

Este exemplar
foi devidamente
arquivado conforme
resolução C.P.G./036/83
Piracicaba, 26 de Janeiro de
1988

Maria Amália Valadão Dias
Prof. Dr. Maria Amália Valadão Dias
Coordenadora da UNICAMP
FCX - UNICAMP

MARIA AMÁLIA VALADÃO DIAS

ESTUDO DA GLÂNDULA LACRIMAL EXTRA ORBITÁRIA DE RATOS,
CUJAS MÃES FORAM TRATADAS COM PALMITATO DE VITAMINA
"A" NO DÉCIMO DIA DE GESTAÇÃO .

Tese apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba,
UNICAMP, para obtenção do
grau de Doutor em Ciências .
Área de concentração :
Farmacologia .

Piracicaba
1987

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais, Samuel e Maria Laura, pelo apoio incondicional de todos os momentos.

Ao Marcos, meu esposo e amigo, pela compreensão, incentivo e carinho.

Aos meus filhos, Ana Laura, Evelize, Gustavo e Liana, porque souberam aceitar com amor a minha ausência, em momentos importantes de suas vidas.

Dedico este trabalho.

Ao Professor Newton de Barros Duarte, por cujas mãos ingressei na carreira do Magistério e à Dra. Wilma Pereira Bastos Ramos, que fez despertar em mim o gosto pela pesquisa,

a minha especial homenagem.

gratidão

Ao Prof. Dr. Samir Tufic Arbex, pela orientação segura e competente, que permitiu a elaboração deste trabalho e, ainda, pela amizade sincera e valiosa,

o meu profundo reconhecimento.

Ao Professor Dr. José Renan Vieira da Costa, pesquisador
brilhante e dedicado, pelos inestimáveis ensinamentos ,
participação ativa e dinâmica no decorrer desta pesquisa,

meu sincero muito obrigada.

Agradecimentos

Ao Dr. Paulo Renato Costa Souza, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pela oportunidade a nós conferida para a conclusão do Curso de Pós Graduação.

Em especial à Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP), através de seu Digníssimo Diretor, Dr. Simonides Consani.

À Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas (EFOA), através de seu Digníssimo Diretor, Prof. Dr. Afrânio Caiafa de Mesquita, e à Comissão do PICD-EFOA, que permitiram a realização do Curso de Pós Graduação.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Neder- (UNICAMP), um dos pioneiros da Farmacologia no Brasil, pela criação do curso de Pós Graduação na Faculdade de Odontologia de Piracicaba, e consequente oportunidade a nós oferecida para a realização desta pesquisa.

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP) pela assistência e cooperação.

À Professora Ruth de Andrade Schemy, chefe do Departamento de Farmacologia e Fisiologia, EFOA-Alfenas, pelo interesse e estímulo no decorrer desta pesquisa.

À Professora Dra. Ana Maria Duarte Dias Costa- EFOA- por suas críticas e sugestões e, em particular, por sua disponibilidade sem limites e amizade fraterna.

À Professora Fátima de Souza- EFOA- Alfenas, pela valiosa contribuição na execução dos gráficos.

Aos Professores José Sebastião Martins e Sandra Regina Remon-
di Introcaso Paschoal - EFOA - Alfenas, pela realização das
análises estatísticas.

Ao Professor Dr. Walter Rocha, pela colaboração na realização
da documentação fotográfica.

Aos Senhores Carlos Bernardes Pereira e Silas Barbosa Maia -
EFOA - Alfenas, pelo cuidado com os animais utilizados no pre
sente trabalho.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Farmacologia e
Fisiologia - EFOA - Alfenas, pelo incentivo no decorrer deste
trabalho.

A todos que, embora não citados nominalmente, contribuíram na
realização deste trabalho.

ÍNDICE

1, INTRODUÇÃO	1
1.1, Efeitos da hipervitaminose A nas membranas celulares	2
1.2, Efeitos da hipervitaminose A nas glândulas exócrinas	3
1.3, Efeitos da hipervitaminose A na hipófise, tireóide, supra-renal (adrenal) e testículo	8
1.4, Controle hormonal da glândula lacrimal	11
1.5, Vitamina A e desenvolvimento embrionário	12
1.6, Proposição	15
2, MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1, Material	18
2.2, Técnica de determinação do período de gravidez ..	18
2.3, Técnica de dissecação e pesagem	19
2.4, Técnicas histológicas	19
2.5, Técnicas morfométricas	20
2.5.1, Técnica de CHALKLEY	20
2.5.2, Cariometria	20
2.6, Técnicas estatísticas	22
2.6.1, Teste de Mediana (SIEGEL, 1956)	23
3, RESULTADOS	25
3.1, Resultados morfológicos	26
3.1.1, Peso corporal e glandular	26
3.2, Resultados histológicos	40
3.3, Resultados morfométricos	44
3.3.1, Técnica de CHALKLEY	44

3.4. Resultados cariométricos	67
3.4.1. Cariometria	67
4. DISCUSSÃO	90
5. CONCLUSÕES	99
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

1 . INTRODUÇÃO

Os estudos da hipervitaminose A abrangem a avaliação de uma multiplicidade de ações e efeitos. Para facilitar ao leitor, apresentaremos nesta introdução os efeitos conseqüentes à hipervitaminose A nas membranas celulares e nas organelas, os efeitos da vitamina A nas glândulas exócrinas e endócrinas, o controle hormonal a que as glândulas lacrimais extra orbitárias estão sujeitas e a ação da vitamina A no desenvolvimento em brionário.

1.1 EFEITOS DA HIPERVITAMINOSE A NAS MEMBRANAS CELULARES

A administração de doses excessivas de vitamina A no rato, camundongo, cobaio, coelho e galinha, provoca inicialmente, um aumento da permeabilidade e posteriormente a destruição das membranas das organelas celulares e da própria membrana citoplasmática (FELL & THOMAS, 1960; THOMAS & cols. 1960; DINGLE, 1961; DINGLE & cols., 1961; FELL & cols., 1962; DINGLE & LUCY, 1962; JANOFF & McCLUSKEY, 1962; WEISSMANN & cols., 1963; GLAUERT & cols., 1963; LUCY & cols., 1963; DANIEL & cols., 1966; GLICK & KERR, 1968). Estes autores verificaram também que o rompimento das membranas provocava um aumento da atividade enzimática, resultante, principalmente, da ruptura dos lisossomos e conseqüente liberação de enzimas, tais como: catepsina, fosfatase

ácida, beta-glucoronidase, beta-hexosaminidase, hialuronidase e arilsulfatase.

APPELMANS & DE DUVE (1955) e DINGLE (1961), estudando células fracionadas do fígado de rato, verificaram que a liberação daquelas enzimas pelos lisossomos dependia da temperatura, da concentração hidrogeniônica do meio e da concentração de vitamina A.

MORRIS & STEELE (1974), utilizando embriões de ratos cultivados em meio de cultura contendo vitamina A, observaram alterações citológicas, como o aumento da área de superfície da membrana plasmática e das membranas das organelas, vacúolos autofágicos, pequenos vacúolos abertos na superfície celular, distorção dos núcleos, com aumento dos espaços intramembranosos, condensação mitocondrial e, finalmente, morte celular.

YOUNG & cols. (1971), em estudos dos hepatócitos de ratos, mantidos em meio de cultura com fenobarbital, observaram proliferação rápida do retículo endoplasmático rugoso. Em face desses achados, RAM & MISRA (1974) tentaram inibir essa proliferação da organela adicionando, ao meio de cultura, fenobarbital + vitamina A. Estes autores puderam verificar que a proliferação rápida do RER era aditiva e que a membrana desse retículo se comportava de modo diferente das demais membranas celulares, frente à vitamina A.

1.2 EFEITOS DA HIPERVITAMINOSE A NAS GLÂNDULAS EXÓCRINAS.

Os efeitos da hipervitaminose A nas glândulas exócrinas foram estudados, principalmente, nas glândulas salivares.

REGÉZI & ROWE (1972), administrando ao rato 50.000 UI diárias de vitamina A, oralmente, durante 16 dias, verificaram, na glândula submandibular, hiperplasia e hipertrofia do RER e do aparelho de Golgi, fendas no RER, formação prematura de grânulos de secreção e espaços acinares dilatados. Estes achados ultra-estruturais foram interpretados como hiperatividade glandular.

Estes mesmos autores, administrando 10.000 UI de vitamina A, oralmente, a cada 2 dias durante 16 semanas, observaram, na glândula submandibular, degeneração do RER, vacuolização acinar, degranulação ribossômica e restos degenerados do citoplasma. Observaram ainda células degeneradas nos ductos estriados. Tal quadro foi interpretado como o de exaustão glandular.

Estudando a glândula sublingual do rato submetido à hipervitaminose A, MODIS & cols. (1972) verificaram que as mucinas eram abundantes e fortemente coráveis pelo azul de Alcian, pelo PAS, e que eram metacromáticas; e que os ácinos se encontravam dilatados e repletos de muco filamentososo.

LOPES & cols. (1973), estudando os efeitos de doses excessivas de vitamina A nas glândulas salivares linguais posteriores do rato, observaram, na glândula de Webber, uma diminuição no tamanho das células acinares e dos núcleos, com diminuição da basofilia citoplasmática e do conteúdo de mucopolissacarídeos neutro e ácidos. Essas alterações foram também observadas na glândula de von Ebner, porém com menor evidência. Tais resultados foram observados também por PETENUSCI &

cols. (1976), tendo esses autores verificado ainda que essas glândulas apresentavam estruturas normalizadas após 60 dias de recuperação.

LOPES & cols. (1974) e PETENUSCI & cols. (1976), estudando a glândula sublingual do rato hipervitaminótico A, verificaram ácinos diminuídos em tamanho, com células mais baixas e núcleos menores. Os grânulos citoplasmáticos apresentaram-se esparsos e reduzidos em número. Os ductos estriados evidenciaram, também, redução em tamanho, assim como acidofilia citoplasmática menos intensa. Observaram ainda diminuição no conteúdo de mucopolissacarídeos neutro e ácidos no produto de secreção da glândula. Também a sublingual mostrou histologicamente sinais evidentes de normalização. após 60 dias de recuperação.

Estudando a glândula submandibular de ratos submetidos à hipervitaminose A, PETENUSCI & cols. (1976) observaram ácinos e ductos diminuídos em tamanho. Em alguns animais, os ductos demonstraram desorganização, com núcleos diminuídos em tamanho e nem sempre localizados na porção basal da célula. Os grânulos citoplasmáticos apareciam rarefeitos por todo o citoplasma celular. Após 60 dias de recuperação, a glândula mostrou-se histologicamente semelhante à dos controles.

ROSA & cols. (1976) observaram que o conteúdo da glândula em ácido siálico e hexosaminas estava diminuído nas glândulas sublingual e submandibular do rato. Não foi observada alteração na glândula parótida.

Em 1977, PICCOLO & col., estudando os efeitos da hi -

pervitaminose A nas glândulas salivares submandibular, parótida, sublingual e linguais posteriores do cobaio, verificaram as mesmas alterações descritas para o rato.

Em um estudo sobre os efeitos da hipervitaminose A crônica nas glândulas submandibular e sublingual do rato, BUONAROTT & cols. (1977) verificaram não haver diferença estrutural nessas glândulas, quando o animal recebeu 50 UI de vitamina A/grama de peso corporal, durante 53 dias; entretanto, quando o rato recebeu 70 UI da vitamina, durante 68 dias, houve uma diminuição no conteúdo citoplasmático de ácido siálico.

Estudos morfométricos de glândulas salivares de ratos submetidos à hipervitaminose A foram realizados por LOPES & cols. (1980) na glândula sublingual, por LOPES & cols. (1980) na glândula submandibular e na glândula parótida por LOPES & cols. (1979). Os achados morfométricos pela utilização da técnica de CHALKLEY (1943), cariometria e cálculo da área acinar confirmaram os achados histológicos anteriormente estudados por outros autores.

Com relação a estudos da possível reversibilidade das alterações observadas nas glândulas salivares de ratos submetidos à hipervitaminose A, podemos citar os trabalhos de LOPES & cols. (1979), os quais observaram na glândula submandibular que o volume nuclear das células glandulares se normaliza após 60 dias de recuperação, enquanto a área dos ácinos e dos ductos estriados apresentaram normalização somente com 90 dias de recuperação. Para a glândula lingual posterior de WE-

BER, os estudos da reversibilidade à hipervitaminose A feitos por LOPES & cols. (1980), demonstraram uma reversão ao estado de normalidade das alterações nas estruturas celulares, somente após 90 dias de recuperação. Observações semelhantes foram feitas por LOPES & cols. (1981) com relação à glândula sublingual.

O estudo morfométrico da reversibilidade das alterações de glândulas palatinas de ratos submetidos à hipervitaminose A foi realizado por LOPES & cols. (1982), e estes autores observaram um retorno ao normal desta glândula em apenas 30 dias de recuperação.

Além das glândulas salivares, a ação da vitamina A administrada em excesso em outras glândulas exócrinas é bastante interessante. A glândula de Harder do rato em puberdade, por exemplo, mostrou-se muito sensível aos efeitos provocados pela vitamina, com alterações estruturais muito semelhantes às apresentadas pelas glândulas salivares, isto é, ácinos de menor volume e as células mais baixas e, no citoplasma, uma diminuição da eosinofilia e da quantidade de vacúolos. Muitas das células acinares apresentaram-se sem forma definida e rompidas; a luz dos ácinos apresentou um produto de secreção esparso no seu interior, e os núcleos menos basófilos e com cromatina menos intensa. Essa glândula mostrou um aumento do tecido conjuntivo fibroso entre os ácinos. (COSTA & cols., 1978).

Quando se estudaram os efeitos da vitamina A na glândula de Harder de ratos por outra via de administração, os re

sultados foram bastante diferentes, assim é que ROCHA (1987) observou que a vitamina A passando do leite materno para os filhotes, provocava na glândula destes animais, um desenvolvimento precoce da glândula, bem como uma hipertrofia caracterizada por uma hiperfunção e aumento do conjuntivo intersticial.

Com relação à glândula nasal lateral do rato, a hipervitaminose A não provocou alteração estrutural na porção mucosa, entretanto, a porção serosa mostrou ácinos menores, com células mais baixas, de citoplasma menos volumoso com núcleos menores e picnóticos quando comparados ao controle (PICCOLO & cols., 1978).

A glândula lacrimal extra orbitária de ratos jovens e adultos submetidos à hipervitaminose A também já foi estudada (COSTA & cols. 1979). Estes autores observaram um comportamento da vitamina A nesta glândula bastante interessante, como células acinares aumentadas em volume, com contornos mais nítidos e com aumento do produto de secreção e núcleos maiores.

Um fenômeno relevante observado por estes autores foi o aumento da poliploidia nuclear, dando à glândula, portanto, um aspecto mais envelhecido.

1.3 EFEITOS DA HIPERVITAMINOSE A NA HIPÓFISE, TIREÓIDE SUPRA-RENAL (ADRENAL) E TESTÍCULO

Existe uma interação complexa entre os efeitos da hipervitaminose A nas glândulas endócrinas e efeitos secundária -

rios ou coadjuvantes dos hormônios secretados em maior ou menor quantidade, sobre a morfologia e função dessas glândulas.

Assim sendo, estudando os efeitos da hipervitaminose A sobre a hipófise do rato, BISWAS & MUKHERJI (1968) verificaram uma diminuição das células secretoras de FSH, como também aventaram a hipótese de haver uma secreção aumentada de ACTH.

Já em 1934, SHERWOOD & cols. observaram que a administração de vitamina A em excesso afetava quantitativamente o colóide da glândula tireóide, diminuindo-o. Além disso, mais tarde, foram observadas alterações histológicas nessa glândula, a qual se apresentou menor (UOTILA, 1938; SADHU & BRODY, 1947; SADHU, 1948).

Ficou demonstrado, ainda, que a hipervitaminose A ocasiona uma queda do consumo de oxigênio da tireóide (LOGARAS & DRUMMOND, 1938; SADHU & BRODY, 1947; SADHU, 1948), além de ocasionar uma redução na concentração sanguínea do hormônio tireoidiano, enquanto que a captação de I^{131} estava aumentada (TAKEKOSHI, 1964), e que tal fato seria devido a uma aceleração da deionização da tiroxina (SHICHIJO & SHINODA, 1962).

Esses efeitos diretos da vitamina A possivelmente sejam coadjuvados pela falta de TSH (FELLINGER & HOCHSTAEDT, 1934; SADHU & TRUSCOTT, 1948).

STUDER & cols. (1966), em ratos e TAKEKOSHI (1964), em ratas grávidas, verificaram que as adrenais desses animais, quando submetidos à hipervitaminose A, apresentavam-se hipertrofiadas e com hiperfunção.

Ainda em 1962, SAFFRAN chamava a atenção para o fato de a adrenal hiperativa apresentar-se com a síntese e a secreção de corticóides aumentadas.

Na tentativa de determinar se a hipertrofia da adrenal seria devida ao efeito direto da vitamina A sobre a glândula ou se tal hipertrofia seria mediada via hipófise, NATANSON & cols. (1966) executaram um experimento em ratos machos pesando 40 a 50 g., em ratos hipofisectomizados pesando 150 a 200 g, em ratos recém-nascidos de 4 a 5 dias de vida e em ratos pesando 40 a 50 g, cuja função adrenocorticotrófica foi bloqueada com a administração de desoxicorticosterona. Esses autores verificaram que a remoção da hipófise ou o seu bloqueio por meio do acetato de desoxicorticosterona, prevenia a resposta da adrenal frente aos efeitos da vitamina A sem, no entanto, abolir os efeitos tóxicos da vitamina no corpo dos animais. Puderam presumir, então, que os efeitos da vitamina A sobre a adrenal, naqueles casos de hipervitaminose A, seriam mediadas pela hipófise.

Os efeitos mais consistentes e característicos da hipervitaminose A na adrenal são a diminuição dos níveis de colesterol e do ácido ascórbico nesta glândula (AHUJA & MISRA, 1973; MATHUR & cols., 1973).

Esta diminuição pode ser prevenida quando se administra juntamente com a vitamina A, o ácido ascórbico (MISRA & SRIVASTAVA, 1974).

Em 1975, SILVA NETTO & cols. verificaram que após 30 a 60 dias de recuperação dos efeitos da hipervitaminose A, os

ratos já apresentavam concentração normal de ácido ascórbico na adrenal.

A ação direta da vitamina A sobre o testículo ficou demonstrada nos trabalhos de AHLUWALIA & BIERI (1970, 1971), e pode estar coadjuvada com a falta de gonadotrofinas hipofisárias (BISWAS, 1965, citado por BISWAS & MUKHERJI, 1968), além do que essa falta de gonadotrofinas poderia ser devida à maior liberação de ACTH (NOWELL & CHESTER-JONES, 1957) e à menor secreção de TSH (SADHU & TRUSCOTT, 1948).

