diferenças nas frequências e tipos de malformações observadas nos dois experimentos, não foi estabelecido nenhuma correlação entre as doses administradas, as vias de administrações e os achados biológicos.

Em relação à frequência de micronúcleos observou-se que ~~esse efeito ocorreu~~ aumento significativo apenas na maior dose no primeiro tempo de análise. No entanto, essa toxicidade genética não permaneceu ao longo das três amostragens realizadas. Para as demais doses, isoladas ou em associação com o cálcio não foi observada nenhum sinal de genotoxicidade. Esses resultados indicam uma ocorrência esporádica de aumento da frequência de micronúcleos e acredita-se que essa diferença possui pequena relevância biológica. Esses resultados corroboram a segurança de uso da suplementação de Vitamina D mesmo em altas doses durante a gestação uma vez que a integridade do DNA é mantida.

Diante do exposto infere-se que a vitamina D e a vitamina D associada cálcio, nas doses intramuscular de 600.000UI, 6.000.000UI e 60.000.000UI e nas

doses via oral 6.000UI, 60.000UI e 600.000UI, testadas em camundongos *Swiss prenhas prenhes*—não é materno-tóxica, não é genotóxico e não alterara o desempenho reprodutivo e desenvolvimento embriofetal, o que sugere segurança de uso também durante o período gestacional.

6 - Referências Bibliográficas

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a condução de estudos nãoclínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília, 2010.

AUHAREK, S.A.; DO CARMO VIEIRA, M.; CARDOSO, C.A.L.; OLIVEIRA, R.J.; CUNHA-LAURA, A. L. Reproductive toxicity of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) in female Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 341-343, 2013.

BARROW, M.V.; TAYLOR, W.J. A rapid method for detecting malformation in rat fetuse. **Journal of Morphology**, v. 127, p. 291-305, 1969.

BRUGIOLO, S.S.S.; PETERS, V.M.; PIMENTA, D.S.; AARESTRUP, B.J.V.; BRUGIOLO, A.S.S.; RIBEIRO, D.M.; RIBEIRO, D.M.; DE OLIVEIRA GUERRA, M. Reproductive toxicity of *Echinodorus grandiflorus* in pregnant rats. **The Journal of Toxicology Science**, v. 35, p. 911–922, 2010.

CANNELL, J.J.; HOLIS, B.W.. Use of Vitamin D in Clinical Practice, **Alternative Medicine Review**, v. 13, p.6-20, mar. 2008.

CUNHA-LAURA, A.L.; OLIVEIRA, R.J.; CARDOSO, C.A.L.; VIEIRA, M.C.; AUHAREK, S.A. Absence of interceptive effect in female Wistar rats exposed to *Jacaranda decurrens* during organogenesis period. **VRI Phytomedicine**, v. 1, p. 21-26, 2013.

DAMASCENO, D.C.; VOLPATO, G.T.; SARTORI, T.C.; RODRIGUES, P.F.; PERIN, E.A.; CALDERON, I.; RUDGE, M.V. Effects of *Annonas quamosa* extracto nearly pregnancy in rats. **Phytomedicine**, v. 9, p. 667–672, 2002.

DAMASCENO, D.C.; KEMPINAS, W.G.; VOLPATO, G.T.; CONSONNI, M.; RUDGE, M.V.C.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Anomalias congênitas: estudos experimentais. **Coopmed Editora Médica**, Belo Horizonte, 2008.

DAWODU, A.; AGARWAL, M.; SANKARANKUTTY, M.; HARDY, D.; KOCHIYIL, J.; BADRINATH, P.. Higher prevalence of vitamin D deficiency in mothers of rachitic than nonrachitic children. **Journal of Pediatrics**, v. 147, p. 109–111, 2005.

DAVID, N.DE.; MAURO, M.O.; GONÇALVES, C.A.; PESARINI, J.R.; STRAPASSON, R.L.B.; KASSUYA, C.A.L.; STEFANELLO, M.É.A.; CUNHA-LAURA, A.L.; MONREAL, A.C.D.; OLIVEIRA, R.J. *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*: Bioprospecting of an anti-inflammatory phytotherapy for use during pregnancy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, p. 370-379, 2014.

ENTRENAS, A.O.; TUBIO, D.L.; NAVARRO, F.L.; CARVAJAL, F.M.; ADAN, N.G.; BAUTISTA, M.R.; OSINAGA, J.A. Relationship Between Vitamin D Deficiency and

the Components of Metabolic Syndrome in Patients with Morbid Obesity, Before and 1 Year After Laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass or Sleeve Gastrectomy. **Obesity Surgery**, nov.2016.

ERIKSSON, U.J.; JANSSON, L. Diabetes in pregnancy: decreased placental blood flow and disturbed fetal developmental in the rat. **International Pediatric Research**, v. 18, p. 735–738, 1984

FREITAS, T.G.; AUGUSTO, P.M.; MONTANARI, T. Effect of *Ruta graveolens* L. on pregnant mice. **Contraception**, v.71, p.74–77, 2005.

GONÇALVES, C.A.; SIQUEIRA, J.M.; CAROLLO, C.A.; MAURO, M.O.; DAVID, N.; CUNHA-LAURA, A.L.; MONREAL, A.C.D.; CASTRO, A.H.; FERNANDES, L.; CHAGAS, R.; AUHAREK, S.A.; OLIVEIRA, R.J. Gestational exposure to *Byrsonima verbascifolia*: Teratogenicity, mutagenicity and immunomodulation evaluation in female Swiss mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 843-850, 2013.

GONÇALVES, C.A.; SILVA, N.L.; MAURO, M.O.; DAVID, N.; CUNHA-LAURA, A.L.; AUHAREK, S.A.; MONREAL, A.C.D.; VIEIRA, M.C.; SILVA, D.B.; SANTOS, F.J.L.; SIQUEIRA, J.M.; OLIVEIRA, R.J. Evaluation of mutagenic, teratogenic, and immunomodulatory effects of *Annona nutans* hydromethanolic fraction on pregnant mice. **Genetic Molecular Research**, v. 13, p. 4392-4405, 2014.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNDI, T.; ISHIDATE JUNIOR, M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine Orange-coated slides. **Mutation Research**, v. 245, p. 245-249, 1990.