BISWAS & DEB (1965) observaram que ratos hipervitaminóticos A apresentavam atrofia dos órgãos sexuais acessórios e aumento de colesterol, o que indica distúrbios na biossíntese da testosterona. LAMANO CARVALHO & cols. (1978) admitiram haver, possivelmente, diminuição da secreção de andrógenos naqueles ratos hipervitaminóticos A, já que os níveis de gonadotrofinas hipofisárias estavam alterados, provocando diminuição do volume relativo de tecido intersticial do testículo e dos núcleos das células de Leydig.

1.4 CONTROLE HORMONAL DA GLÂNDULA LACRIMAL

BAQUICHE (1959) e CAVALLERO (1960) mostraram no rato, que a glândula lacrimal extra-orbitária apresentava dimorfismo sexual. Após a castração, esta glândula mudava de estrutura geral, isto é, tendia a um tipo intermediário entre as estruturas das glândulas masculinas e femininas. Porém, após a administração de hormônios sexuais nos animais castrados dos dois sexos, a glândula lacrimal readquiria a estrutura original.

EBLING & cols. (1975), em estudos da glândula lacrimal de ratos castrados e castrados mais hipofisectomizados, todos tratados com testosterona, hormônio de crescimento de origem bovina ou com a associação testosterona mais hormônio de crescimento, mostraram que os pesos da glândula lacrimal não sofriam alteração após a castração e administração de testosterona nos animais castrados. Para os animais castrados e hipofisectomizados, o peso da glândula lacrimal apresentava-se consideravelmente reduzido, porém, após a administração de testosterona, o peso dessas glândulas adquiria novamente o peso relativo dos ratos castrados. Entretanto, o hormônio de crescimento nos animais castrados e hipofisectomizados provocava ligeiro aumento no peso da glândula lacrimal.

Como a manutenção da glândula lacrimal parece depender da presença da hipófise como mostram os achados de BROOKBANK & cols. (1973) é possível que a glândula seja órgão de secreção do feromônio (5α -16-androstenio- 3α -ol) cujas funções seriam controladas por um hormônio inespecífico da hipófise.

1.5 VITAMINA A E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Os primeiros trabalhos que descrevem malformações em ratos, devidas à hipervitaminose A, datam de 1953 e 1954, quando COHLAN verificou nas ninhadas de mães que receberam a vitamina em doses excessivas: exencefalia, hidrocefalia, meningocèle, espinha bífida, anormalidades oculares, fenda palatina e catarata.

Essas alterações também foram observadas por GIROUD &

MARTINET (1955, 1956), por GIROUD & cols. (1958). Estes autores também observaram: anencefalia, anoftalmia, microftalmia, malformações nas orelhas, micromelia, sindactilia, aplasia de pálpebra, exoftalmia e fissura mediana inferior. GIROUD & cols. (1958, 1959), descreveram ainda hidronefrose, abaulamento anormal do ureter e aplasia da bexiga. Em 1959, DEUSCHLE & cols. descreveram, no rato recém-nascido, cujas mães receberam doses excessivas de vitamina A (75.000 a 150.000 UI) , oralmente, malformações oculares, maxilares e dentais. Mais tarde KALTER e DEUSCHLE (1966) descreveram essas malformações dento-faciais mais detalhadamente, quando encontraram nos fetos de camundongos: microstomia, astomia, alterações na língua, nos dentes, nos maxilares, na articulação temporomandibular, no palato, nos olhos e no conduto auditivo.

Os experimentos empregando a hipervitaminose A com intuito de provocar malformações não se restringiram somente a ratos e camundongos. No coelho, GIROUD e MARTINET (1959) obtiveram 50% de abortos e grande porcentagem de malformações como: atrofia dos membros, redução no número de dedos, estreitamento transversal da face, mandíbula mais desenvolvida, hemorragias de cristalino, deslocamento da retina e fibrose do humor vítreo. No hamster, MARIN-PADILHA e FERM (1965) observaram: anencefalia, anopia, hipoplasia das órbitas, espinha bífida, defeitos nas costelas, lábio fissurado, defeitos nos membros e hérnias.

KNUDSEN (1965, 1966), estudando fetos de camundongos exencefálicos, observou fusão total ou parcial dos incisivos

superiores e inferiores e dos molares inferiores, agenesia de incisivos, anciloses, ausência da articulação temporomandibular, agenesia e desenvolvimento incompleto dos músculos da mastigação e do músculo temporal, além de desenvolvimento anormal da língua e das glândulas salivares. Em 1967, esse autor executou um trabalho comparativo dessas malformações no camundongo e no rato, verificando que a fusão dos incisivos não era observada nos ratos.

Os efeitos teratogênicos da vitamina A dependem do período de gestação, no qual é administrada, e da dosagem. A influência da vitamina A no período de gestação está bem estabelecida; ela induz morte nos primeiros dias e teratogenia no período compreendido entre o 8º e 13º dia de gestação do animal; período este que GIROUD (1963) denominou de crítico, ou teratogênico. A dosagem também é importante e pode variar de 50.000 UI até as 150.000 UI, muito embora GIROUD (1968) a firme que mesmo dosagens baixas, como 1.000 UI ainda são teratogênicas e não importaria o quanto de vitamina A se administra, pois a sua concentração no feto malformado é sempre duas vezes maior do que aquela encontrada nos fetos normais.

GIROUD (1968) observou ainda que a ação não é a mesma nas diferentes espécies animais: ratos e camundongos parecem ser mais sensíveis que cobaias e coelhos.

Quando da administração de doses consideradas não teratogênicas de vitamina A em ratas grávidas durante períodos críticos de desenvolvimento intra-uterino, alterações como exoftalmia, baixo peso, boca pequena e muitas vezes ausente, foram observadas por COSTA & DIAS COSTA (1984).

DIAS COSTA (1985), estudando o miocárdio ventricular de ratos cujas mães receberam doses não teratogênicas de vitamina A no 10º dia de gestação, observou uma atrofia das fibras musculares, juntamente com uma fibrose do tecido intersticial. Esses achados demonstraram que a vitamina A quando administrada, mesmo em doses pequenas durante períodos críticos do desenvolvimento embrionário, lesa profundamente o coração de ratos e, essas lesões provavelmente se estendem a outros órgãos.

RODRIGUES & COSTA (1987), empregando a mesma técnica utilizada por DIAS COSTA (1985), estudaram a glândula adrenal de ratos. Um fato curioso observado por esses autores foi o de que esta glândula, nos animais cujas mães foram injetadas com vitamina A, apresentou inicialmente uma hipertrofia, seguida por atrofia, contrariando todos os achados relativos à esta glândula frente à vitamina A.

1.6 PROPOSIÇÃO

Considerando a importância das primeiras semanas de vida, para o rato, no desenvolvimento pós-natal e sabendo-se que nestas primeiras semanas ocorrem fatos importantes como a fase final do desenvolvimento de alguns órgãos como olho, cérebro, glândulas lacrimais extra-orbitárias, adrenal, etc, achou-se oportuna a realização de um estudo nas glândulas lacrimais extra-orbitárias de ratos recém-nascidos e em lactação, cujas mães receberam uma única dose de vitamina A, não teratogênica no décimo dia de gestação, pois a literatura pertinente ao assunto é restrita, estando assim, plenamente justificada

do o interesse na execução do presente trabalho, o qual foi planejado com os seguintes objetivos:

- Verificar as possíveis alterações ponderais presentes na glândula lacrimal extra orbitária de ratos recém-nascidos e em lactação, provocadas por uma única dose de vitamina A na vida intra-uterina.
- Com o emprego de técnicas morfométricas adequadas, quantificar as alterações estruturais presentes.
- Mostrar se uma pequena dose de vitamina A, quando administrada no período crítico do desenvolvimento de ratos, é capaz de lesar as glândulas lacrimais extra-orbitárias dos mesmos, durante um período de vida dos animais.

2 . MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Foram utilizados 120 ratos (*Rattus norvegicus*, variedade Wistar), obtidos do Biotério da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, de ratas cujo peso estava entre 160 a 200 g.

Esses animais representam os filhotes machos em lactação, sacrificados em diferentes idades e divididos em 2 grupos:

Grupo I - Tratados : 60 ratos obtidos de ratas que receberam uma única injeção intraperitoneal de 0,26 ml, de Arovit (Palmitato de Vitamina A em solução coloidal hidromiscível - produtos Roche) contendo 30.000 UI de vitamina A no décimo dia de gestação.

Grupo II - Controle : 60 ratos obtidos de ratas que receberam uma única injeção intraperitoneal de 0,26 ml. de solução salina (solução de cloreto de sódio a 0,85%) no décimo dia de gestação.

As ratas de ambos os grupos receberam ração comercial e água ad libitum, e para cada uma delas após o nascimento, foi mantida uma ninhada de 8 filhotes.

2.2 TÉCNICA DE DETERMINAÇÃO DO PERÍODO DE GRAVIDEZ

As ratas virgens foram colocadas nas gaiolas dos ma -

chos (duas para cada macho) e todas as manhãs e tardes, procedia-se a uma lavagem vaginal com soro fisiológico, seguido de aspiração e feitos os esfregaços vaginais com este material. Sem deixar o material secar, as lâminas foram observadas ao microscópio óptico com a finalidade de se verificar a presença de espermatozóide. Quando tal fato ocorria, considerava-se este como o primeiro dia de gravidez.

2.3 TÉCNICA DE DISSECAÇÃO E PESAGEM

Os filhotes de ambos os grupos estudados foram pesados e sacrificados aos 1,5, 10, 15, 20 e 25 dias de vida pós-natal, 10 para cada grupo, por inalação com éter etílico.

As glândulas lacrimais extra orbitárias direitas dos animais foram retiradas e colocadas numa solução de Bouin (Formaldeído - 15 ml, ácido pícrico - 85 ml, ácido acético glacial 5 ml) para fixação, e 24 horas após, imersas em álcool etílico 70° Gay Lussac.

As glândulas lacrimais extra orbitárias foram pesadas em balança de precisão (Micronal 0,001 mg).

2.4 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

Após a pesagem, as glândulas lacrimais extra orbitárias foram desidratadas em álcool numa série crescente de graduações, diafanizadas em Benzol e incluídas em parafina. Os blocos foram cortados com 7 micrômetros de espessura e os cortes corados pela Hematoxilina-Eosina (HE) para observação ao microscópio de luz.

2.5 TÉCNICAS MORFOMÉTRICAS

2.5.1 Técnica de CHALKLEY

Com a finalidade de avaliar percentualmente as estruturas das glândulas lacrimais extra orbitárias, empregou-se neste estudo a técnica de CHALKLEY (1943). Utilizou-se, para tal, uma ocular preparada com 4 pontos padrão e uma objetiva de imersão (100X). Cada ponto correspondia à extremidade livre de uma seta e as estruturas histológicas escolhidas (citoplasma, núcleo, interstício e luz) das glândulas lacrimais extra orbitárias, foram registradas individualmente. Foram determinadas quantas vezes as estruturas eram atingidas pelos pontos padrão e contados 1000 pontos para cada glândula de cada animal. Os valores numéricos obtidos das estruturas glandulares dos animais controle e tratados foram transformados em valores percentuais. Esta percentagem de pontos por estrutura indica o volume relativo para cada estrutura. Para comparação desses volumes relativos nos diversos grupos, os dados percentuais sofreram uma transformação angular.

2.5.2 CARIOMETRIA

Os volumes reais dos núcleos das células das glândulas lacrimais extra orbitárias dos diversos grupos experimentais foram obtidos através de medidas cariométricas.

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

Os núcleos das células glandulares foram projetados so

bre papel, com aumento final de 1.140X. As imagens obtidas, em número de 100 para cada animal dos grupos estudados, foram contornadas com lápis número 2, tomando-se o cuidado de considerar somente as imagens elípticas ou arredondadas dos núcleos. Para obtenção dos volumes, os eixos de maior e menor diâmetro foram medidos através de papel milimetrado, transparente, obtendo-se ainda, por meio da média geométrica dos 2 primeiros, um terceiro eixo. Em seguida, foi aplicada a fórmula do volume do elipsóide de acordo com VALERI & cols. (1967):

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

onde D_1 e D_2 representam os eixos maior e menor, respectivamente. Nesta fórmula utilizada, para um aumento de 2.000X a constante 6 é igual a 0,06545; para um aumento de 1.140X, a constante foi modificada através de um fator de correção igual a 0,35341426, calculado matematicamente.

2.5.2.1 Cálculo da Constante para a equação do volume elipsóide, quando a ampliação é de 1.140X.

A equação matemática do volume elipsóide é:

$$V = \frac{4}{3} \pi \cdot a \cdot b \cdot c$$

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

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

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

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

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

D indica o comprimento real dos eixos em micrômetros. Como o valor medido na projeção é feito em milímetros, o valor D valerá 1.000X menos que este valor em milímetros. Por sua vez o valor 1.000 D está ampliado 1.140X, razão porque é preciso dividi-lo por 1.140X para ter-se o valor real do eixo. Assim temos:

$$V = \frac{\pi}{6} \cdot \frac{1.000D_1}{1.140} \cdot \frac{1.000D_2}{1.140} \cdot \sqrt{\frac{1.000D_1 \cdot 1.000D_2}{1.140}}$$

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

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

2.6 TÉCNICAS ESTATÍSTICAS

Para o estudo dos volumes relativos após transformação angular das estruturas estudadas com o emprego da técnica de CHALKLEY (1943), (citoplasma, núcleo, interstício e luz) entre grupos controles e tratados, empregou-se a análise de variância.

Com o objetivo de comparar-se os dados obtidos com o

emprego da cariometria, empregou-se o teste não paramétrico da mediana (SIEGEL, 1956).

2.6.1 Teste da Mediana (SIEGEL, 1956)

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

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

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

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

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

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

ma mediana.

A variável χ^2 é calculada pela fórmula:

$$\chi^2 = \frac{N \left(\left| A.D. - B.C. \right| - \frac{N}{2} \right)^2}{(A+B) \cdot (C+D) \cdot (A+C) \cdot (B+D)}$$

Estabelecendo α , que neste trabalho foi tomado a um nível de 95% ($\alpha = 0,05$), e com 1 grau de liberdade, obtém-se o valor de χ^2 tabelado.

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

3 . RESULTADOS

3.1 RESULTADOS MORFOLÓGICOS

3.1.1 PESO CORPORAL E GLANDULAR

A dosagem de vitamina A utilizada neste trabalho e a maneira pela qual foi administrada, não provocou malformações visíveis nos animais considerados tratados. Pôde-se observar que estes animais apresentaram um comportamento normal no que se refere à postura, movimentos corporais, apetite, sociabilidade e desenvolvimento durante todo o período experimental.

O peso corporal dos animais recém nascidos (Tabela 1), cujas mães receberam uma dose "não teratogênica" (30.000 UI) de vitamina A no 10º dia de gestação, apresentou-se semelhante aos dos animais controle ($5,35g \pm 0,23$ e $5,81 \pm 0,32$), respectivamente. Neste grupo de animais, o peso glandular (Tabela 2) entretanto, apresentou uma diferença marcante de valores quando se compararam os valores absolutos dos 2 grupos. Para os animais controle, observou-se um peso glandular médio igual a $0,74mg (\pm 0,25)$, enquanto as glândulas lacrimais extra orbitárias dos animais tratados mostraram um peso de $0,21mg (\pm 0,13)$.

A Tabela 3 mostra que os pesos corporais dos animais controle ($11,47g \pm 1,12$), que foram sacrificados com 5 dias de vida, apresentaram-se maiores do que os dos animais tratados ($9,75g \pm 1,25$), o mesmo acontecendo com relação aos pesos gland

Tabela 1 - Pesos corporais, médias e erro padrão das médias dos animais controle e tratados, sacrificados no 1º dia de vida.

PESO CORPORAL (g) CONTROLE	PESO CORPORAL (g) TRATADO
5,0	6,2
5,6	5,7
5,3	6,1
5,6	6,1
5,6	6,0
5,5	5,4
5,0	6,0
5,4	5,5
5,2	5,8
5,3	5,3
\bar{X}	\bar{X}
5,35	5,81
(\pm 0,23)	(\pm 0,32)

dulares dos animais deste grupo (Tabela 4) ($1,19\text{mg} \pm 0,52$ para os controles e $1,04\text{mg} \pm 0,29$ para os tratados).

Já o peso corporal dos animais sacrificados com 10 dias de vida (Tabela 5) apresentou-se com ligeira semelhança nos animais controle ($22,74\text{ g} \pm 1,59$) em relação aos tratados ($23,17\text{ g} \pm 1,82$). O mesmo fato também ocorreu quando comparamos os pe-

Tabela 2 - Pesos, médias e erro padrão das médias das glândulas lacrimais dos animais controle e tratados, sacrificados no 1º dia de vida.

PESO GLANDULAR (mg) CONTROLE	PESO GLANDULAR (mg) TRATADO
0,4	0,1
0,4	0,1
0,4	0,1
0,7	0,2
1,0	0,2
0,9	0,2
0,9	0,5
0,9	0,3
0,9	0,3
0,9	0,1
\bar{X}	\bar{X}
0,74	0,21
($\pm 0,25$)	($\pm 0,13$)

pesos glandulares desses animais, quando foi observado que as glândulas lacrimais extra orbitárias dos controles mostraram um peso igual a 3,86mg ($\pm 0,88$), e os tratados 3,75mg ($\pm 1,21$) (Tabela 6).

A Tabela 7 mostra a média dos pesos corporais dos animais tratados e controles, sacrificados com 15 dias de vida pós

Tabela 3 - Pesos corporais, médias e erro padrão das médias dos animais controle e tratados, sacrificados no 5º dia de vida.

PESO CORPORAL (g) CONTROLE	PESO CORPORAL (g) TRATADO
9,5	7,2
11,2	10,9
9,8	9,0
10,9	11,2
11,5	10,3
12,0	10,2
12,4	9,2
12,3	8,5
12,3	10,7
12,8	10,3
\bar{X}	\bar{X}
11,47	9,75
($\pm 1,12$)	($\pm 1,25$)

natal. Pela análise desta tabela, observou-se que o grupo controle apresentou um peso corporal maior ($32,16g \pm 2,04$), quando comparado ao tratado ($25,79g \pm 1,48$). Observação idêntica foi feita com relação ao peso glandular desses animais, pois nos controles este foi de $7,07mg (\pm 0,69)$, enquanto nos tratados foi de $5,86mg (\pm 1,00)$, ou seja, os animais tratados apresentaram um peso glandular menor que os dos controles. (Tabela 8)

Tabela 4 - Pesos, médias e erro padrão das médias das glândulas lacrimais dos animais controle e tratados, sacrificados no 5º dia de vida.

PESO GLANDULAR (mg) CONTROLE	PESO GLANDULAR (mg) TRATADO
0,8	0,7
0,8	1,1
0,8	0,8
0,7	1,0
0,8	0,7
1,1	1,7
2,0	1,1
1,4	1,1
1,4	1,1
2,1	1,1
\bar{X}	\bar{X}
1,19	1,04
(\pm 0,52)	(\pm 0,29)

Com relação ao grupo de animais sacrificados no 20º dia de vida, o peso corporal desses ratos (Tabela 9) mostrou-se bem diferente. Assim é que para os controles, o peso foi igual a 35,42g (\pm 4,50), enquanto para os tratados este apresentou-se maior (40,54g \pm 2,98).