HOLICK, M.F. Vitamin D deficiency. **The News England Journal of Medicine**, v. 357, p. 266–281, jul. 2007.

HOLICK, M.F.; BINKLEY, N.C.; BISCHOFF-FERRARI, H.A.; GORDON, C.M.; HANLEY, D.A.; HEANEY, R.P.; MURAD, M.H.; WEAVER, C.M. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: An endocrine society clinical practice guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, p. 1911-1930, 2011.

HOLMES, A.V.; BARNES, M. S.; ALEXANDER, D.H.; MCFAUL, P.; WALLACE, J.M.W. Vitamin D deficiency and insufficiency in pregnant women: a longitudinal study. **British Journal of Nutrition**, v. 102, p. 876-881, 2009.

HOSSEIN-NEZHAD, A.; HOLICK, M.F. Optimize dietary intake of vitamin d: an epigenetic perspective. **Current opinion in clinical, nutrition & Metabolic Care**, v. 15, p. 567-579, 2012.

HOSSEIN-NEZHAD, A.; HOLICK, M.F. Vitamin D for health: a global perspective. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 88, p. 720-755, 2013.

JAVOID, M.K.; CROZIER, S.R.; HARVEY, N.C.; GALE, C.R.; DENNISON, E.M.; BOUCHER, B.J.; ARDEN, N.K.; GODFREY, K.M.; COOPER, C.; PRINCESS ANNE HOSPITAL STUDY GROUP. Maternal vitamin D status during pregnancy and childhood bone mass at age 9 years: a longitudinal study. **Lancet**, v. 367, p. 36–43, jan.2006.

JONES, G. Extrarenal vitamin d activation and interactions between vitamin d2, vitamin d3, and vitamin d analogs. **Annual Review of Nutrition**, v. 33, p. 23–44, jul. 2013.

KARRAS, S.N.; FAKHOURY, H.; MUSCOGIURI, G.; GRANT, W.B.; OUWELAND, J.M.; CALAO, A.M.; KOSTA, K.. Maternal vitamin D levels during pregnancy and neonatal health: evidence to date and clinical implications. **Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease**, v. 4, p. 124-135, 2016.

LITONJUA, A.A.; WEISS, S.T. Is vitamin D deficiency to blame for the asthma epidemic? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 120, p. 1031–1035, 2007.

MANASEKI-HOLLAND, S.; MAROOF, Z.; BRUCE, J.; MUGHAL, M.Z.; MASHER, M.I.; BHUTTA, Z.A.; WALRAVEN, G.; CHANDRAMOHAN, D. Effect on the Incidence of Pneumonia of Vitamin D Supplementation by Quarterly Bolus Dose to Infants in Kabul: A Randomised Controlled Superiority Trial. **Lancet**, v. 379, p. 1419-1427, dec.2016.

MANSON, J.M.; ZENICK, H.; COSTLOW, R.D. Teratology test methods for laboratory animals. In: Hayes, A.W. (Ed.), **Principles and methods of toxicology**, Raven Press, New York, 1982.

MANSON, J.M.; KANG, Y.J. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: Hayes, A.W. (ED). **Principles and Methods of Toxicology**. Raven Press, New York, 1994.

MAURO, M.O.; PESARINI, J.R.; ISHII, P.L.; SILVA, A.F.; OLIVEIRA, R.J. Chemopreventive activity of phenylalanine against damage mutagenic prompted by the acute administration of cyclophosphamide in mice pregnant and not pregnant using the micronucleus test.. **Revista Brasileira de Farmacognosia (Impresso)**, v. 20, p. 334-339, 2010.

MCGRATH, J.; SAARI, K.; HAKKO, H.; JOKELAINEN, J.; JONES, P.; JARVELIN, M.R.; CHANT, D.; ISOHANNI, M. Vitamin D supplementation during the first year of life and risk of schizophrenia: a Finnish birth cohort study. **Schizophrenia Research**, v. 67, p. 237–245, 2004.

MONDAL, K.; SETH, A.; MARWAHA, R.K.; DHANWAL, D.; ANEJA, S.; SINGH, R.; SONKARS, P. A Randomized Controlled Trial on Safety and Efficacy of Single Intramuscular versus Staggered Oral Dose of 600 000IU Vitamin D in Treatment of Nutritional Rickets. **Journal of tropical pediatrics**, v. 60, p. 203-2010, jun. 2014.

MOREIRA, C.Q.; FARIA, M.J.S.S.; BARONEZA, J.E.; OLIVEIRA, R.J.; MOREIRA, E.G. Developmental exposure to fenproporex: reproductive and morphological evaluation. **Human & Experimental Toxicology**, v. 24, p. 397-402, 2005.

MUSCOGIURI, G.; MARI, D.; PROLO, S.; FATTI, L.M.; CANTONE, M.C.; CARAGNANI, P.; AROSIO, B.; DI SOMMA, C.; VITALE, G. 25 Hydroxyvitamin D Deficiency and Its Relationship to Autoimmune Thyroid Disease in the Elderly. **Internacional Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, p. 850-857, 2016.

OECD- Guidelines for Testing of Chemicals. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. Test. No. 474,1997.

OECD-Guidelines for Testing of Chemicals Section 4: Health Effects. Test No. 414: Prenatal Development Toxicity Study. 2001.

OECD- Guidelines for Testing of Chemicals. Draft Proposal for an Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study. No.28, 2009.

OECD- Guidelines for Testing of Chemicals. *In vitro* mammalian Cell Microneucleus Test. Test. No. 487, 2012.