Tabela 5 - Pesos corporais, médias e erro padrão das médias dos animais controle e tratados, sacrificados no 10º dia de vida.

PESO CORPORAL (g) CONTROLE	PESO CORPORAL (g) TRATADO
24,6	23,2
24,2	25,1
24,3	23,0
23,0	25,6
23,3	21,6
23,7	23,0
22,0	22,0
21,5	24,2
20,8	24,5
20,0	19,5
\bar{X}	\bar{X}
22,74	23,17
($\pm 1,59$)	($\pm 1,82$)

Quando analisou-se a Tabela 10, onde estão expressos os pesos glandulares desses mesmos animais, o mesmo fato não ocorreu, pois as glândulas controle mostraram-se mais pesadas quando comparadas aos tratados (12,50mg \pm 3,05 e 11,65mg \pm 1,57 , respectivamente).

Finalmente a análise da tabela 11 mostrou um resultado semelhante com relação aos pesos corporais ao grupo anterior ,

Tabela 6 - Pesos, médias e erro padrão das médias das glândulas lacrimais dos animais controle e tratados, sacrificados no 10º dia de vida.

PESO GLANDULAR (mg)	PESO GLANDULAR (mg)
CONTROLE	TRATADO
3,8	4,6
5,1	5,2
3,6	5,2
5,4	3,9
3,9	4,2
4,3	3,6
2,8	3,8
3,8	2,8
3,1	1,3
2,8	2,7
\bar{X}	\bar{X}
3,86	3,73
(\pm 0,88)	(\pm 1,21)

ou seja, os animais controle sacrificados no 25º dia de vida apresentaram um peso corporal menor (55,83g \pm 4,38) do que o dos tratados (58,11g \pm 4,95). Com relação aos pesos glandulares desses animais, observou-se uma ligeira semelhança: 20,99mg (\pm 3,41) nos controles e 20,77mg (\pm 2,74) nos tratados (Tabela 12). A figura 1 mostra o comportamento do peso das glândulas lacrimais extra orbitárias dos ratos controle e tratados, quando se levam

Tabela 7 - Pesos corporais, médias e erro padrão das médias dos animais controle e tratados, sacrificados no 15º dia de vida.

PESO CORPORAL (g)		PESO CORPORAL (g)	
CONTROLE		TRATADO	
29,5		25,6	
35,0		24,9	
29,5		27,0	
29,4		25,1	
32,5		25,4	
32,6		26,4	
32,4		28,9	
34,5		25,1	
32,8		23,3	
33,4		26,2	
\bar{X}		\bar{X}	
32,16		25,79	
($\pm 2,04$)		($\pm 1,48$)	

em conta os dias de sacrifício. Pela análise dessa figura, notamos que em todos os períodos estudados, as glândulas dos animais controles foram maiores do que as dos animais tratados.

Tabela 8 - Pesos, médias e erro padrão das médias das glândulas lacrimais dos animais controle e tratados, sacrificados no 15º dia de vida.

PESO GLANDULAR (mg)		PESO GLANDULAR (mg)	
CONTROLE		TRATADO	
7,5	—	5,7	
7,6		3,9	
6,8		6,5	
6,2		5,5	
6,2		5,8	
7,8		5,8	
7,1		7,9	
7,7		5,0	
7,7		5,6	
6,1		6,9	
\bar{X}		\bar{X}	
7,07		5,86	
(± 0,69)		(± 1,08)	

Tabela 9 - Pesos corporais, médias e erro padrão das médias dos animais controle e tratados, sacrificados no 20º dia de vida.

PESO CORPORAL (g) CONTROLE	PESO CORPORAL (g) TRATADO
40,7	40,5
40,8	42,6
36,5	42,7
37,8	44,0
39,3	39,1
36,6	37,3
30,3	38,6
32,1	35,8
28,1	45,0
32,0	39,8
\bar{X}	\bar{X}
35,42	40,54
(\pm 4,50)	(\pm 2,98)

Tabela 10 - Pesos, médias e erro padrão das médias das glândulas lacrimais dos animais controle e tratados, sacrificados no 20º dia de vida.

PESO GLANDULAR (mg) CONTROLE	PESO GLANDULAR (mg) TRATADO
13,4	13,9
16,6	11,5
16,1	13,0
13,5	9,9
12,6	9,9
13,0	13,4
7,8	12,6
13,1	10,5
7,1	10,5
11,8	11,3
\bar{X}	\bar{X}
12,50	11,65
($\pm 3,05$)	($\pm 1,57$)

Tabela 11 - Pesos, médias e erro padrão das médias dos animais controle e tratados, sacrificados no 25º dia de vida.

PESO CORPORAL (g) CONTROLE	PESO CORPORAL (g) TRATADO
58,0	54,5
55,5	58,1
49,2	60,8
55,8	63,2
53,3	63,9
53,0	48,5
56,6	57,7
61,5	59,4
63,6	52,7
51,8	62,3
\bar{X}	\bar{X}
55,83	58,11
($\pm 4,39$)	($\pm 4,95$)

Tabela 12 - Pesos, médias e erro padrão das médias das glândulas lacrimais dos animais controle e tratados, sacrificados no 25º dia de vida.

PESO GLANDULAR (mg) CONTROLE	PESO GLANDULAR (mg) TRATADO
20,6	18,7
18,1	18,0
16,0	23,4
21,0	20,2
23,0	21,1
21,0	17,9
23,0	20,4
24,6	19,9
26,3	21,1
16,3	27,0
\bar{X}	\bar{X}
20,99	20,77
(\pm 3,41)	(\pm 2,74)

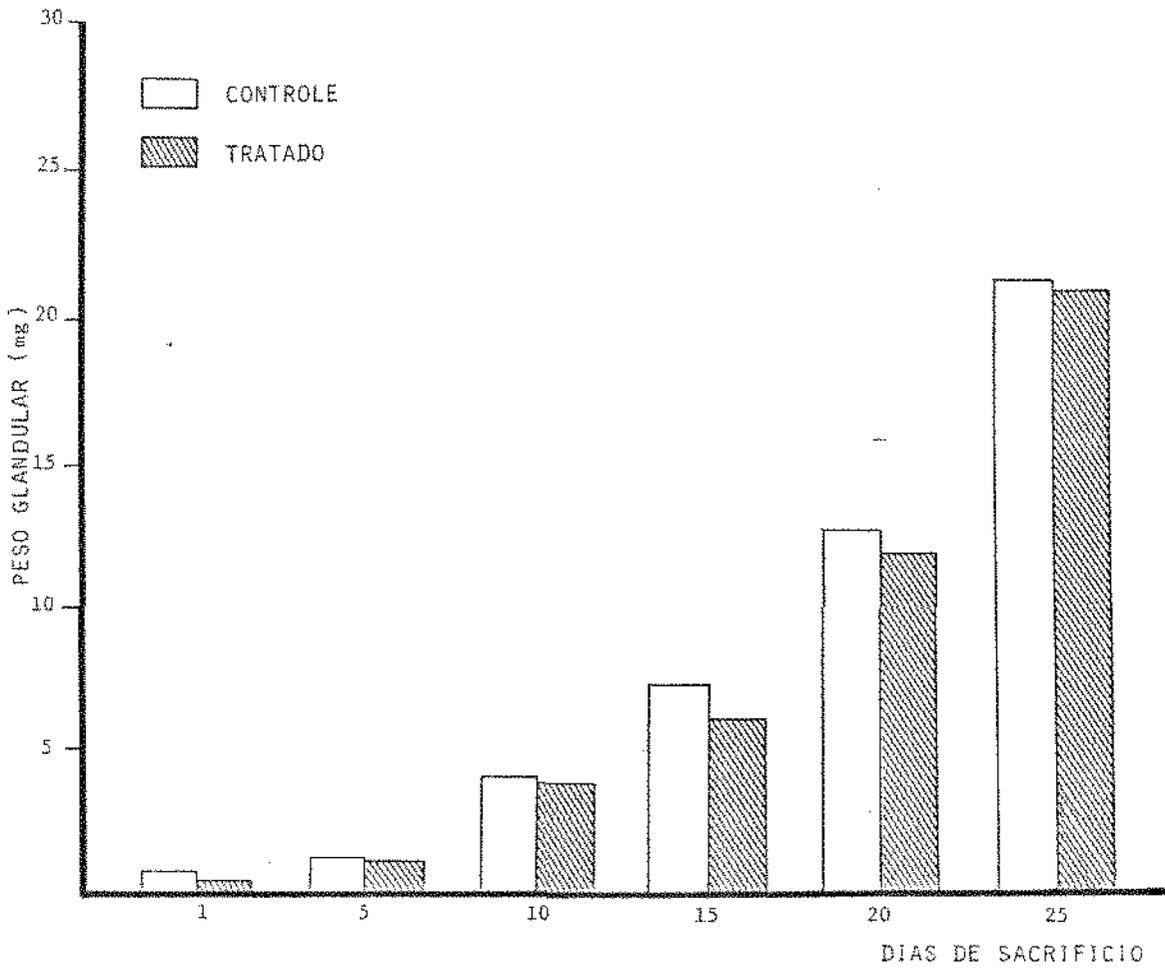


Figura 1 - Representação gráfica dos pesos glandulares dos ratos controle e tratados, em função dos dias de sa-
crifício.

3.2 RESULTADOS HISTOLÓGICOS

A glândula lacrimal extra orbitária dos ratos controle é do tipo túbulo acinosa, composta com um produto de secreção do tipo seroso. Apresentou-se envolvida por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, a qual emitia septos para o interior do órgão, dividindo-a em lóbulos. Nos primeiros dias de vida, estes septos apresentaram-se bastante espessos e, à medida que o animal foi se desenvolvendo, os septos foram afinando em conseqüência óbvia do desenvolvimento estrutural dos ácinos e dos ductos excretores (Figura 1A). No início do experimento, os ácinos não se encontravam bem delineados, mostrando-se sem uma organização definida, com células de citoplasma baixo, ainda sem apresentar características de células secretoras, como foi bem mostrado pela afinidade tintorial. A observação dos núcleos confirmou estes achados, pois mostraram-se muito grandes em relação ao citoplasma. Fato idêntico ao que ocorreu com o citoplasma foi observado quando se examinou a luz acinar, pois estas mostraram-se pouco visíveis e sem nenhuma secreção no seu interior. Somente nos animais sacrificados após o décimo dia de vida (Figura 1E) é que se notou na glândula uma arquitetura bem delineada. A partir desta idade, puderam-se observar ácinos pequenos, semelhantes aos da glândula parótida, porém com células mais prismáticas e contornos mais definidos, apresentando, no citoplasma, uma quantidade variável de grânulos de secreção. Os núcleos ovalados ou arredondados dispostos principalmente na porção mediana da célula, apresentaram-se com cromatina esparsa (Figuras 2A e 2C). Nos animais com 25 dias de

vida, a glândula assemelhou-se, em todos os aspectos, às glândulas de animais adultos, sendo evidenciados, nesta idade, núcleos poliplóides (Figura 2E). As figuras de mitose mostraram-se numerosas. Nas glândulas lacrimais dos animais cujas mães foram injetadas com uma única dose de vitamina A no décimo dia de gestação, os achados histológicos foram bastante interessantes, pois as glândulas apresentaram um desenvolvimento de arquitetura mais precoce (Figuras 1B e 1D), bem como períodos de alterações estruturais, intercalados com períodos onde os componentes teciduais se aproximavam do aspecto normal. Assim é que nos animais recém-nascidos, conseguiram-se visualizar já alguns ácinos delimitados (Figura 1B). Após os 5 dias de vida (Figuras 1D e 1F), um aspecto de arquitetura definido foi notado na glândula. Os ácinos desses animais tratados apresentaram-se, no início do experimento, com uma área acinar bastante semelhante aos controles, diminuindo no final, com menor altura celular e núcleos também ligeiramente menores. O mesmo fato foi observado com relação à espessura dos septos fibrosos e da área da luz acinar. Diferentemente dos controles, não foi observada, em nenhuma fase do experimento, a presença de núcleos poliplóides (Figuras 2D e 2F). A presença de figuras de mitose nestes animais mostrou-se diminuída em todos os períodos experimentais.

Figura 2.

- A) Aspecto histológico da glândula lacrimal do rato controle, sacrificado no 1º dia de vida. Observa-se uma proliferação epitelial sem contudo produzir ácinos definidos. HE. 180x.
- B) Aspecto histológico da glândula lacrimal extra orbitária do rato tratado, sacrificado no 1º dia de vida. Observam-se poucos ácinos com alguma individualidade. HE 180 x.
- C e D) Aspectos histológicos da glândula lacrimal extra orbitária dos ratos controle e tratados, respectivamente, sacrificados no 5º dia de vida. HE. 550 x.
- E) Aspecto histológico da glândula lacrimal extra orbitária do rato controle, sacrificado no 10º dia de vida. HE 180 x.
- F) Aspecto histológico da glândula lacrimal extra orbitária do rato tratado, sacrificado no 10º dia de vida. HE 180x.

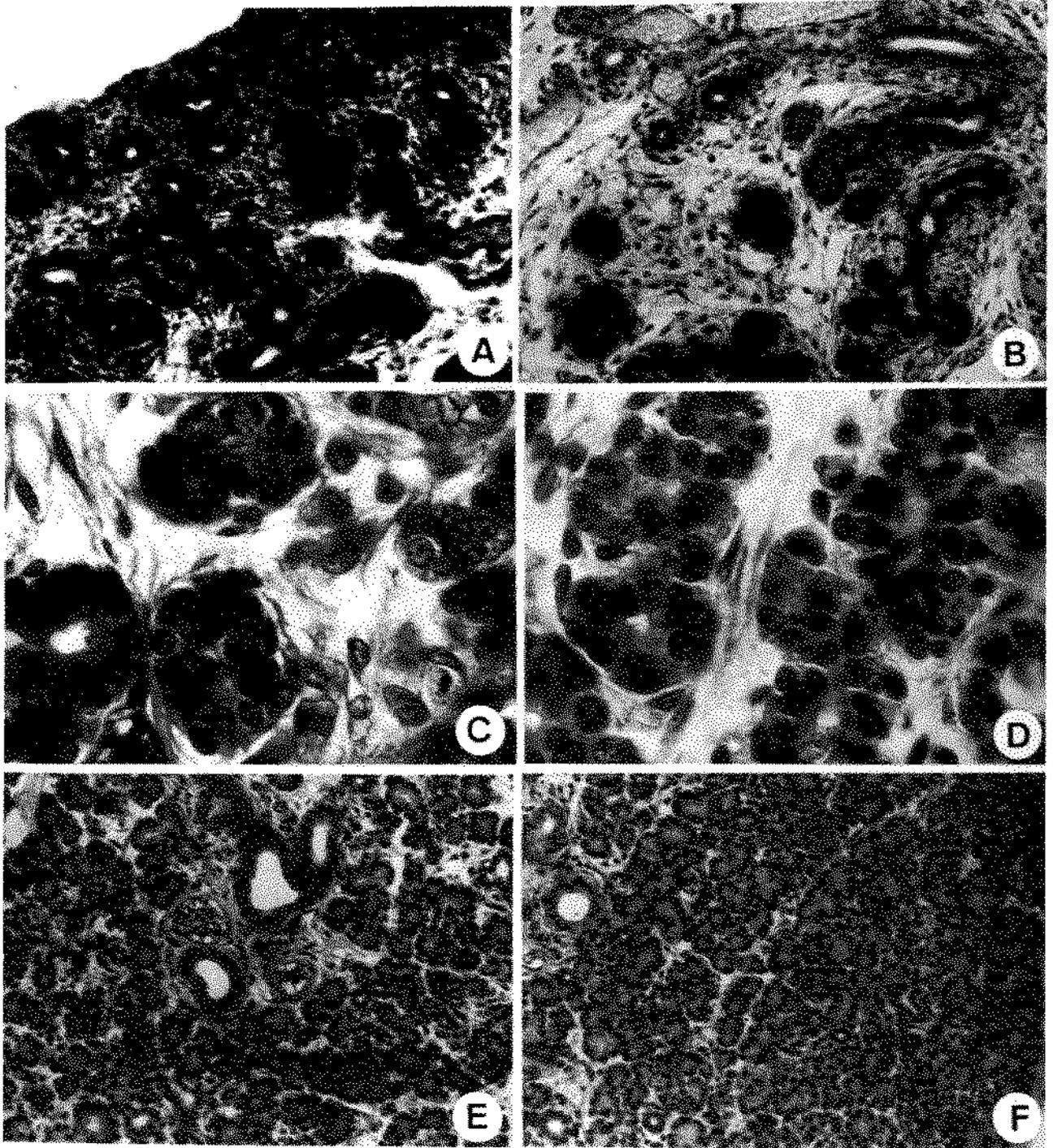
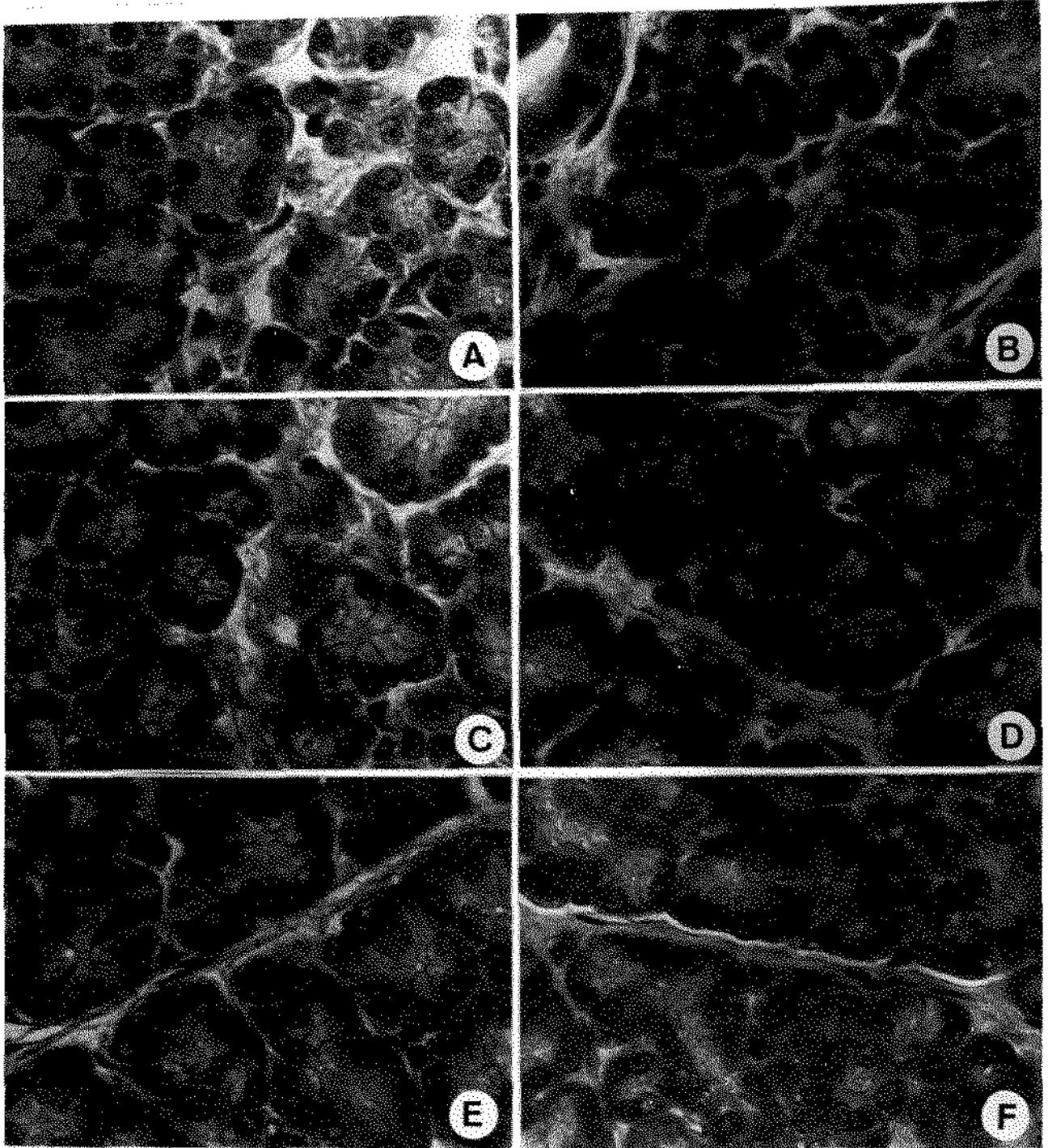


Figura 3.

- A) Aspecto histológico da glândula lacrimal extra orbitária do rato controle, sacrificado no 15º dia de vida. HE 550 x.
- B) Aspecto histológico da glândula lacrimal extra orbitária do rato tratado, sacrificado no 15º dia de vida. HE 550 x.
- C e D) Aspecto histológico da glândula lacrimal extra orbitária dos ratos controle e tratados, respectivamente, sacrificados no 20º dia de vida. HE 550 x.
- E) Aspecto histológico da glândula lacrimal extra orbitária do rato controle, sacrificado no 25º dia de vida. Observa-se a presença de núcleos poliplóides. HE 550 x.
- F) Aspecto histológico da glândula lacrimal extra orbitária do rato tratado, sacrificado no 25º dia de vida. Observam-se núcleos das células glandulares, pequenos, sem poliploidia . HE 550 x.



3.3 RESULTADOS MORFOMÉTRICOS

3.3.1 TÉCNICA DE CHALKLEY

Na Tabela 13 estão expressos os valores percentuais e as médias das estruturas escolhidas, isto é, citoplasma, núcleo, tecido intersticial (tecido conjuntivo intersticial e outras estruturas presentes como vasos e espaços) e luz acinar das glândulas lacrimais extra orbitárias dos animais controles e tratados (ratos cujas mães foram injetadas com 30.000 UI no 10º dia de gestação), sacrificados no 1º dia de vida. Estes valores estão representados graficamente na Figura 4. Analisando-se esta tabela, verificou-se que, para o citoplasma das células acinares, foram obtidos os valores percentuais médios iguais a 14,43 (\pm 4,13) para os controles e 16,60 (\pm 3,94) para os tratados. Quando da análise de variância após transformação angular (Tabela 14) não se verificou diferença estatisticamente significativa entre os valores dos animais controles e tratados.

Observando-se os valores percentuais médios para os núcleos, verificou-se para os controles, um valor percentual médio de 52,34 (\pm 3,91) e 45,24 (\pm 2,75) para os tratados. Esta diferença entre os 2 grupos foi comprovada pela análise de variância. (Tabela 19).

Para o tecido intersticial a diferença dos valores mé-

dios obtidos para os animais controle ($31,50 \pm 6,85$) e tratados ($37,24 \pm 3,95$) apresentou diferença estatisticamente significativa após análise de variância.

Com relação à luz acinar, os valores para os controles ($0,73 \pm 0,24$) foram semelhantes aos dos tratados ($0,92 \pm 0,23$). Tal fato foi comprovado pelo emprego da análise de variância.

A vitamina A provocou uma diminuição relativa do núcleo e um aumento do tecido intersticial nos animais tratados, quando comparados aos animais controle.

Na Tabela 14, acham-se expressos os valores percentuais e as médias das estruturas estudadas da glândula lacrimal extra orbitária dos animais controle e tratados, sacrificados com 5 dias de vida, obtidos com o emprego da Técnica de CHALKLEY (1943). Na Figura 5 estão representados, graficamente, estes valores.

Após a análise desta tabela, verificou-se que os valores para o citoplasma continuaram semelhantes ($18,18 \pm 2,97$ para os controles e $18,90 \pm 2,12$ para os tratados), como também os do núcleo ($45,82 \pm 4,01$ para os controles e $46,77 \pm 3,37$ para os tratados). O mesmo fenômeno foi observado também para o tecido intersticial, ou seja, os valores percentuais médios para os controles foram de $33,26 (\pm 4,04)$ e de $32,38 (\pm 3,02)$ para os tratados. A análise de variância (Tabela 20) comprovou estes fatos. Nestes animais, observou-se ainda com relação à luz acinar, uma pequena diferença entre os valores, ou seja, maiores ($2,74 \pm 0,62$) nos controles em relação aos tratados ($1,95 \pm 0,89$). A análise de variância mostrou uma diferença estatisticamente significativa a nível de 5%.

A vitamina A provocou uma diminuição da luz acinar entre grupos de animais tratados, quando comparados aos animais controle.

Os valores percentuais e as médias das estruturas escolhidas, citoplasma, núcleo, tecido intersticial e luz acinar das glândulas dos animais controle e tratados, sacrificados com 10 dias de vida, estão expressos na Tabela 15 e, graficamente, na Figura 6. Analisando-se esta tabela, verificou-se que os animais tratados apresentaram valores percentuais semelhantes aos dos controles, com relação ao citoplasma ($25,22 \pm 2,82$ e $25,03 \pm 3,79$, respectivamente). Tal fato foi comprovado quando da aplicação da análise de variância (Tabela 22). Com relação aos valores percentuais para o núcleo, interstício e luz acinar, a análise de variância (Tabela 22) mostrou diferenças estatisticamente significantes. Assim é que, para o interstício e luz, os valores percentuais dos controles ($20,07 \pm 3,52$ e $2,84 \pm 0,76$, respectivamente) foram maiores que os dos tratados ($16,45 \pm 2,34$ e $2,09 \pm 0,62$, respectivamente). Para o núcleo o inverso ocorreu, ou seja, os valores dos controles ($51,87 \pm 1,44$) foram menores do que os dos tratados ($56,43 \pm 3,71$). A vitamina A provocou nestes animais um aumento do núcleo e uma diminuição do tecido intersticial e da luz acinar, quando comparados aos animais controle.

Na Tabela 16 acham-se expressos os valores percentuais e as médias das estruturas estudadas da glândula lacrimal extra orbitária dos animais controle e tratados, sacrificados com 15 dias de vida. A projeção gráfica destes valores está repre-

sentada na Figura 7. Da análise desta tabela e da aplicação da análise de variância (Tabela 21), verificou-se não haver diferenças entre os valores de nenhuma estrutura estudada nos controles e tratados. Para o citoplasma, núcleo, interstício e luz dos controles, os valores foram de 31,60 (\pm 3,53), 51,18 (\pm 2,55), 15,97 (\pm 5,11) e 1,16 (\pm 0,57), respectivamente, e os valores dos tratados foram de 31,92 (\pm 3,36), 51,24 (\pm 3,31), 15,40 (\pm 2,14) e 1,44 (\pm 0,57), respectivamente.

Quando se analisou a Tabela 17, na qual estão expressos os valores percentuais e as médias das estruturas escolhidas das glândulas dos animais controle e tratados, sacrificados no 20º dia de vida, obtidos com emprego da Técnica de CHALKLEY (1943), verificou-se para o citoplasma dos animais controle, um valor médio igual a 39,55 (\pm 4,63), enquanto os tratados apresentaram-se com valores iguais a 33,76 (\pm 3,48). A análise de variância (Tabela 23) demonstrou uma diferença estatisticamente significativa entre os valores destes grupos.

Com relação à luz acinar, também foram observadas diferenças entre os valores destes 2 grupos, ou seja, 1,12 (\pm 0,40) para os controles e 1,87 (\pm 0,41) para os tratados. Estas diferenças foram comprovadas estatisticamente pela análise de variância (Tabela 23).

Os valores percentuais médios dos núcleos das células secretoras e do tecido intersticial apresentaram-se semelhantes entre os 2 grupos estudados, ou seja, 41,86 (\pm 3,48) para os controles e 45,76 (\pm 4,00) para os tratados e 17,47 (\pm 4,68) para os controles e 18,61 (\pm 3,42) para os tratados, respecti-

vamente. Este fato foi comprovado com a utilização da análise de variância (Tabela 23). A representação gráfica dos valores percentuais destas estruturas está representada na Figura 8. Nestes grupos de animais, a vitamina A provocou uma diminuição do citoplasma das células acinares e um aumento da luz acinar das glândulas dos animais tratados, com relação aos controles.

Os valores percentuais e as médias das estruturas estudadas das glândulas lacrimais extra orbitárias dos animais controle e tratados, sacrificados no 25º dia de vida, obtidos com emprego da Técnica de CHALKLEY (1943) estão expressos na Tabela 18. Graficamente, os valores das médias das estruturas estão expressos na Figura 9.

Pela análise desta figura, foi possível verificar uma semelhança nos valores percentuais dos animais controle e tratados, em todas as estruturas estudadas, ou seja, 55,24 (+ 5,87) e 52,52 (+ 3,25) (Citoplasma); 28,97 (+ 7,87) e 33,07 (+ 4,68) (Núcleo); 14,67 (+ 4,86) e 13,04 (+ 4,97) (Interstício); 1,39 (+ 0,44) e 1,37 (+ 0,49) (Luz).

Estes fatos foram comprovados com o emprego da análise de variância (Tabela 24), evidenciando-se que, nesta época da vida dos animais em experimento, a vitamina A parece ter deixado de provocar alterações significativas nas estruturas estudadas, quando comparados animais controles com animais tratados.

Tabela 13 - Valores percentuais, médias destes valores e erro padrão das médias de citoplasma, núcleo, interstício e luz da glândula lacrimal dos ratos controle e tratados, sacrificados no 1º dia de vida.

CITOPLASMA		NÚCLEO		INTERSTÍCIO		LUZ	
C	T	C	T	C	T	C	T
23,9	16,4	54,2	49,3	20,7	33,0	1,2	1,3
12,1	14,0	66,6	49,3	20,5	36,1	0,8	0,6
13,5	22,1	55,8	45,2	30,1	31,7	0,6	1,0
10,3	12,5	50,5	45,0	38,6	41,2	0,6	1,3
13,1	23,4	45,5	43,7	40,8	32,2	0,6	0,7
12,9	16,6	51,2	44,9	35,1	37,6	0,9	0,9
19,2	18,6	51,7	43,7	29,2	36,9	0,9	0,8
13,8	16,9	54,8	40,1	30,7	42,1	0,7	0,9
16,4	14,5	46,8	44,3	36,5	40,3	0,3	0,9
10,2	11,0	56,3	46,9	32,8	41,3	0,7	0,8
\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
14,43	16,60	52,34	45,24	31,50	37,24	0,75	0,92
(+ 4,13)	(+3,94)	(+3,91)	(+2,75)	(+6,85)	(+3,95)	(+0,24)	(+0,23)

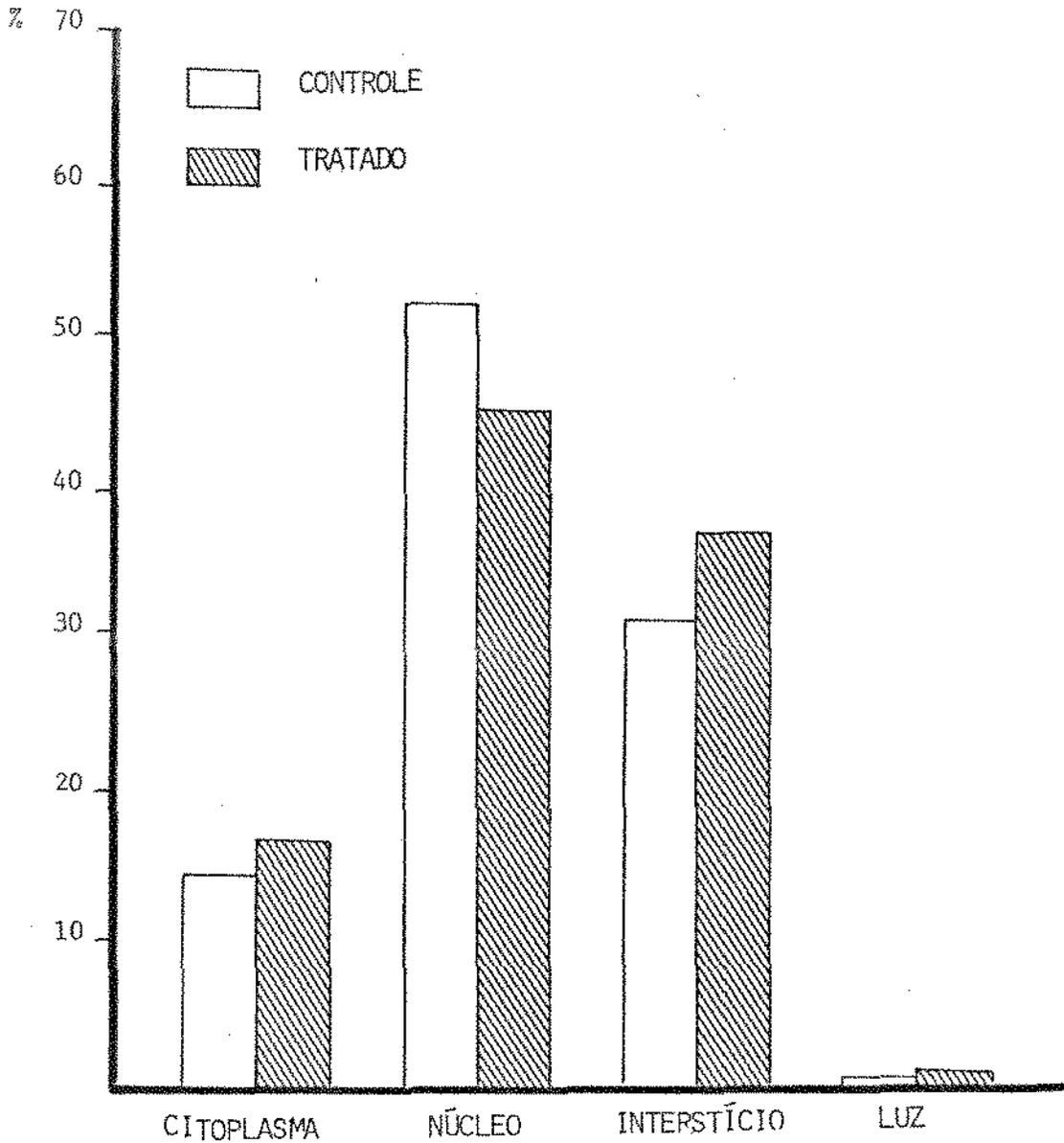


Figura 4 - Média dos valores correspondentes às percentagens de citoplasma, núcleo, interstício e luz das glândulas lacrimais extra orbitárias dos ratos controle e tratados, sacrificados no 1º dia de vida.

Tabela 14 - Valores percentuais, médias destes valores e erro padrão das médias de citoplasma, núcleo, interstício e luz da glândula lacrimal dos ratos controle e tratados, sacrificados no 5º dia de vida.

CITOPLASMA		NÚCLEO		INTERSTÍCIO		LUZ	
C	T	C	T	C	T	C	T
16,9	16,4	51,3	51,9	28,0	30,6	3,8	0,6
18,4	21,0	51,6	42,9	27,2	32,3	2,8	3,8
15,9	19,0	49,1	45,1	32,2	34,2	2,8	1,7
14,7	18,5	44,2	45,4	38,3	33,9	2,8	2,2
20,0	17,6	47,5	40,5	29,2	38,9	3,3	3,0
22,2	23,7	41,7	46,7	34,0	27,7	2,1	1,9
19,5	18,0	40,4	49,3	37,8	31,0	2,3	1,7
17,6	17,8	43,3	48,7	36,3	31,9	2,8	1,6
13,9	16,8	46,7	48,2	36,3	33,3	3,1	1,7
22,7	19,7	42,4	49,0	33,3	30,0	1,6	1,3
\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
18,18	18,90	45,82	46,77	33,26	32,38	2,74	1,95
(+ 2,97)	(+2,12)	(+4,01)	(+3,37)	(+4,04)	(+3,02)	(+0,62)	(+0,89)

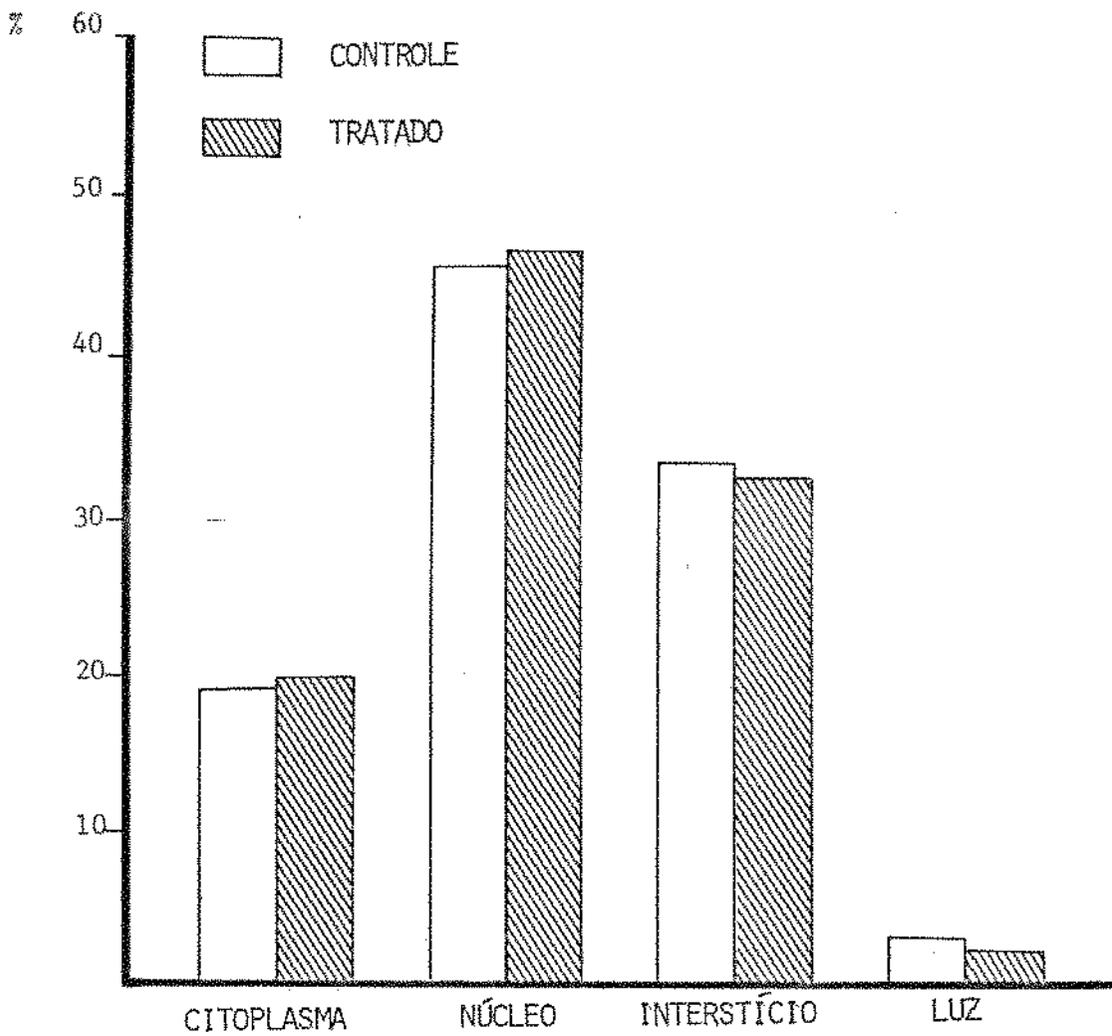


Figura 5 - Média dos valores correspondentes às percentagens de citoplasma, núcleo, interstício e luz das glândulas lacrimais extra orbitárias dos ratos controle e tratados, sacrificados com 5 dias de vida.