OLIVEIRA, R.J.; KANNO, T.Y.N.; SALLES, M.J.S.; LOURENÇO, A.C.S.; RIBEIRO, L.R.; FREIRIA, G.A.; MATIAZI, H.J.O.; MANTOVANI, M.S.; SILVA, A.F. Effects of the polysaccharide β -glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 53, p. 164-73, 2009.

OLIVEIRA, R.J.; MANTOVANI, M.S.; PESARINI, J.R.; MAURO, M.O.; DA SILVA, A.F.; SOUZA, T.R.; RIBEIRO, L.R. 6-Dimethylaminopurine and cyclohexamide are mutagenic and alter reproductive performance and intrauterine development *in vivo*. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, p. 834-849, 2015a.

OLIVEIRA, R.J.; FRONZA, L.S.; HONDA, R.E.; AQUINO, M.T.; MIRON-VANI, J.; PESSATTO, L.R.; NEVES, S.C.; PESARINI, J.R. Effects of *Avena sativa* L. supplementation on ponderal development, reproductive performance and embryo-fetal development of pregnant rats exposed to cyclophosphamide. **Perspectivas Experimentais e Clínicas, Inovações Biomédicas e Educação em Saúde**, v. 1, p. 1-8, 2015b.

RAHEJA, K.L.; JORDAN, A.; FOURCROY, J.L. Food and drug administration guidelines for reproductive toxicity testing. **Reproductive Toxicology**, p. 291-293, 1998.

STAPLES, R.E.; SCHNELL, V.L. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-Alizarin red S method for fetal bone. **Stain Technology**, v.39, p.61-3, 1964.

SAITO, F.H.; DAMASCENO, D.C.; DALLAQUA, B.; LINHARES, I.M.; RUDGE, M.V.C.; CALDERON, I.M.P.; WITKIN, S.S. Heat shock protein production and immunity and altered fetal development in diabetic pregnant rats. **Cell Stress and Chaperones**, v. 18, p. 25–33, 2013.

SINZATO, Y.K.; DAMASCENO, D.C.; LAUFER-AMORIM, R.; RODRIGUES, M.M.; OSHIWA, M.; TAYLOR, K.N.; RUDGE, M.V. Plasma concentrations and placental immunostaining of interleukin-10 and tumor necrosis factor- α as predictors of alterations in the embryo-fetal organism and the placental development of diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, p. 206–211, 2011

TAYLOR, P. Practical Teratology. **Academic Press**, New York, 1986.

ULRICH, F.; PETERMANN, F. "Consequences and Possible Predictors of Health-Damaging Behaviors and Mental Health Problems in Pregnancy – A Review." **Geburtshilfe und Frauenheilkunde**, v. 76, p. 1136–1156, dec. 2016.

ZIPITIS, C.S.; AKOBENG, A.K. Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Archives of Disease in Childhood**, v. 93, p. 512-517, jun.2008.

WILSON, J.G. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. In: WILSON, J.G.; WAEKANY, J. (Eds.). **Teratology: Principles and Techniques**. The University of Chicago Press, Chicago, 1965.

7. Considerações Gerais

Com base nos ensaios realizados e nos resultados obtidos, pode-se concluir que a vitamina D e vitamina D associada ao cálcio nas diferentes concentrações testadas, tanto pela via intramuscular quanto a via oral, não altera o desempenho reprodutivo e nem a integridade do DNA de fêmeas prenhez e, portanto, é segura para suplementação também durante o período gestacional.

Anexos

Tabela 1. Desenvolvimento ponderal das fêmeas tratadas com vitamina D e vitamina D associada ao cálcio.

Parâmetros Biométricos (g)					
Via intramuscular					
Grupos experimentais	Inicial	Final	Ganho de peso	Peso útero	Ganho de peso líquido
Controle	38,73±1,46 ^b	60,45±1,38 ^a	21,72±2,03 ^a	17,64±1,85 ^a	4,07±1,22 ^a
600.000UI	36,24±1,94 ^{ab}	61,57±2,55 ^a	25,33±1,69 ^a	19,63±1,77 ^a	5,69±0,54 ^a
6.000.000UI	32,72±1,66 ^{ab}	58,14±2,17 ^a	25,42±0,93 ^a	20,26±0,72 ^a	5,15±0,86 ^a
60.000.000UI	36,09±1,53 ^{ab}	60,12±1,99 ^a	24,03±1,34 ^a	18,04±1,49 ^a	5,98±0,65 ^a
600.000UI + Ca	34,03±1,11 ^{ab}	53,96±2,18 ^a	19,92±1,80 ^a	16,45±2,07 ^a	3,46±0,74 ^a
6.000.000UI + Ca	31,50±1,46 ^a	56,49±1,52 ^a	24,99±2,25 ^a	18,13±1,04 ^a	6,85±1,48 ^a
60.000.000UI + Ca	31,50±0,62 ^a	58,12±1,90 ^a	26,61±1,97 ^a	19,40±1,41 ^a	7,21±0,67 ^a
Via oral					
Grupos experimentais	Inicial	Final	Ganho de peso	Peso útero	Ganho de peso líquido
Controle	34,34±1,42 ^a	55,31±1,80 ^a	20,97±1,67 ^a	16,45±1,67 ^a	4,52±1,62 ^a
6.000UI	32,92±0,94 ^a	55,56±1,67 ^a	22,64±1,11 ^a	17,48±1,30 ^a	5,15±0,66 ^a
60.000UI	31,82±1,42 ^a	53,80±1,47 ^a	21,98±1,72 ^a	16,59±1,45 ^a	5,38±0,99 ^a
600.000UI	30,31±1,27 ^a	53,81±1,83 ^a	23,50±1,06 ^a	17,11±0,87 ^a	6,38±0,76 ^a
6.000UI + Ca	31,90±1,73 ^a	51,78±2,17 ^a	19,88±0,99 ^a	16,13±0,97 ^a	3,75±0,77 ^a
60.000UI + Ca	34,57±1,76 ^a	57,22±2,58 ^a	22,69±1,68 ^a	19,16±1,20 ^a	3,48±0,76 ^a
600.000UI + Ca	32,85±1,57 ^a	58,82±1,84 ^a	25,97±0,98 ^a	21,02±0,89 ^a	4,95±0,70 ^a

Legenda g – grama; Ca – Cálcio quelado. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste Anova/Tukey; p<0,05). Média±EPM.

Tabela 2. Pesos absoluto e relativo dos órgãos das fêmeas tratadas com vitamina D e vitamina D associada a cálcio.

Via Intramuscular					
Peso absoluto dos órgãos (g)					
Grupo experimentais	Coração	Pulmão	Rins	Fígado	Baço
Controle	0,19±0,010 ^a	0,20±0,012 ^a	0,41±0,020 ^a	2,77±0,010 ^a	0,127±0,008 ^a
600.000UI	0,18±0,009 ^a	0,23±0,012 ^a	0,42±0,028 ^a	2,74±0,163 ^a	0,151±0,017 ^a
6.000.000UI	0,17±0,007 ^a	0,22±0,008 ^a	0,38±0,019 ^a	2,59±0,102 ^a	0,139±0,012 ^a
60.000.000UI	0,19±0,010 ^a	0,24±0,023 ^a	0,44±0,030 ^a	2,71±0,102 ^a	0,145±0,012 ^a
600.000UI + Ca	0,18±0,018 ^a	0,23±0,014 ^a	0,39±0,020 ^a	2,62±0,096 ^a	0,168±0,015 ^a
6.000.000UI + Ca	0,16±0,013 ^a	0,22±0,014 ^a	0,39±0,020 ^a	2,73±0,088 ^a	0,131±0,010 ^a
60.000.000UI + Ca	0,16±0,013 ^a	0,21±0,010 ^a	0,38±0,020 ^a	2,73±0,116 ^a	0,158±0,013 ^a
Peso relativo dos órgãos					
Grupo experimentais	Coração	Pulmão	Rins	Fígado	Baço
Controle	0,003±0,0001 ^a	0,003±0,0001 ^a	0,006±0,0003 ^a	0,045±0,001 ^a	0,002±0,0001 ^a
600.000UI	0,002±0,0001 ^a	0,003±0,0001 ^a	0,007±0,0005 ^a	0,044±0,001 ^a	0,002±0,0001 ^{ab}
6.000.000UI	0,003±0,0001 ^a	0,003±0,0002 ^a	0,006±0,0002 ^a	0,044±0,001 ^a	0,002±0,0002 ^{ab}
60.000.000UI	0,003±0,0001 ^a	0,004±0,0003 ^a	0,007±0,0005 ^a	0,045±0,001 ^a	0,002±0,0002 ^{ab}
600.000UI + Ca	0,003±0,0003 ^a	0,004±0,0003 ^a	0,007±0,0003 ^a	0,048±0,001 ^a	0,003±0,0003 ^b
6.000.000UI + Ca	0,002±0,0001 ^a	0,004±0,0002 ^a	0,007±0,0002 ^a	0,048±0,001 ^a	0,002±0,0001 ^{ab}
60.000.000UI + Ca	0,002±0,0001 ^a	0,003±0,0002 ^a	0,006±0,0002 ^a	0,046±0,0007 ^a	0,002±0,0001 ^{ab}
Via Oral					
Peso absoluto dos órgãos (g)					
Grupo experimentais	Coração	Pulmão	Rins	Fígado	Baço
Controle	0,17±0,010 ^a	0,19±0,010 ^a	0,40±0,014 ^a	2,53±0,112 ^a	0,143±0,019 ^a
6.000UI	0,16±0,008 ^a	0,21±0,009 ^a	0,39±0,012 ^a	2,55±0,094 ^a	0,140±0,013 ^a
60.000UI	0,18±0,011 ^a	0,21±0,009 ^a	0,38±0,015 ^a	2,57±0,076 ^a	0,128±0,012 ^a
600.000UI	0,17±0,010 ^a	0,23±0,016 ^a	0,40±0,022 ^a	2,64±0,092 ^a	0,153±0,015 ^a
6.000UI + Ca	0,17±0,010 ^a	0,21±0,014 ^a	0,39±0,021 ^a	2,62±0,169 ^a	0,147±0,011 ^a
60.000UI + Ca	0,17±0,013 ^a	0,25±0,024 ^a	0,40±0,020 ^a	2,61±0,123 ^a	0,158±0,015 ^a
600.000UI + Ca	0,17±0,011 ^a	0,23±0,012 ^a	0,37±0,027 ^a	2,66±0,091 ^a	0,133±0,010 ^a
Peso relativo dos órgãos					
Grupo experimentais	Coração	Pulmão	Rins	Fígado	Baço
Controle	0,003±0,0002 ^a	0,003±0,0002 ^a	0,007±0,0002 ^a	0,040±0,002 ^a	0,002±0,0003 ^a
6.000UI	0,003±0,0001 ^a	0,003±0,0002 ^a	0,007±0,0002 ^a	0,040±0,001 ^a	0,002±0,0002 ^a
60.000UI	0,003±0,0002 ^a	0,003±0,0001 ^a	0,007±0,0003 ^a	0,040±0,001 ^a	0,002±0,0002 ^a
600.000UI	0,003±0,0001 ^a	0,004±0,0003 ^a	0,007±0,0003 ^a	0,040±0,001 ^a	0,002±0,0002 ^a
6.000UI + Ca	0,003±0,0001 ^a	0,004±0,0001 ^a	0,007±0,0003 ^a	0,050±0,001 ^a	0,002±0,0001 ^a
60.000UI + Ca	0,002±0,0001 ^a	0,004±0,0004 ^a	0,007±0,0001 ^a	0,040±0,001 ^a	0,002±0,0002 ^a
600.000UI + Ca	0,003±0,0001 ^a	0,003±0,0001 ^a	0,006±0,0004 ^a	0,040±0,0009 ^a	0,002±0,0001 ^a

Legenda: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas. (Teste Anova/Tukey; p<0,05)

Tabela 3. Parâmetros reprodutivos relativos as fêmeas tratadas com vitamina D e vitamina D associada ao cálcio.