Tabela 15 - Valores percentuais, médias destes valores e erro padrão das médias de citoplasma, núcleo, interstício e luz da glândula lacrimal dos ratos controle e tratados, sacrificados no 10º dia de vida.

CITOPLASMA		NÚCLEO		INTERSTÍCIO		LUZ	
C	T	C	T	C	T	C	T
24,0	25,3	53,9	52,2	19,1	19,1	3,0	3,4
24,7	33,2	50,4	48,9	22,4	16,5	2,5	1,4
27,0	22,9	51,8	57,9	18,7	17,4	2,5	1,8
24,4	25,1	49,8	56,1	23,0	16,6	2,8	2,2
22,2	19,3	53,6	60,0	20,7	18,0	3,5	2,7
31,9	21,6	51,8	61,1	11,8	15,2	4,5	2,1
25,1	23,1	53,2	55,5	18,5	19,1	3,2	2,3
21,8	26,1	52,2	57,1	24,2	15,2	1,8	1,6
26,0	25,9	51,9	55,8	19,7	16,3	2,4	2,0
25,1	27,8	50,1	59,7	22,6	11,1	2,2	1,4
\bar{X}							
25,22	25,03	51,87	56,43	20,07	16,45	2,84	2,09
($\pm 2,82$)	($\pm 3,79$)	($\pm 1,44$)	($\pm 3,71$)	($\pm 3,52$)	($\pm 2,34$)	($\pm 0,76$)	($\pm 0,62$)

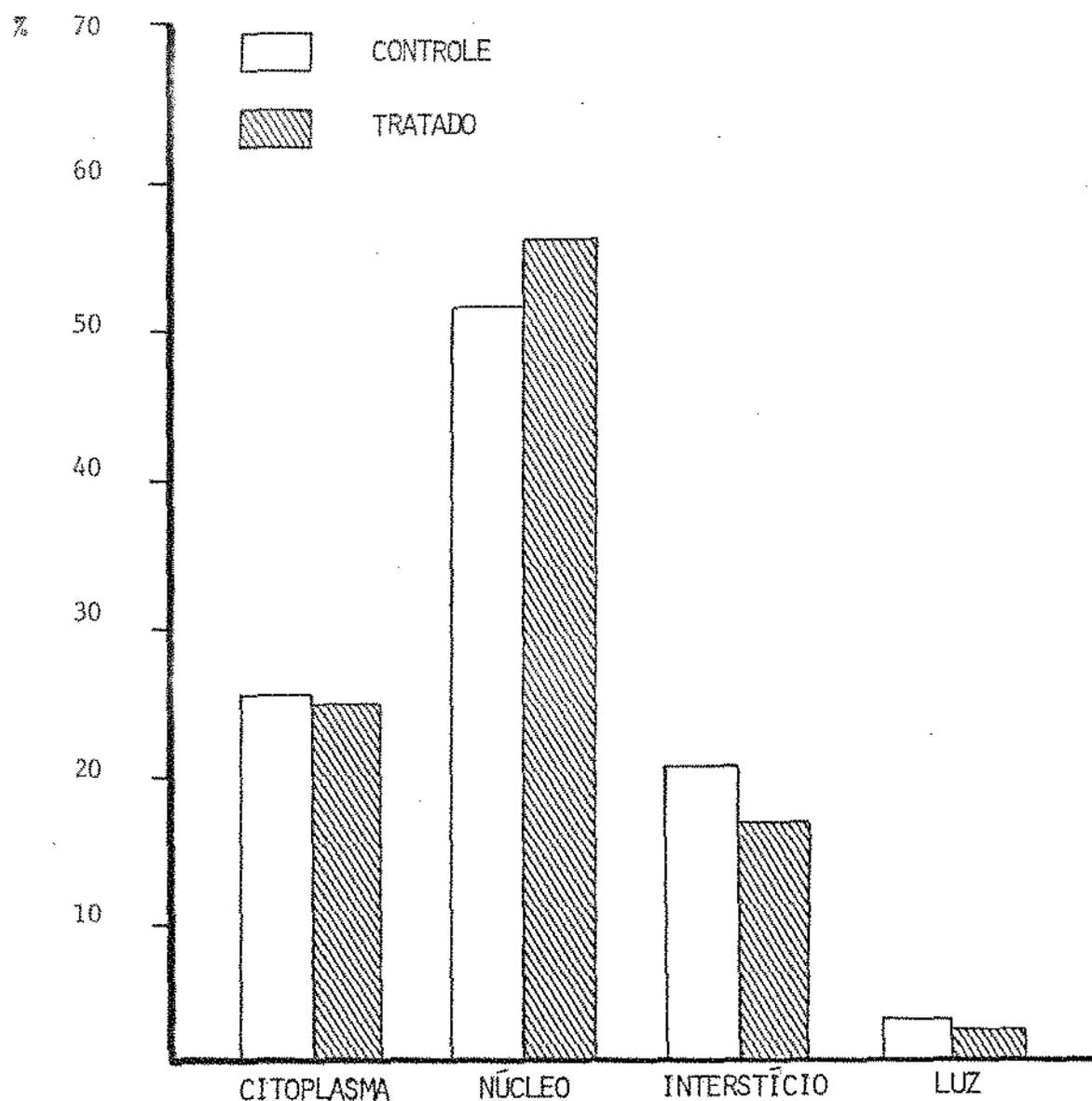


Figura 6 - Média dos valores correspondentes às percentagens de citoplasma, núcleo, interstício e luz acinar das glândulas lacrimais extra orbitárias dos ratos controle e tratados, sacrificados no 10º dia de vida.

Tabela 16 - Valores percentuais, médias destes valores e erro padrão das médias de citoplasma, núcleo, interstício e luz da glândula lacrimal dos ratos controle e tratados, sacrificados no 15º dia de vida.

CITOPLASMA		NÚCLEO		INTERSTÍCIO		LUZ	
C	T	C	T	C	T	C	T
27,0	29,6	53,5	54,7	18,5	15,1	0,1	0,6
27,4	33,5	48,6	47,0	22,6	17,9	1,4	1,6
30,2	36,6	50,4	48,3	17,8	13,9	1,6	1,2
36,9	31,0	51,2	49,9	10,1	17,5	1,8	1,6
27,5	29,7	47,6	50,3	24,3	18,2	0,6	1,8
32,7	30,9	55,4	52,0	10,3	15,9	1,6	1,2
33,5	27,2	48,0	54,9	17,4	15,2	1,1	2,7
34,8	32,4	53,1	55,0	11,6	11,2	0,5	1,4
34,9	30,1	52,4	53,8	11,1	15,2	1,6	0,9
31,1	38,2	51,6	46,5	16,0	13,9	1,3	1,4
\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
31,60	31,92	51,18	51,24	15,97	15,40	1,16	1,44
(±3,53)	(±5,36)	(±2,55)	(±5,31)	(±5,11)	(±2,14)	(±0,57)	(±0,57)

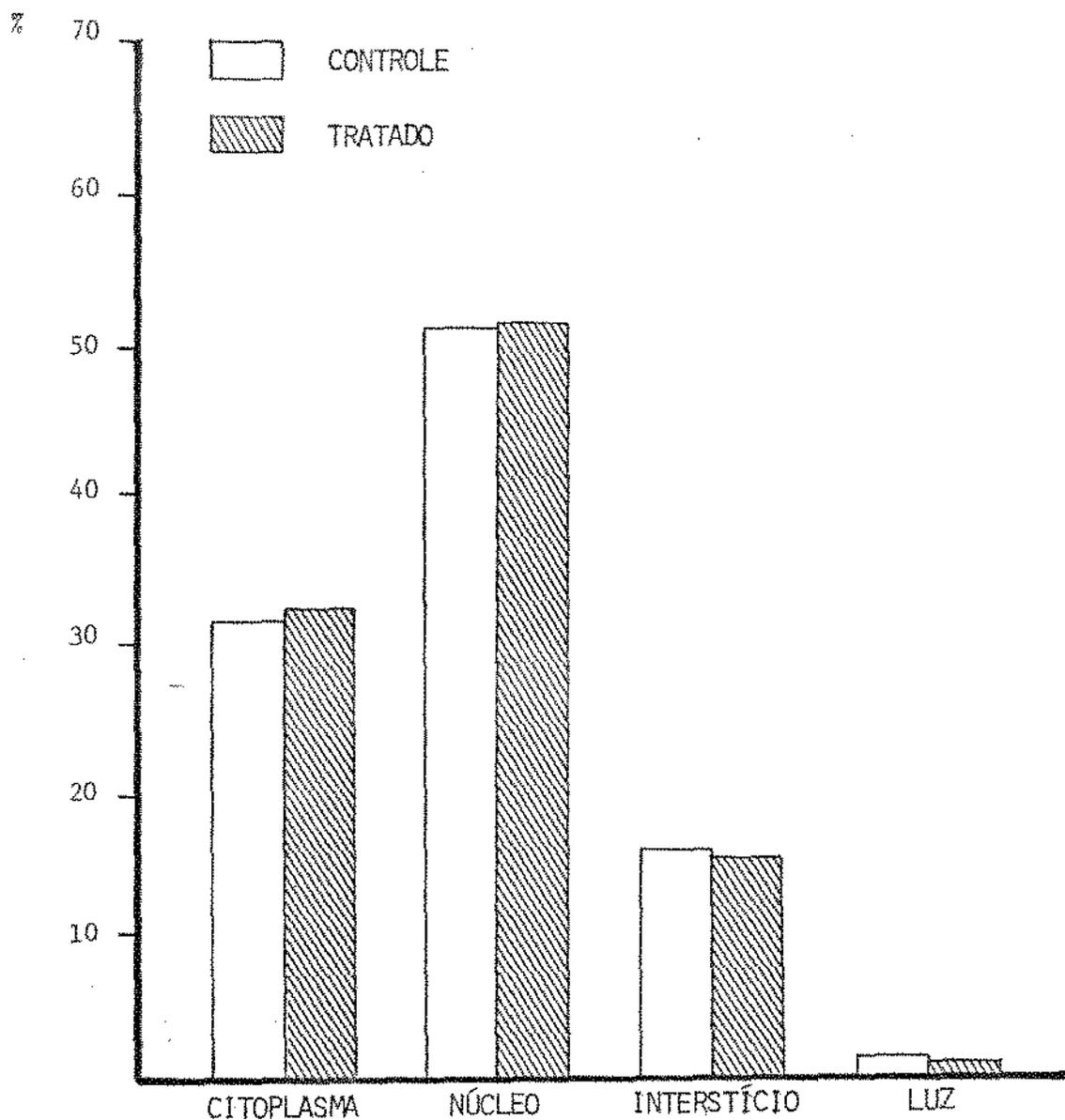


Figura 7 - Média dos valores correspondentes às percentagens de citoplasma, núcleo, interstício e luz das glândulas lacrimais extra orbitárias dos ratos controle e tratados, sacrificados no 15º dia de vida.

Tabela 17 - Valores percentuais, médias destes valores e erro padrão das médias do citoplasma, núcleo, interstício e luz da glândula lacrimal dos ratos controle e tratados, sacrificados no 20º dia de vida.

CITOPLASMA		NÚCLEO		INTERSTÍCIO		LUZ	
C	T	C	T	C	T	C	T
41,5	41,9	42,0	42,1	15,3	14,6	1,2	1,4
49,2	32,9	32,4	44,7	16,4	20,6	2,0	1,8
43,5	36,2	32,8	40,2	22,5	21,4	1,2	2,2
36,6	29,7	52,3	51,1	10,5	17,0	0,6	1,8
36,2	34,4	49,9	44,5	12,8	19,3	1,1	1,8
41,1	34,5	41,5	43,9	16,4	20,3	1,0	1,3
33,3	31,4	41,0	41,8	24,3	25,3	1,4	1,5
40,9	31,4	37,9	49,6	20,6	16,6	0,6	2,4
36,8	34,1	48,4	49,7	13,6	14,2	1,2	2,0
36,4	31,1	40,4	49,6	22,3	16,8	0,9	2,5
\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
39,55	33,76	41,86	45,76	17,47	18,61	1,12	1,87
(+4,63)	(+3,48)	(+6,72)	(+4,00)	(+4,68)	(+3,42)	(+0,40)	(+0,41)

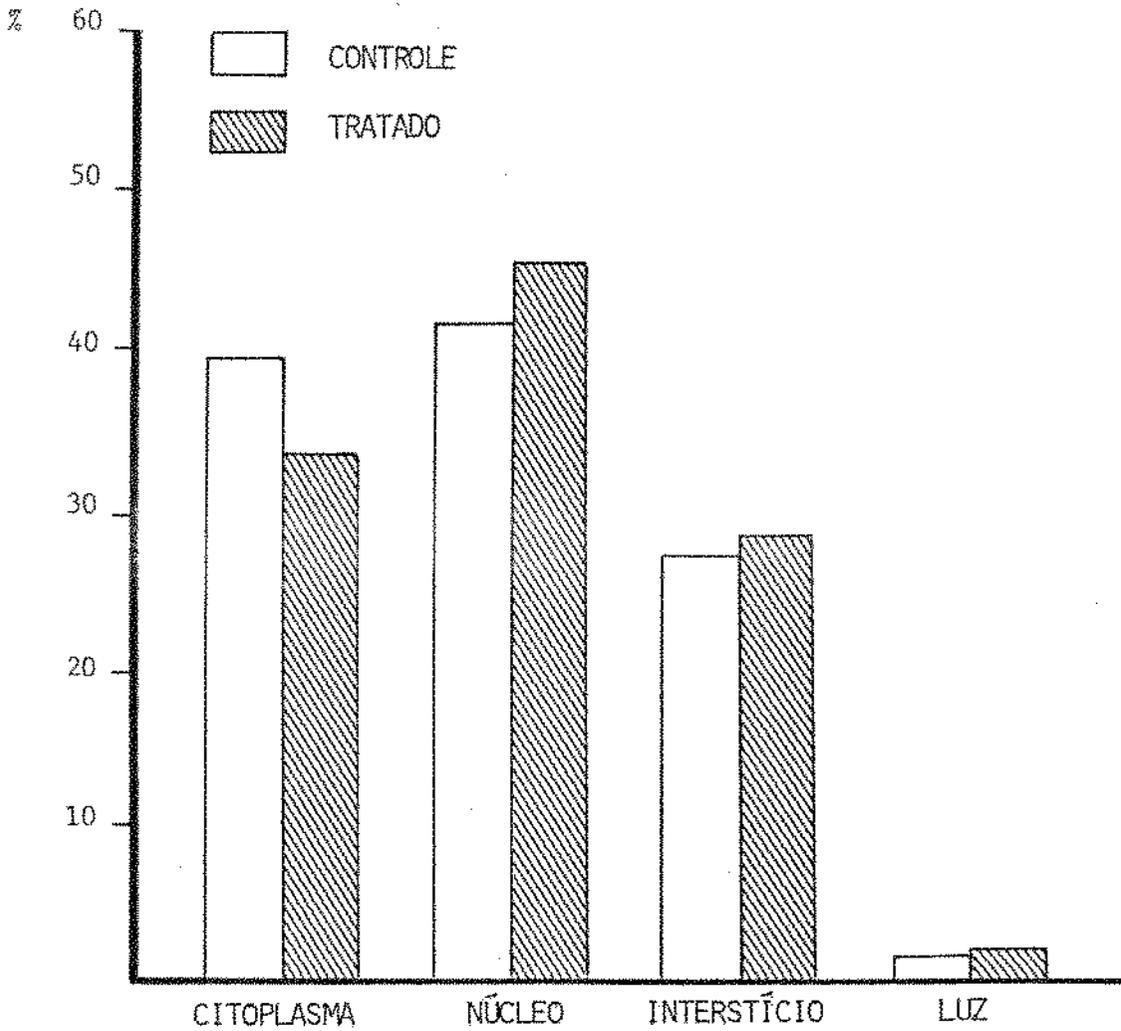


Figura 8 - Média dos valores correspondentes às percentagens de citoplasma, núcleo, interstício e luz das glândulas lacrimais extra orbitárias dos ratos controle e tratados, sacrificados no 20º dia de vida.

Tabela 18 - Valores percentuais, médias destes valores e erro padrão das médias de citoplasma, núcleo, interstício e luz da glândula lacrimal dos ratos controle e tratados, sacrificados no 25º dia de vida.