Parâmetros Reprodutivos							
Via Intramuscular							
Grupos experimentais	Controle	600.000UI	6.000.000UI	60.000.000UI	600.000UI + Ca	6.000.000UI + Ca	60.000.000UI + Ca
Ninhadas Analisadas	10	10	10	10	10	10	10
Fetos Analisados	116	114	126	114	97	116	121
Implantes ¹	12,00±1,26 ^a	12,50±1,09 ^a	13,30±0,53 ^a	12,40±0,99 ^a	11,30±1,32 ^a	12,10±0,56 ^a	12,20±0,87 ^a
Fetos Vivos ¹	11,60±1,24 ^a	11,70±1,04 ^a	12,60±0,65 ^a	11,40±1,00 ^a	10,30±1,30 ^a	11,60±0,67 ^a	12,10±0,88 ^a
VF ¹	100±0,00 ^a	100±0,00 ^a	100±0,00 ^a	100±0,00 ^a	100±0,00 ^a	100±0,00 ^a	100±0,00 ^a
TPPI ¹	3,60±2,01 ^a	5,90±2,57 ^a	5,20±2,79 ^a	8,90±2,43 ^a	8,00±3,73 ^a	4,50±1,93 ^a	0,80±0,80 ^a
Reabsorção ¹	0,40±0,22 ^a	0,80±0,35 ^a	0,70±0,36 ^a	1,00±0,25 ^a	1,00±0,45 ^a	0,50±0,22 ^a	0,10±0,10 ^a
TR ¹	3,60±2,01 ^a	5,90±2,57 ^a	5,20±2,79 ^a	8,90±2,43 ^a	8,00±3,73 ^a	4,50±1,93 ^a	0,80±0,80 ^a
PF(g) ²	1,18±0,016 ^a	1,32±0,015 ^b	1,22±0,013 ^a	1,25±0,011 ^a	1,23±0,013 ^a	1,21±0,009 ^a	1,28±0,011 ^b
PP(g) ²	0,099±0,002 ^b	0,091±0,002 ^{ab}	0,085±0,001 ^a	0,102±0,002 ^b	0,091±0,002 ^{ab}	0,083±0,001 ^a	0,088±0,001 ^{ab}
IP ²	0,088±0,003 ^b	0,070±0,002 ^a	0,070±0,001 ^a	0,084±0,002 ^b	0,075±0,001 ^{ab}	0,069±0,001 ^a	0,069±0,001 ^a
APIP		PAIP	PAIP	PAIP	PAIP	PAIP	PAIP
RS ²	1,09±0,14 ^a	0,91±0,17 ^a	1,72±0,48 ^a	1,06±0,26 ^a	1,14±0,36 ^a	1,25±0,37 ^a	1,57±0,42 ^a
Via Oral							
Grupos experimentais	Controle	6.000UI	60.000UI	600.000UI	6.000UI + Ca	60.000UI + Ca	600.000UI + Ca
Ninhadas Analisadas	10	10	10	10	10	10	10
Fetos Analisados	107	115	107	112	108	120	130
Implantes ¹	11,10±1,09 ^a	12,10±0,91 ^a	10,90±0,86 ^a	11,50±0,45 ^a	11,10±0,87 ^a	12,20±0,74 ^a	13,50±0,45 ^a
Fetos Vivos ¹	10,70±1,09 ^a	11,50±0,71 ^a	10,70±0,84 ^a	11,20±0,44 ^a	10,70±0,74 ^a	11,90±0,72 ^a	13,00±0,55 ^a
VF ¹	100±0,00 ^a	100±0,00 ^a	100±0,00 ^a	100±0,00 ^a	100±0,00 ^a	100±0,00 ^a	100±0,00 ^a
TPPI ¹	4,30±2,09 ^a	4,10±1,92 ^a	1,70±1,13 ^a	2,40±1,22 ^a	2,90±2,04 ^a	2,10±1,58 ^a	3,90±1,88 ^a

Reabsorção¹	0,40±0,16 ^a	0,60±0,30 ^a	0,20±0,13 ^a	0,30±0,15 ^a	0,40±0,30 ^a	0,30±0,21 ^a	0,50±0,22 ^a
TR¹	4,30±2,09 ^a	4,10±1,92 ^a	1,70±1,13 ^a	2,40±1,22 ^a	2,90±2,04 ^a	2,10±1,58 ^a	3,90±1,88 ^a
PF(g)²	1,20±0,020 ^{ab}	1,14±0,020 ^a	1,19±0,020 ^{ab}	1,15±0,010 ^a	1,18±0,010 ^a	1,27±0,010 ^b	1,27±0,010 ^b
PP(g)²	0,100±0,002 ^{ab}	0,086±0,001 ^a	0,100±0,007 ^{ab}	0,098±0,001 ^{ab}	0,107±0,002 ^b	0,088±0,002 ^a	0,093±0,001 ^{ab}
IP²	0,088±0,003 ^b	0,083±0,003 ^a	0,091±0,007 ^a	0,086±0,001 ^b	0,091±0,002 ^b	0,070±0,001 ^a	0,074±0,001 ^a
APIP		PAIP	PAIP	PAIP	PAIP	PAIP	PAIP
RS²	0,96±0,21 ^a	1,25±0,25 ^a	0,99±0,17 ^a	1,07±0,20 ^a	1,12±0,26 ^a	1,12±0,26 ^a	0,85±0,14 ^a

Legenda: VF:viabilidade fetal; TPPI: taxa de perdas pós implantacionais; TR: taxa de reabsorção; PP: peso placentário; PF: peso fetal; IP: índice placentário; APIP: adequação do peso à idade de prenhez; PAIP: peso adequado à idade de prenhez; RS: razão sexual. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas. (Teste: ¹Anova /Tukey; ²Kruskal-Wallis/Dunn; p<0,05)

Tabela 4. Relação e frequência de malformações externas na prole de fêmeas tratadas com vitamina D e vitamina D associada a cálcio.

Malformações externas															
Grupos Experimentais	Controle		600.000UI		6.000.000UI		60.000.000UI		600.000UI + Ca		6.000.000UI + Ca		60.000.000UI + Ca		
Ninhadas analisadas	9		10		10		10		10		10		10		
Fetos Analisados	121		118		130		113		102		115		121		
Via Intramuscular															
	NA	%	NA	%	NA	%	NA	%	NA	%	NA	%	NA	%	
Retr.Post.Unilateral	3	2,13±1,58 ^a	8	6,02±2,27 ^a	7	5,65±2,01 ^a	4	3,83±2,70 ^a	16	13,34±4,51 ^a	10	8,28±2,77 ^a	10	7,76±2,67 ^a	
Retr.Pos.Bilateral	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	1	0,91±0,91 ^a	1	1,11±1,11 ^a	1	0,91±0,91 ^a	0	0,00±0,00 ^a	
Retr.Ant.Unilateral	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	1	0,91±0,91 ^a	0	0,00±0,00 ^a	
Est. Post. Unilateral	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	2	2,16±1,46 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	
Est. Ant. Unilateral	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	4	3,93±2,01 ^a	1	0,91±0,91 ^a	1	0,71±0,71 ^a	
Hematoma	1	0,67±0,67 ^a	1	0,83±0,83 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	1	0,87±0,71 ^a	0	0,00±0,00 ^a	
Cauda em virgula	0	0,00±0,00 ^a	1	0,83±0,83 ^a	0	0,00±0,00 ^a	1	0,71±0,71 ^a	2	1,67±1,67 ^a	7	6,08±3,76 ^a	5	3,63±1,98 ^a	
Hidropsia	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	1	1,43±1,43 ^a	
Gastrosquise	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	1	0,83±0,83 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	
Escoliose	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	1	0,91±0,91 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	
Via Oral															
Parâmetros	Controle		6.000UI		60.000UI		600.000UI		6.000UI + Ca		60.000UI + Ca		600.000UI + Ca		
Ninhadas analisada	10		10		10		10		10		10		10		
Fetos Analisados	101		113		108		116		107		117		131		
	NA	%	NA	%	NA	%	NA	%	NA	%	NA	%	NA	%	
Retr.Post.Unilateral	4	3,24±1,68 ^a	0	0,00±0,00 ^a	3	2,31±1,64 ^a	3	2,53±1,30 ^a	1	0,77±0,77 ^a	8	6,45±3,77 ^a	5	3,93±2,74 ^a	
Retr.Pos.Bilateral	0	0,00±0,00 ^a	2	1,43±1,43 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	

Hematoma	1	0,67±0,67 ^a	1	0,67±0,67 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	1	0,91±0,91 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a
Cauda em vírgula	2	1,67±1,14 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	1	0,77±0,77 ^a	2	1,55±1,04 ^a	2	1,67±1,67 ^a
Gastrosquise	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	2	2,22±2,22 ^a	0	0,00±0,00 ^a	1	0,77±0,77 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a

Legenda: Na - número absoluto de fetos que apresentam a malformação, % valor médio ± erro padrão da média; (Teste Kruskal-Wallis/Dunn; p<0,05)

Tabela 5. Relação e frequência de malformações viscerais na prole de fêmeas tratadas com vitamina D e vitamina D associada a cálcio.

Malformações viscerais															
Via Intramuscular															
Grupos Experimentais	Controle		600.000UI		6.000.000UI		60.000.000UI		600.000UI + Ca		6.000.000UI + Ca		60.000.000UI + Ca		
	NA	%	NA	%	NA	%	NA	%	NA	%	NA	%	NA	%	
Ninhadas analisadas	9		10		10		10		10		10		10		
Fetos Analisados	57		59		66		59		53		58		62		
Hidrocefalia leve	3	5,29±2,66 ^a	1	5,00±5,00 ^a	1	2,00±2,00 ^a	5	14,54±9,78 ^a	2	5,00±3,33 ^a	2	2,86±2,86 ^a	2	2,50±1,67 ^a	
Hidronefrose leve	1	1,85±1,85 ^a	0	0,00±0,00 ^a	2	3,43±2,33 ^a	3	4,52±3,14 ^a	1	2,00±2,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	2	3,75±2,67 ^a	
Fenda Palatina leve	8	18,43±8,10 ^a	3	5,00±3,56 ^a	1	1,67±1,67 ^a	2	2,54±1,71 ^a	2	2,92±1,97 ^a	8	14,43±8,83 ^a	7	9,17±5,34 ^a	
Fenda Palatina grave	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	1	1,67±1,67 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	
Via Oral															
Grupos Experimentais	Controle		6.000UI		60.000UI		600.000UI		6.000UI + Ca		60.000UI + Ca		600.000UI + Ca		
	NA	%	NA	%	NA	%	NA	%	NA	%	NA	%	NA	%	
Ninhadas analisadas	9		10		10		10		10		10		10		
Fetos Analisados	49		56		56		60		48		59		67		
Hidrocefalia leve	1	5,56±5,56 ^{ab}	5	7,14±7,14 ^a	3	5,43±2,81 ^{ab}	12	21,76±8,35 ^b	0	0,00±0,00 ^{ab}	8	12,6±4,55 ^{ab}	1	1,67±1,67 ^{ab}	
Hidronefrose leve	1	1,39±1,39 ^a	6	9,64±7,30 ^a	6	12,00±8,54 ^a	7	12,76±5,09 ^a	5	10,50±5,50 ^a	5	10,33±4,51 ^a	0	0,00±0,00 ^a	
Hidronefrose mod.	1	1,39±1,39 ^a	0	0,00±0,00 ^a	1	2,00±2,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	
Fenda Palatina leve	4	8,44±3,47 ^a	3	5,43±4,10 ^a	1	1,43±1,43 ^a	5	8,53±4,16 ^a	6	12,93±3,87 ^a	5	7,20±3,22 ^a	3	4,53±2,31 ^a	
Fenda Palatina grave	1	1,59±1,59 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	1	1,43±1,43 ^a	