CITOPLASMA		NÚCLEO		INTERSTÍCIO		LUZ	
C	T	C	T	C	T	C	T
57,3	53,2	18,0	32,9	23,6	12,3	1,1	1,6
63,8	46,3	21,3	35,5	13,7	17,1	1,2	0,9
58,2	57,5	19,9	30,0	20,9	10,6	1,0	1,9
59,2	52,8	26,1	41,7	14,2	4,5	0,5	1,0
52,8	53,4	36,3	27,9	9,2	18,1	1,7	0,6
62,2	50,0	29,2	27,0	6,9	21,8	1,7	1,2
53,0	55,2	31,7	34,6	14,0	9,1	1,3	1,1
51,1	49,2	33,2	38,5	13,9	10,2	1,8	2,1
49,5	54,9	34,3	29,8	14,4	13,9	1,8	1,4
45,3	52,7	37,0	32,6	15,9	12,8	1,8	1,9
\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
55,24	52,52	28,97	33,07	14,67	13,04	1,39	1,37
(+5,87)	(+3,25)	(+7,87)	(+4,68)	(+4,86)	(+4,97)	(+0,44)	(+0,49)

Tabela 19 - Análise de variância dos ângulos correspondentes do citoplasma, núcleo, interstício e luz acinar das glândulas lacrimais extra orbitárias dos ratos controle e tratados, sacrificados com 1 dia de vida.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F
Citoplasma				
Entre grupos	23,54	1	23,54	1,44 ^{N.S.}
Erro	293,80	18	16,32	
Total	317,34	19		
Núcleos				
Entre grupos	304,18	1	304,18	14,39*
Erro	380,36	18	21,13	
Total	684,54	19		
Interstício				
Entre grupos	164,74	1	164,74	5,27**
Erro	562,85	18	31,26	
Total	727,59	19		
Luz acinar				
Entre grupos	0,18	1	0,18	3,25 ^{N.S.}
Erro	1,00	18	0,05	
Total	1,18	19		

N.S. = Não significativo

* = Significativo a nível de 99%, valor crítico de F = 8,53

** = Significativo a nível de 15%, valor crítico de F = 4,41

Tabela 20 - Análise de variância dos ângulos correspondentes do citoplasma, núcleo, interstício e luz acinar das glândulas lacrimais extra orbitárias dos ratos controle e tratados, sacrificados com 5 dias de vida .

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F
Citoplasma				
Entre grupos	2,59	1	2,59	0,59 ^{N.S.}
Erro	119,68	18	6,64	
Total	122,27	19		
Núcleos				
Entre grupos	0,62	1	0,62	0,03 ^{N.S.}
Erro	280,48	18	15,58	
Total	281,10	19		
Interstício				
Entre grupos	3,87	1	3,87	0,30 ^{N.S.}
Erro	228,90	18	12,71	
Total	232,77	19		
Luz acinar				
Entre grupos	3,12	1	3,12	5,28 ^{**}
Erro	10,63	18	0,59	
Total	13,75	19		

N.S. = Não significativo

** = Significativo a nível de 95%, valor crítico de F = 4,41

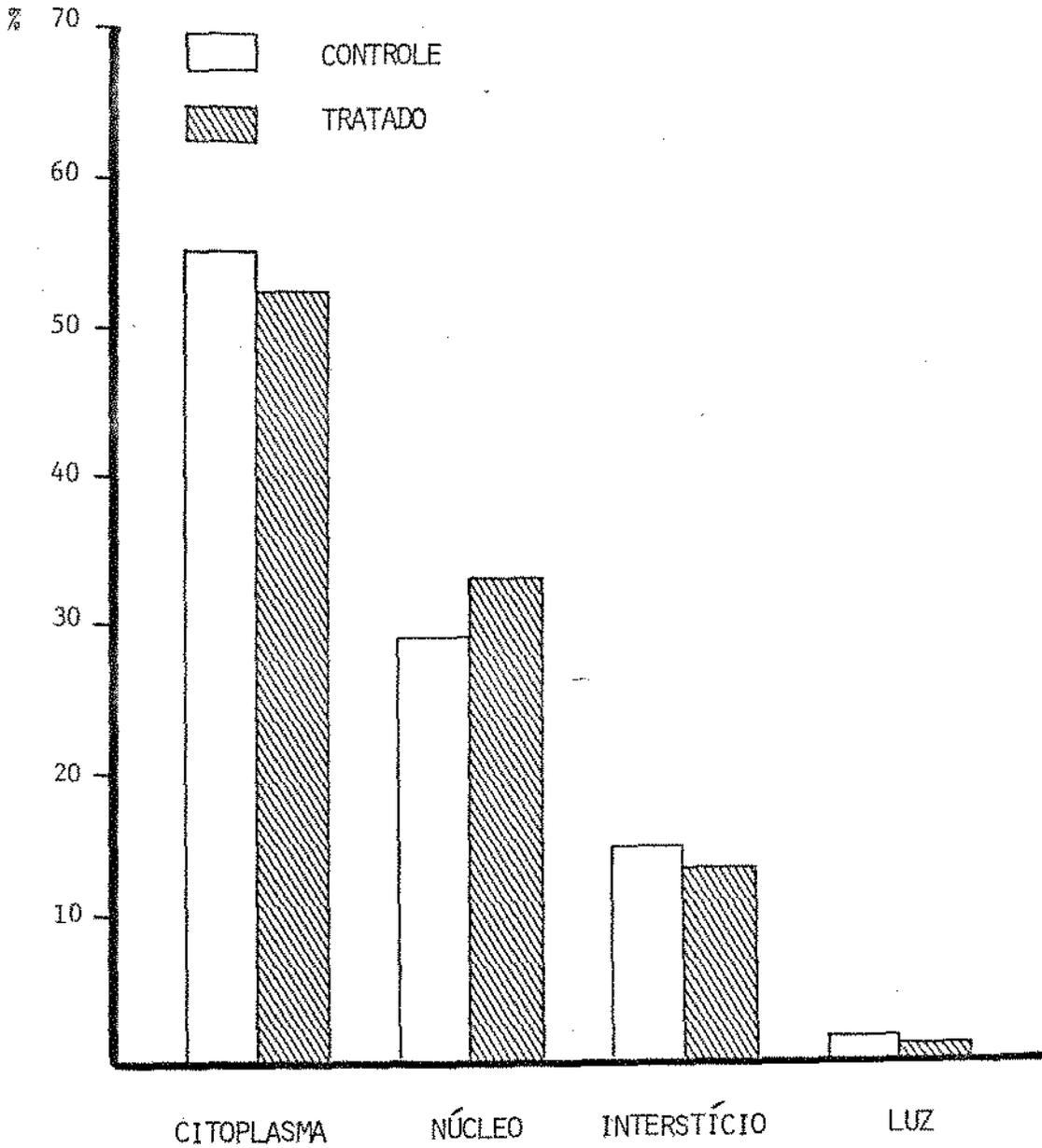


Figura 9 - Média dos valores correspondentes às percentagens de citoplasma, núcleo, interstício e luz das glândulas lacrimais extra orbitárias dos ratos controle e tratados, sacrificados no 25º de vida.

Tabela 22 - Análise de variância dos ângulos correspondentes do citoplasma, núcleo, interstício e luz acinar das glândulas lacrimais extra orbitárias dos ratos controle e tratados, sacrificados com 10 dias de vida.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F
Citoplasma				
Entre grupos	0,18	1	0,18	0,01 N.S.
Erro	200,93	18		
Total	201,11	19		
Núcleo				
Entre grupos	103,98	1	103,98	13,14*
Erro	142,39	18	7,91	
Total	246,37	19		
Interstício				
Entre grupos	65,52	1	65,52	7,55**
Erro	160,83	18	8,93	
Total	226,35	19		
Luz acinar				
Entre grupos	2,81	1	2,81	5,82**
Erro	8,69	18	0,48	
Total	11,50	19		

N.S. = Não significativo

* = Significativo a nível de 99%, valor crítico de F = 8,53

** = Significativo a nível de 95%, valor crítico de F = 4,41

Tabela 21 - Análise de variância dos ângulos correspondentes do citoplasma, núcleo, interstício e luz acinar das glândulas lacrimais extra orbitárias dos ratos controle e tratados, sacrificados com 15 dias de vida.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F
Citoplasma				
Entre grupos	0,52	1	0,52	0,04 N.S.
Erro	213,71	18	11,87	
Total	214,23	19		
Núcleos				
Entre grupos	0,02	1	0,02	0,001 N.S.
Erro	157,14	18	8,73	
Total	157,16	19		
Interstício				
Entre grupos	1,62	1	1,62	
Erro	275,62	18	15,31	0,001 N.S.
Total	277,24	19		
Luz acinar				
Entre grupos	0,39	1	0,39	
Erro	5,83	18	0,32	1,2 N.S.
Total	6,22	19		

N.S. = Não significativo

Tabela 23 - Análise de variância dos ângulos correspondentes do citoplasma, núcleo, interstício e luz acinar das glândulas lacrimais extra orbitárias dos ratos controle e tratados, sacrificados com 20 dias de vida.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F
Citoplasma				
Entre grupos	167,62	1	167,62	9,9*
Erro	301,95	18	16,77	
Total	469,57	19		
Núcleos				
Entre grupos	74,48	1	74,48	2,43 N.S.
Erro	551,95	18	30,66	
Total	626,43	19		
Interstício				
Entre grupos	6,50	1	6,50	0,39 N.S.
Erro	302,71	18	16,81	
Total	309,21	19		
Luz acinar				
Entre grupos	2,81	1	2,81	17,00*
Erro	2,98	18	0,16	
Total	5,79	19		

N.S. = Não significativo

* = Significativo

Tabela 24 - Análise de variância dos ângulos correspondentes do citoplasma, núcleo, interstício e luz acinar das glândulas lacrimais extra orbitárias dos ratos controle e tratados, sacrificados com 25 dias de vida.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F
Citoplasma				
Entre grupos	36,98	1	36,98	1,64 N.S.
Erro	405,34	18	22,51	
Total	442,32	19		
Núcleo				
Entre grupos	95,48	1	95,48	2,69**
Erro	638,12	18	35,45	
Total	733,60	19		
Interstício				
Entre grupos	13,28	1	13,28	0,55**
Erro	435,29	18	24,18	
Total	448,57	19		
Luz acinar				
Entre grupos	0,04	1	0,04	0,15**
Erro	3,65	18	0,20	
Total	3,69	19		

N.S. = Não significativo

** = Significativo a nível de 95%, valor crítico de $F = 4,41$

3.4 RESULTADOS CARIOMÉTRICOS

3.4.1 CARIOMETRIA

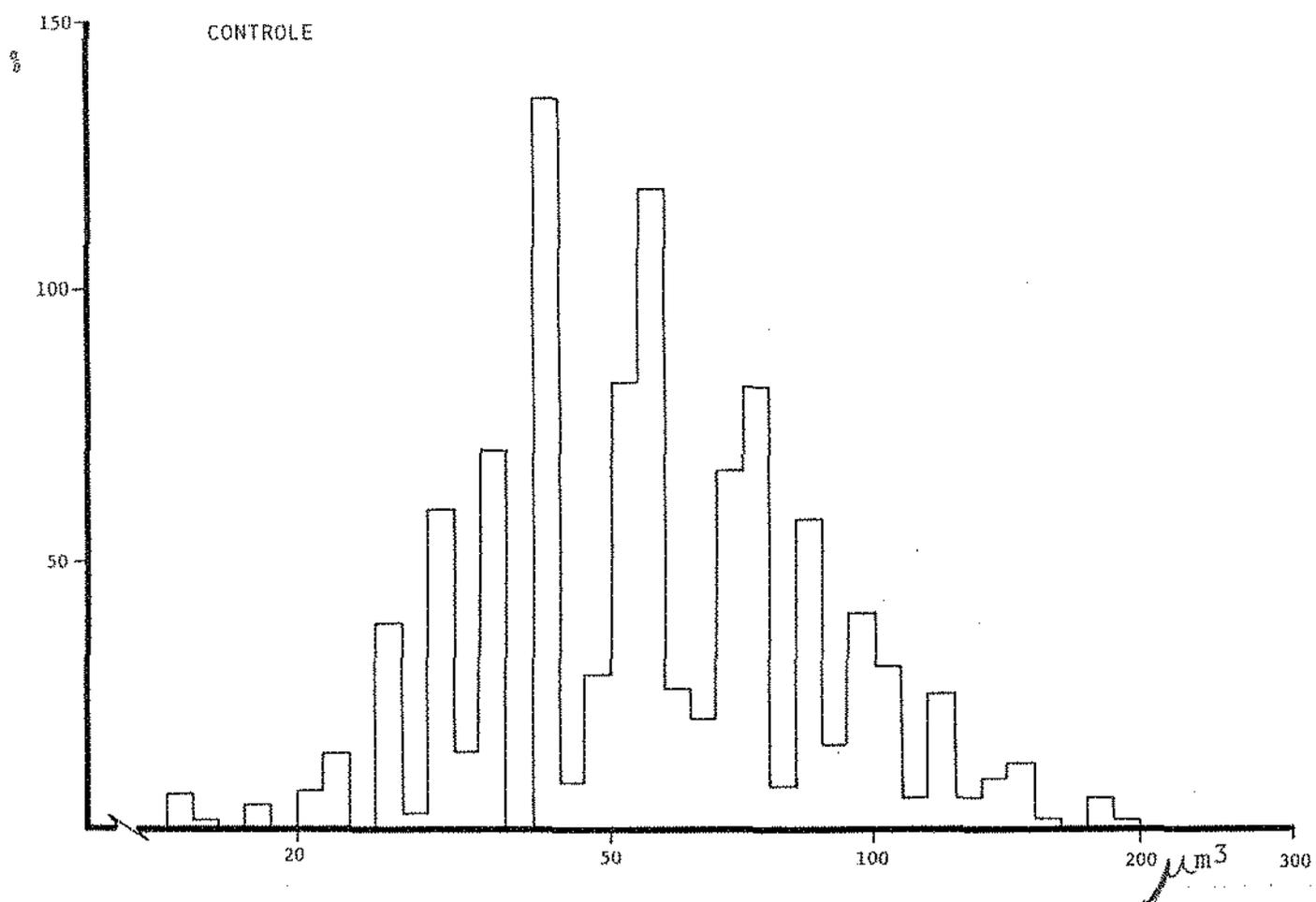
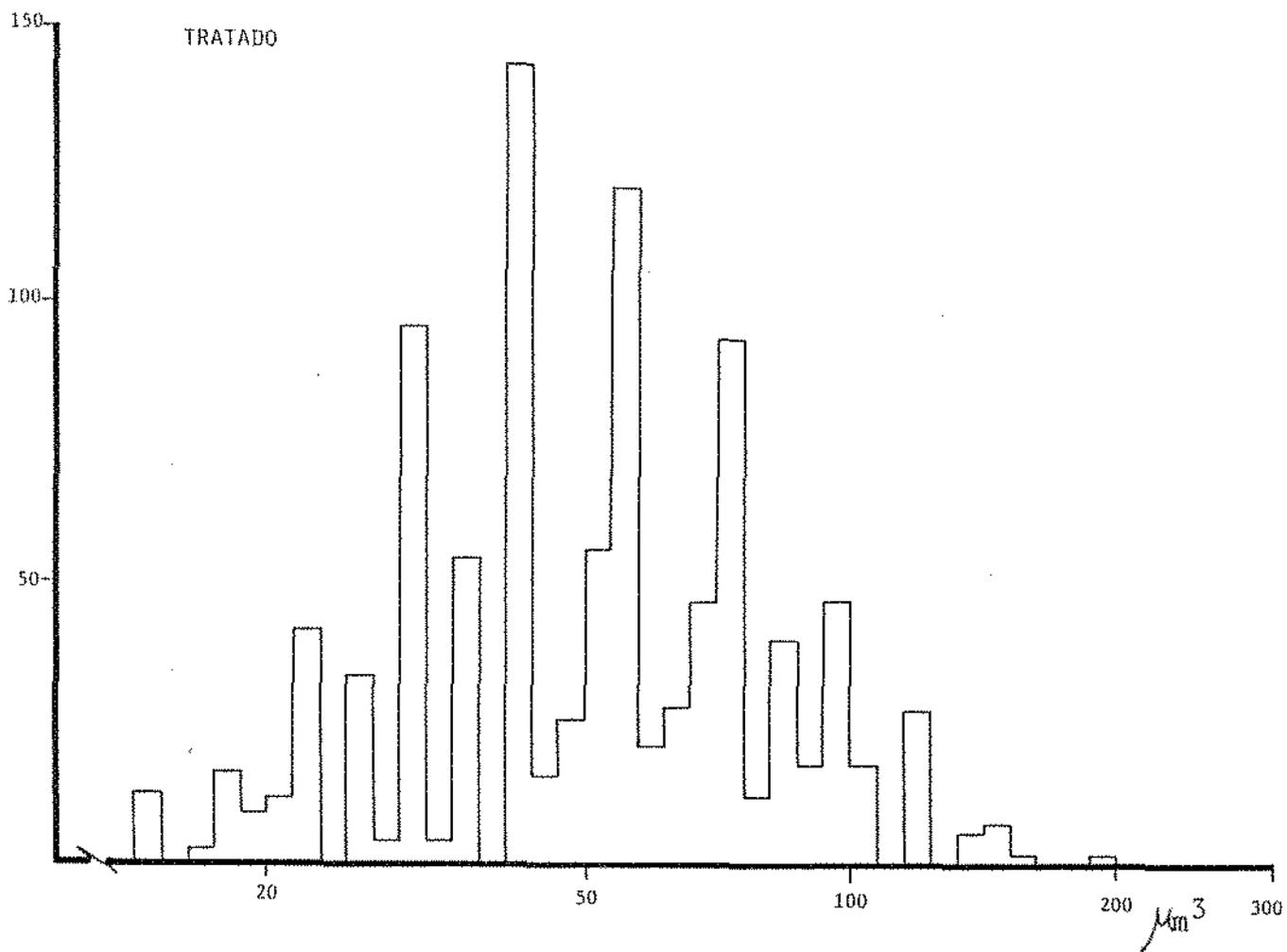
Analisando-se a Tabela 31, verificou-se que os volumes nucleares das células acinares das glândulas lacrimais extra orbitárias de ratos cujas mães receberam uma única dose de vitamina A no 10º dia de gestação e sacrificados no 1º dia de vida foram ligeiramente menores ($56,39 \mu m^3 \pm 7,31$) do que os dos animais controle ($61,46 \mu m^3 \pm 7,21$), e na Tabela 25 observou-se que a maior percentagem dos volumes nucleares dos animais tratados estava no intervalo 50 — 100 (47,8%), o mesmo ocorrendo para os controles com uma frequência igual a 51,7% neste intervalo. Para confirmação destes dados, foi construído, com o auxílio de uma régua logarítmica, um histograma (Figura 10), onde está representada a distribuição de frequência dos volumes nucleares absolutos das células acinares da glândula lacrimal dos animais sacrificados com 1 dia de vida pós-natal. Pela análise desta figura, observou-se um pequeno desvio da mediana para a esquerda dos animais tratados, fato este que foi confirmado quando da aplicação do teste de mediana.

Considerando-se o quadro a seguir:

	GRUPO CONTROLE	GRUPO TRATADO	TOTAL
Valores menores que a mediana	390	489	879
Valores iguais ou maiores que a mediana	610	511	1.121
Total	1.000	1.000	2.000

observe-se um χ^2 de valor 19,49 que, quando comparado ao χ^2 tabelado de valor 3,84, levou à rejeição da hipótese de que os valores fossem iguais.