Legenda: Na - número absoluto de fetos que apresentam a malformação, % valor médio ± erro padrão da média; Mod - moderada. Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas. (Teste Kruskal-Wallis/Dunn; p<0,05)

Tabela 6. Relação e frequência de malformações esqueléticas na prole de fêmeas tratadas com vitamina D e vitamina D associada a cálcio.

Malformações esqueléticas															
Grupos experimentais	Controle		600.000UI		6.000.000UI		60.000.000UI		600.000UI + C		6.000.000UI + C		60.000.000UI+C		
Ninhadas analisadas	9		10		10		10		10		10		10		
Fetos Analisados	57		59		66		59		53		58		62		
Via Intramuscular															
	NA	%	NA	%	NA	%	NA	%	NA	%	NA	%	NA	%	
Membros Posteriores															
Falanges distais	50	98,57±4,52 ^a	51	85,00±33,75 ^a	57	94,4±9,39 ^a	53	96,0±12,65 ^a	51	90±31,62 ^a	51	98,33±5,27 ^a	53	89,4±12,35 ^a	
Falanges proximais	12	24,02±9,92 ^a	6	10,00±8,31 ^a	4	5,95±4,42 ^a	5	8,69±3,93 ^a	0	0,00±0,00 ^a	2	4,00±2,67 ^a	2	3,67±2,46 ^a	
Rotação da fíbula sobre a tíbia	9	13,25±7,49 ^a	2	4,17±2,85 ^a	13	24,64±11,65 ^a	13	22,14±11,88 ^a	5	9,33±4,99 ^a	15	26,29±9,71 ^a	24	47,69±12,3 ^a	
Púbis OR	1	1,43±1,43 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	
Membros Anteriores															
Falange distais	42	79,67±10,4 ^a	38	65,42±11,04 ^a	26	41,90±12,11 ^a	29	56,43±13,31 ^a	27	47,58±8,30 ^a	33	69,43±12,45 ^a	23	43,10±12,22 ^a	
Falanges proximais	3	8,93±5,30 ^a	3	5,00±5,00 ^a	2	2,86±2,86 ^a	3	5,60±2,97 ^a	0	0,00±0,00 ^a	2	4,00±2,67 ^a	2	3,67±2,46 ^a	
Esterno															
Centro Esterno	47	89,90±5,12 ^a	48	80,83±6,34 ^a	42	70,00±9,87 ^a	43	76,45±5,59 ^a	47	91,67±4,30 ^a	32	63,62±10,03 ^a	46	74,57±6,27 ^a	
Manúbrio	1	1,25±1,25 ^a	0	0,00±0,00 ^a	1	1,43±1,43 ^a	1	1,67±1,67 ^a	0	0,00±0,00 ^a	5	9,33±4,99 ^a	2	5,00±3,56 ^a	
Processo Xifoide	1	1,43±1,43 ^a	6	10,00±7,12 ^a	2	3,33±3,33 ^a	7	13,33±7,78 ^a	2	2,50±2,50 ^a	3	5,33±3,69 ^a	2	6,67±6,67 ^a	
Crânio															
Presfenóide	26	50,32±7,68 ^a	39	69,17±8,96 ^a	29	48,98±11,34 ^a	24	47,24±7,06 ^a	27	47,86±8,19 ^a	21	37,57±11,59 ^a	25	36,73±11,09 ^a	
Palato	1	1,25±1,25 ^a	6	10,83±6,81 ^a	2	2,86±1,90 ^a	11	18,93±6,69 ^a	1	2,00±2,00 ^a	3	8,33±6,69 ^a	9	11,25±9,94 ^a	
Supraoccipital	0	0,00±0,00 ^a	3	4,58±2,36 ^a	0	0,00±0,00 ^a	1	1,67±1,67 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	

OR

Parietal OR	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	1	1,67±1,67 ^a	1	3,33±3,33 ^a
Interparietal OR	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	2	3,67±2,46 ^a	2	3,33±3,33 ^a
Vértébras														
Centro vertebral	0	0,00±0,00 ^a	1	2,50±2,50 ^a	0	0,00±0,00 ^a	1	1,43±1,43 ^a	2	2,50±2,50 ^a	0	0,00±0,00 ^a	3	7,92±6,65 ^a