Com relação aos volumes nucleares das células acinares da glândula lacrimal extra orbitária dos animais controle e tratados com 5 dias de vida, foi verificado pela análise da Tabela 32 que, tanto nos animais controle como nos tratados, os valores absolutos dos volumes nucleares apresentaram-se semelhantes, ou seja, $57,13 \mu\text{m}^3 \pm 9,00$ para os controles e $56,41 \mu\text{m}^3 \pm 7,45$ para os tratados. Tal fato teve confirmação pela análise da Tabela 26, uma vez que a maior percentagem dos volumes nucleares estavam dispostos no mesmo intervalo de 50 — 100, com a frequência relativa de 48,4% e 52,5% nos tratados. Este resultado foi evidenciado pela análise da Figura 11, onde estão representadas as distribuições de frequência dos volumes nucleares dos animais controle e tratados, onde não se ob-

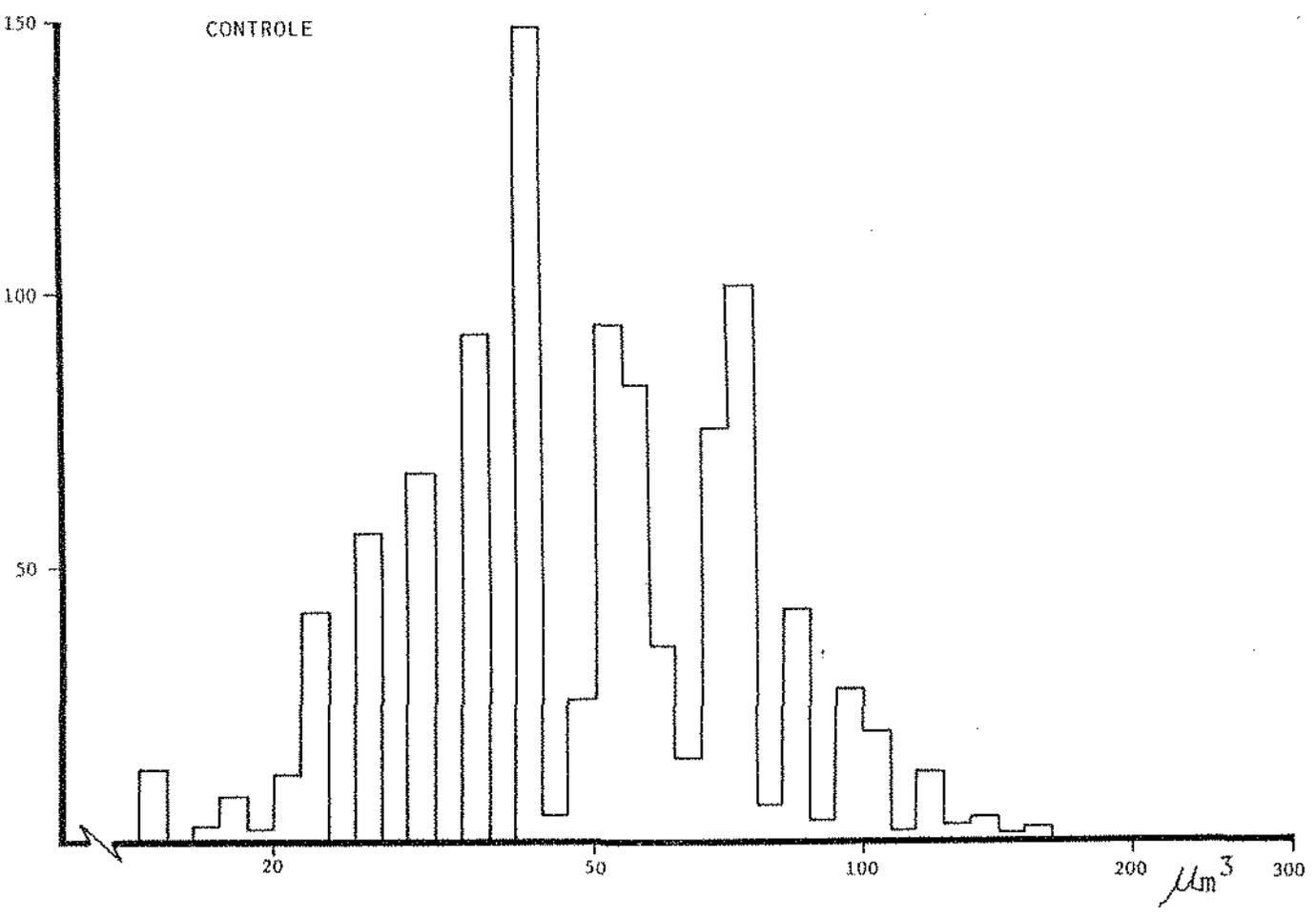
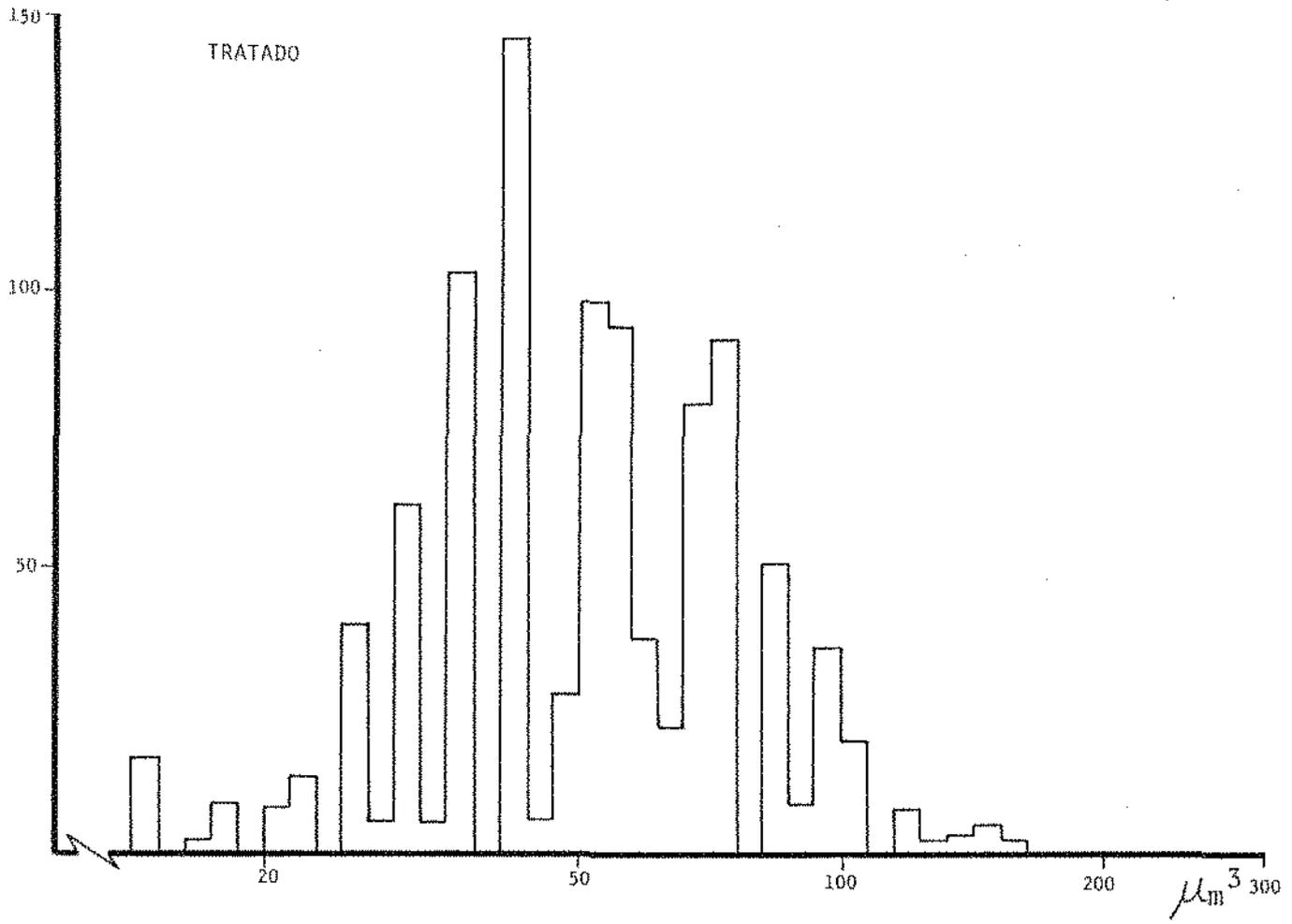


servou deslocamento da mediana. Quando da aplicação do teste da mediana, obteve-se uma comprovação desses resultados. Considerando-se o quadro abaixo:

	GRUPO CONTROLE	GRUPO TRATADO	TOTAL
Valores menores que a mediana	435	472	904
Valores iguais ou maiores que a mediana	528	565	1.093
Total	1.000	1.000	2.000

obteve-se um χ^2 de valor 0,12 que, quando comparado ao χ^2 tabelado de valor 3,84, não rejeitou a hipótese de que os valores fossem iguais.

Analisando-se a Tabela 33, verificou-se que os volumes nucleares das células acinares das glândulas lacrimais extra orbitárias dos animais controle e tratados, sacrificados aos 10 dias de vida, apresentaram-se com um padrão semelhante aos do grupo anterior ($45,65 \text{ m}^3 \pm 2,83$ nos controles e $48,08 \text{ m}^3 \pm 4,12$ nos tratados). Da mesma forma, pôde-se observar que a maior frequência relativa nos controles e tratados também foi encontrada no mesmo intervalo de classe 0 — 50, com 56,4% para os controles e 55,0% para os tratados.



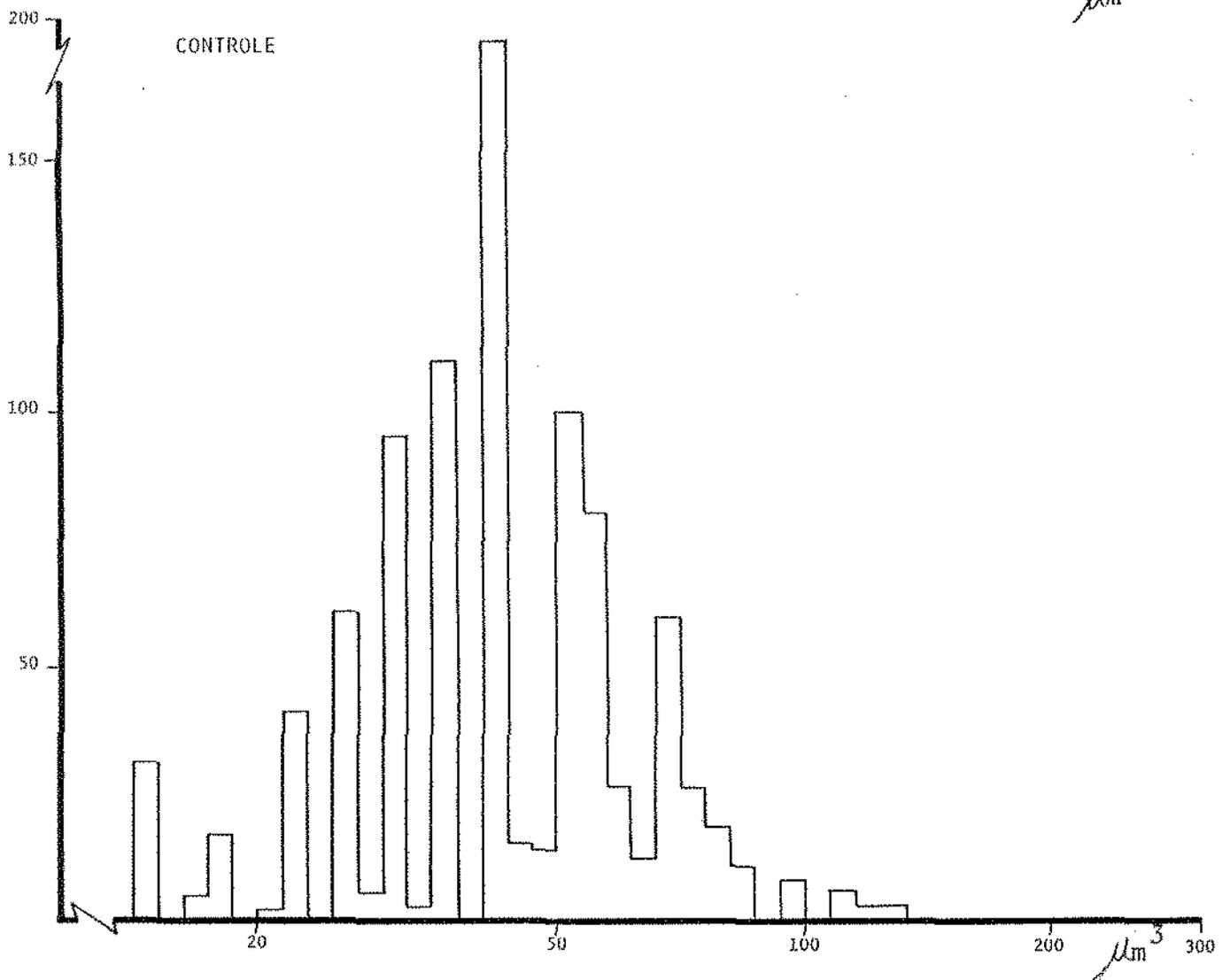
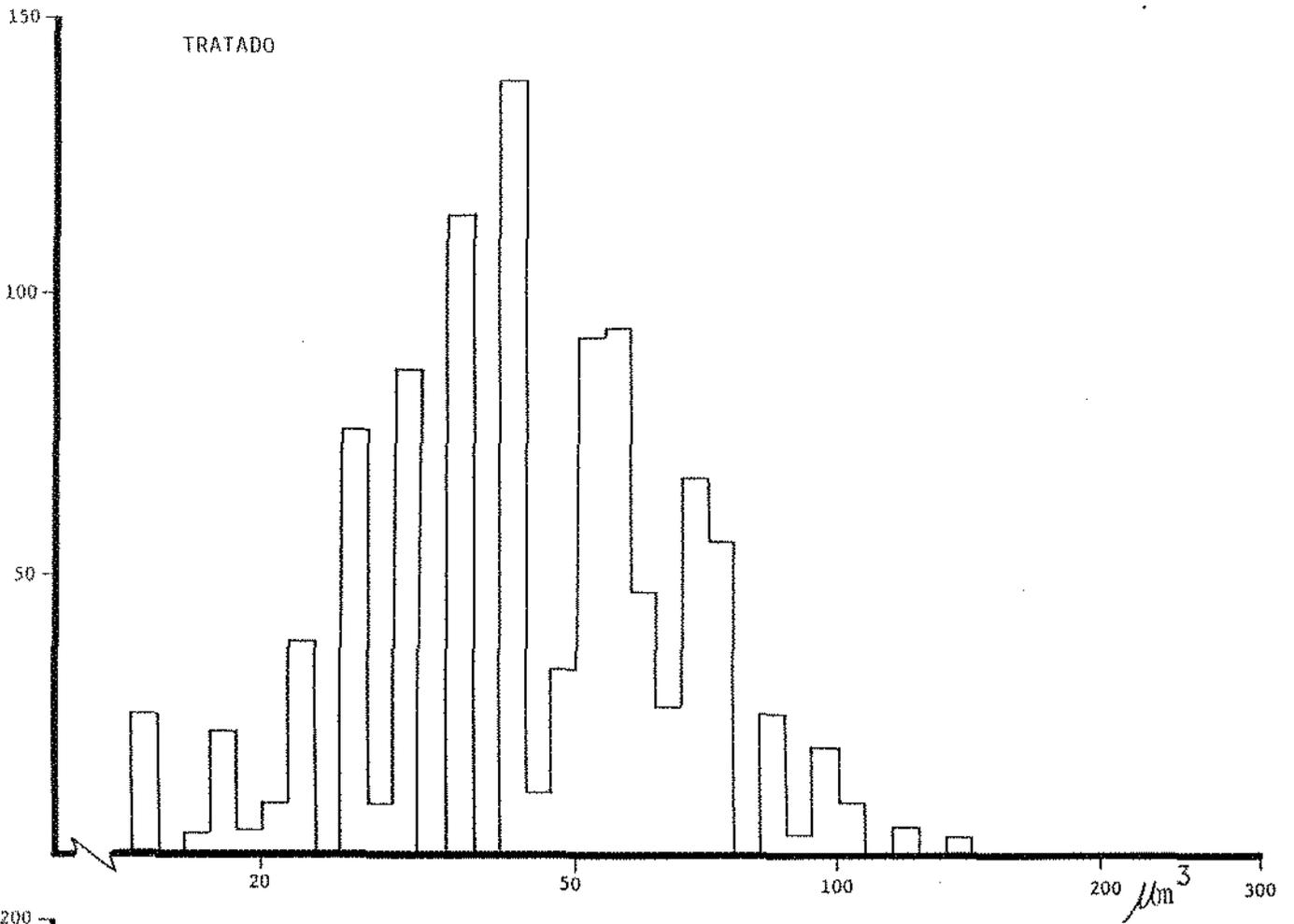
A análise da Figura 12, que mostra o histograma de frequência dos volumes nucleares dos animais acima citados, não evidenciou deslocamento da mediana. Tal fato foi confirmado, quando da aplicação do teste da mediana.

Considerando-se os dados constantes no quadro abaixo :

	GRUPO CONTROLE	GRUPO TRATADO	TOTAL
Valores menores que a mediana	364	367	731
Valores iguais ou maiores que a mediana	636	633	1.269
Total	1.000	1.000	2.000

obteve-se um χ^2 de valor 0,08 que, quando comparado ao χ^2 tabelado de valor 3,84, não rejeitou a hipótese H_0 .

Já os animais sacrificados com 15 dias de vida, cujas mães receberam uma única dose de vitamina A, mostraram-se com os volumes nucleares das células acinares diferentes (Tabela-34), $49,34 \mu\text{m}^3 \pm 4,83$ nos animais controle e $47,57 \mu\text{m}^3 \pm 5,97$ nos tratados. Na Tabela 28 estão expressos os dados da frequência relativa desses animais, observando-se que a maior percentagem de volumes nucleares tanto dos controles como dos tratados se encontra no mesmo intervalo de classe, ou seja, 0 — 50 (49,6% nos controles e 60,3% nos tratados). Analisan



do-se a figura 13, onde está representado o histograma de frequência dos valores dos volumes nucleares relativos a este último grupo, observou-se um desvio à esquerda da mediana para os tratados, o qual foi confirmado quando da aplicação do teste da mediana. Considerando os dados constantes no quadro abaixo, obteve-se um χ^2 no valor de 14,41 que, quando comparado ao χ^2 tabelado de valor 3,84, levou à rejeição da possibilidade desses valores serem semelhantes.