Via Oral

Grupos experimentais	Controle		6.000UI		60.000UI		600.000UI		6.000UI + C		60.000UI + C		600.000UI+C	
	NA	%	NA	%	NA	%	NA	%	NA	%	NA	%	NA	%
Ninhadas analisadas	10		10		10		10		10		10		10	
Fetos Analisados	52		56		55		54		56		58		64	
Membros Posteriores														
Falanges distais	50	97,14±2,86 ^a	56	100±0,00 ^a	54	98,33±1,67 ^a	53	97,5±2,50 ^a	56	100±0,00 ^a	55	94,10±5,34 ^a	62	97,14±2,86 ^a
Falanges proximais	8	16,00±11,07 ^a	8	12,00±9,98 ^a	10	27,17±12,8 ^a	15	28,83±11,0 ^a	0	0,00±0,00 ^a	5	9,25±7,96 ^a	1	1,25±1,25 ^a
Metatarso	0	0,00±0,00 ^a	7	10,00±10,0 ^a	5	10,00±10,0 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a
Rotação da fíbula sobre a tíbia	0	0,00±0,00 ^a	6	10,00±8,31 ^a	10	16,19±8,96 ^a	8	16,10±6,98 ^a	8	13,19±8,1 ^a	4	7,10±4,19 ^a	4	5,71±4,36 ^a
Púbis	0	0,00±0,00 ^a	1	1,43±1,4 ^a	1	1,67±1,67 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a
Ausência de ísquio	0	0,00±0,00 ^a	1	1,43±1,43 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a
Sindactilia	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	2	1,62±3,38 ^a	2	1,62±3,45	0	0,00±0,00 ^a	1	0,83±2,63 ^a	1	0,71±2,26 ^a
Membros Anteriores														
Falange distais	32	67,17±10,93 ^a	44	77,50±7,24 ^a	28	58,48±11,5 ^a	46	84,55±7,99 ^a	44	79,67±6,7 ^a	48	81,24±8,30 ^a	33	52,86±12,0 ^a
Falanges proximais	1	2,00±2,00 ^a	7	10,00±10,0 ^a	10	27,5±14,17 ^a	14	26,33±10,1 ^a	0	0,00±0,00 ^a	2	3,25±2,24 ^a	0	0,00±0,00 ^a
Metacarpo	0	0,00±0,00 ^a	7	10,00±10,0 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a
Esterno														

Centro Esterno	41	67,17±10,93 ^a	44	77,50±7,24 ^a	28	58,48±11,5 ^a	46	84,55±7,99 ^a	44	79,67±6,7 ^a	48	81,24±8,30 ^a	33	52,86±12,0 ^a	
Manúbrio	1	1,25±1,25 ^a	1	2,00±2,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	1	1,67±1,67 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	
Processo Xifoide	1	2,00±2,00 ^a	1	2,00±2,00 ^a	4	7,36±3,80 ^a	14	26,09±5,79 ^b	1	1,67±1,67 ^a	4	5,00±5,00 ^a	3	5,36±2,88 ^a	
Crânio															
Presfenóide	26	44,29±12,21 ^a	40	72,00±11,1 ^a	32	53,76±11,5 ^a	34	63,28±7,61 ^a	37	66,71±6,8 ^a	24	38,20±11,45 ^a	43	68,69±8,44 ^a	
Palato	2	4,00±4,00 ^a	6	8,57±8,57 ^a	5	10,00±10,0 ^a	1	1,43±1,43 ^a	1	1,67±1,67 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	
Supraoccipital															
OR	0	0,00±0,00 ^a	7	10,00±10,0 ^a	8	17,00±10,5 ^a	9	15,33±8,42 ^a	0	0,00±0,00 ^a	6	10,29±6,97 ^a	1	2,50±2,50 ^a	
Parietal OR	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	2	3,67±2,46 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	1	1,43±1,43 ^a	
Interparietal OR	0	0,00±0,00 ^a	9	13,67±9,89 ^a	6	11,67±9,95 ^a	3	5,33±3,69 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	4	5,71±5,71 ^a	
Nasal OR	0	0,00±0,00 ^a	2	4,00±4,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	1	1,43±1,43 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	
Vértebras															
Centro vertebral	0	0,00±0,00 ^a	1	1,67±1,67 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	
Costelas	0	0,00±0,00 ^a	2	3,33±3,33 ^a	1	1,43±1,43 ^a	2	2,00±2,00 ^a	0	0,00±0,00 ^a	1	1,67±1,67 ^a	0	0,00±0,00 ^a	

Legenda: Na - número absoluto de fetos que apresentam a malformação, % valor médio ± erro padrão da média; OR - ossificação reduzida. Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas. (Teste Kruskal-Wallis/Dunn; p<0,05)

Tabela 7. Frequência de micronúcleos no 11^o, 12^o e 13^o dias gestacionais em fêmeas tratadas com vitamina D e vitamina D associada ao cálcio.

Micronúcleo			
Via Intramuscular			
Grupos experimentais	11 ^o	12 ^o	13 ^o
Controle	7,90±0,37 ^a	8,10±0,37 ^{ab}	7,30±0,49 ^a
600.000UI	10,20±1,30 ^{ab}	7,70±0,94 ^a	8,50±1,23 ^a
6.000.000UI	10,20±1,03 ^{ab}	12,30±1,58 ^b	11,60±1,56 ^a
60.000.000UI	13,20±1,34 ^b	9,70±0,98 ^{ab}	10,40±1,36 ^a
600.000UI + Ca	10,30±1,46 ^{ab}	8,00±1,02 ^{ab}	7,90±1,04 ^a
6.000.000UI + Ca	8,30±0,94 ^a	11,60±0,95 ^{ab}	11,10±0,70 ^a
60.000.000UI + Ca	10,00±0,86 ^{ab}	10,60±1,12 ^{ab}	8,70±1,05 ^a
Via Oral			
Grupos experimentais	11 ^o	12 ^o	13 ^o
Controle	8,70±0,63 ^a	9,00±0,98 ^{ab}	7,20±0,61 ^a
6.000UI	9,90±0,75 ^a	9,60±0,85 ^{ab}	9,20±0,85 ^a
60.000UI	9,80±0,44 ^a	9,80±0,98 ^{ab}	8,20±0,92 ^a
600.000UI	9,80±3,64 ^a	11,30±0,81 ^b	9,20±1,02 ^a
6.000UI + Ca	11,30±1,22 ^a	9,00±0,04 ^{ab}	8,40±0,80 ^a
60.000UI + Ca	9,20±0,59 ^a	6,80±0,72 ^a	7,80±1,07 ^a
600.000UI + Ca	7,90±0,54 ^a	6,80±0,72 ^a	6,20±0,81 ^a

Legenda: 11^o dia de gestação, 12^o dia de gestação, 13^o dia de gestação. Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas. (Teste Anova/Tukey; p<0,05).

Coloque aqui em anexo o comprovante de submissão e em seguida o pdf da revista.