	GRUPO CONTROLE	GRUPO TRATADO	TOTAL
Valores menores que a mediana	329	412	741
Valores iguais ou maiores que a mediana	671	588	1.259
Total	1.000	1.000	2.000

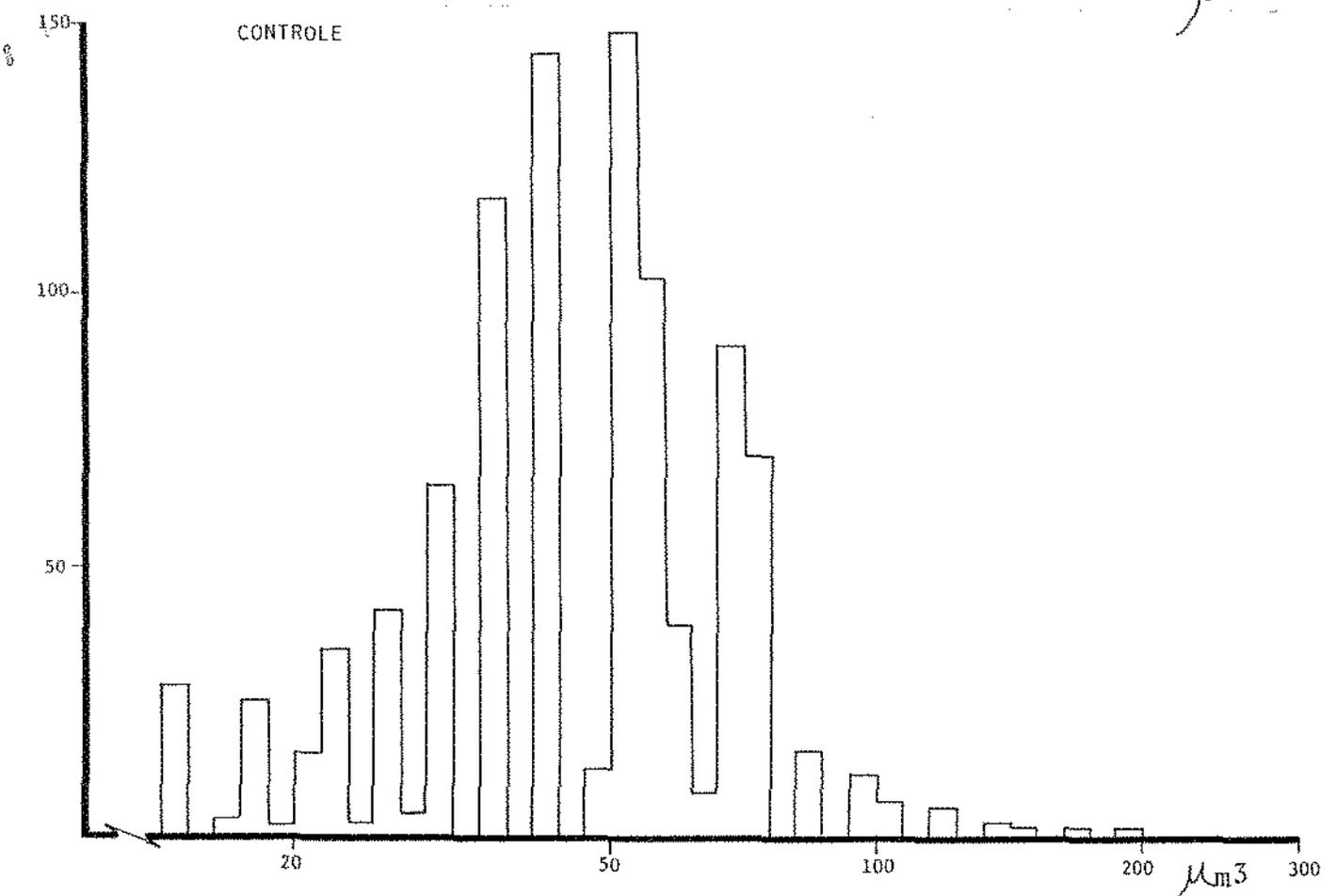
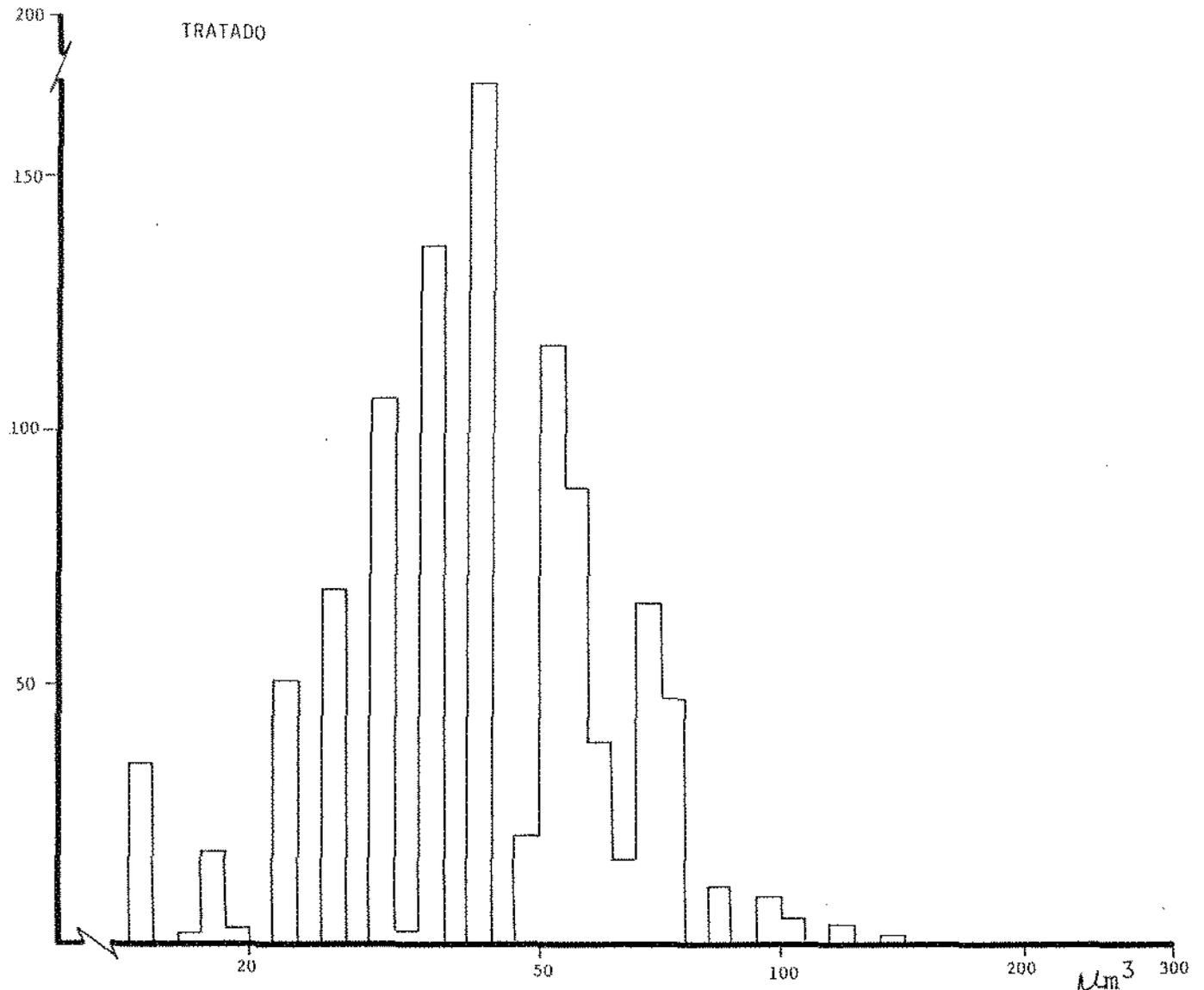
Os animais sacrificados no 20º dia de vida, cujas mães receberam intraperitonealmente uma injeção única de vitamina A, mostraram-se ainda com os volumes nucleares das células acinares diferentes ($47,20 \mu\text{m}^3 \pm 2,20$), quando comparados aos animais controles ($52,10 \mu\text{m}^3 \pm 5,27$) (Tabela 35). Na Tabela 29 estão registrados estes dados com a maior percentagem dos volumes nucleares dos animais controle e tratados, situados no

mesmo intervalo de classe, ou seja, 0 — 50 (51,4% para os controles e 59,3% para os tratados).

Analisando-se a Figura 14 onde está representado o histograma de frequência dos valores dos volumes nucleares relativos a este último grupo, observou-se ainda um desvio à esquerda da mediana para os tratados, fato este confirmado quando da aplicação do teste da mediana. Considerando-se os dados constantes no quadro abaixo, obteve-se um χ^2 de valor 14,80, que quando comparado ao χ^2 tabelado de valor 3,84, levou à rejeição da possibilidade desses valores serem semelhantes.

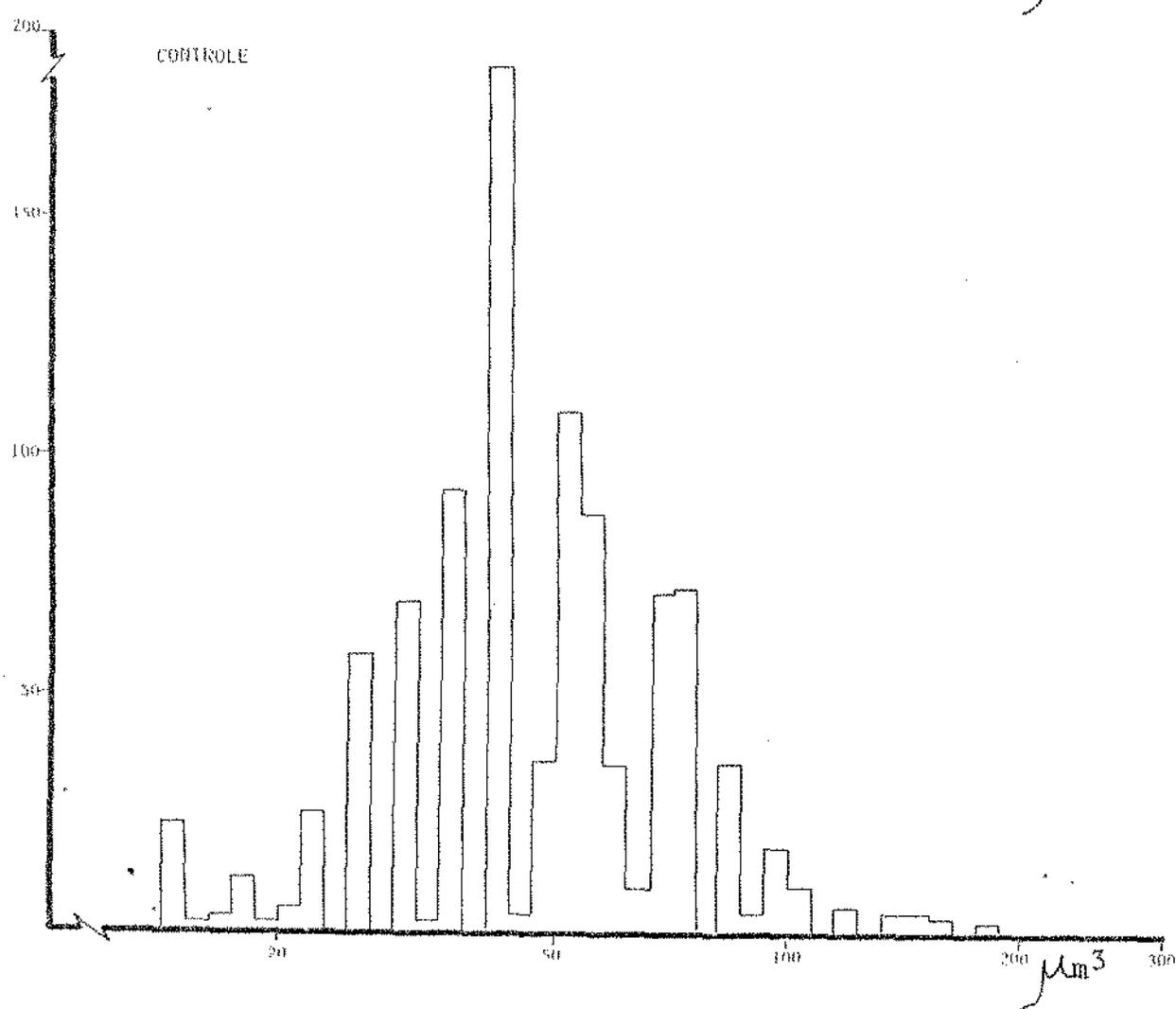
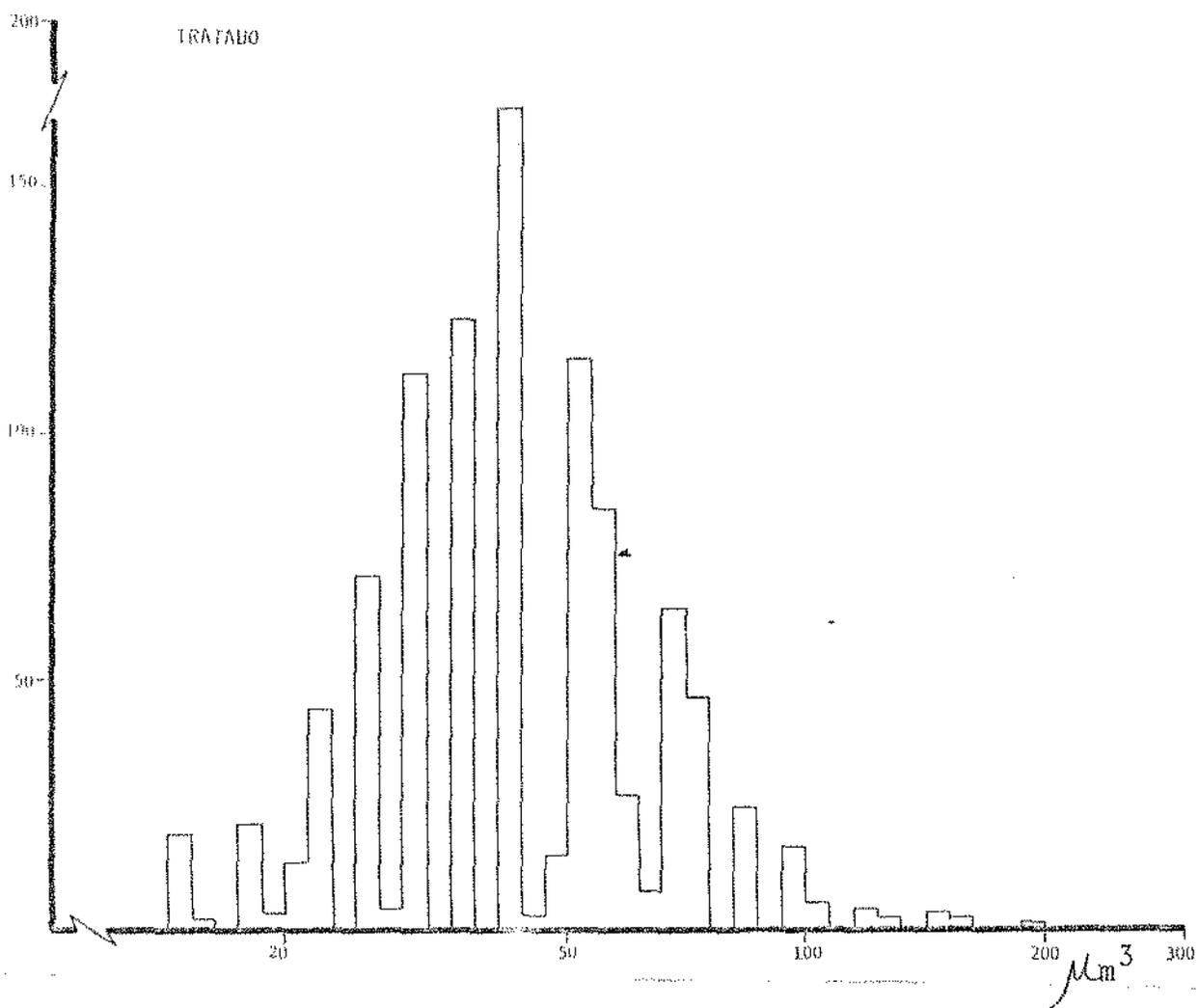
	GRUPO CONTROLE	GRUPO TRATADO	TOTAL
Valores menores que a mediana	293	410	703
Valores iguais ou maiores que a mediana	707	590	1.293
Total	1.000	1.000	2.000

Finalmente, com relação aos volumes nucleares das células acinares das glândulas lacrimais extra orbitárias dos ratos controle e tratados sacrificados no 25º dia de vida, foi verificado pela análise da Tabela 36, que o resultado foi semelhante ao caso anterior, ou seja, menores nos tratados



(62,49 $\mu\text{m}^3 \pm 8,87$) e maiores nos controles (76,90 $\mu\text{m}^3 \pm 10,29$). Tal fato foi também evidenciado quando da análise da Tabela 30, uma vez que a maior percentagem dos volumes nucleares dos animais controles se situou no intervalo 50 — 100 — (60,3%), enquanto que para os tratados foi obtida uma frequência no mesmo intervalo menor (52,5%). A diferença entre os valores dos volumes nucleares desses 2 grupos foi evidente pela análise da Figura 15, onde estão representadas as distribuições de frequência dos volumes nucleares nos animais controle e tratados, onde se observou um deslocamento para a esquerda da mediana dos animais tratados. Este pequeno desvio foi confirmado quando da aplicação do teste da mediana. Quando se considerou o quadro abaixo, obteve-se um χ^2 de valor 58,64 μm^3 que, quando comparado ao χ^2 tabelado de valor 3,84, levou à rejeição da hipótese que os valores fossem iguais.

	GRUPO CONTROLE	GRUPO TRATADO	TOTAL
Valores menores que a mediana	388	560	948
Valores iguais ou maiores que a mediana	612	440	1.052
Total	1.000	1.000	2.000



Com base nestes resultados cariométricos, pode-se notar que a administração de vitamina A em uma rata durante a gravidez, provocou nas glândulas lacrimais extra orbitárias dos filhotes, inicialmente, uma pequena diminuição do volume nuclear, quando comparado aos animais controle. Esta situação não foi observada nos animais sacrificados no 5º e 10º dia de vida, enfatizando uma reação nuclear à vitamina A e, posteriormente, a situação voltou a ficar semelhante ao grupo inicial, persistindo até o final do experimento.

Tabela 25 - Número de núcleos das células acinares da glândula lacrimal extra orbitária de ratos controle e tratados, sacrificados no 1º dia de vida.

Intervalo de classe (μm^3)	Número de núcleos Controle	Frequência relativa %	Número de núcleos Tratados	Frequência relativa %
0 — 50	390	39,0	464	46,4
50 — 100	517	51,7	478	47,8
100 — 150	74	7,4	58	5,8
150 — 200	19	1,9		
	1.000	100%	1.000	100%

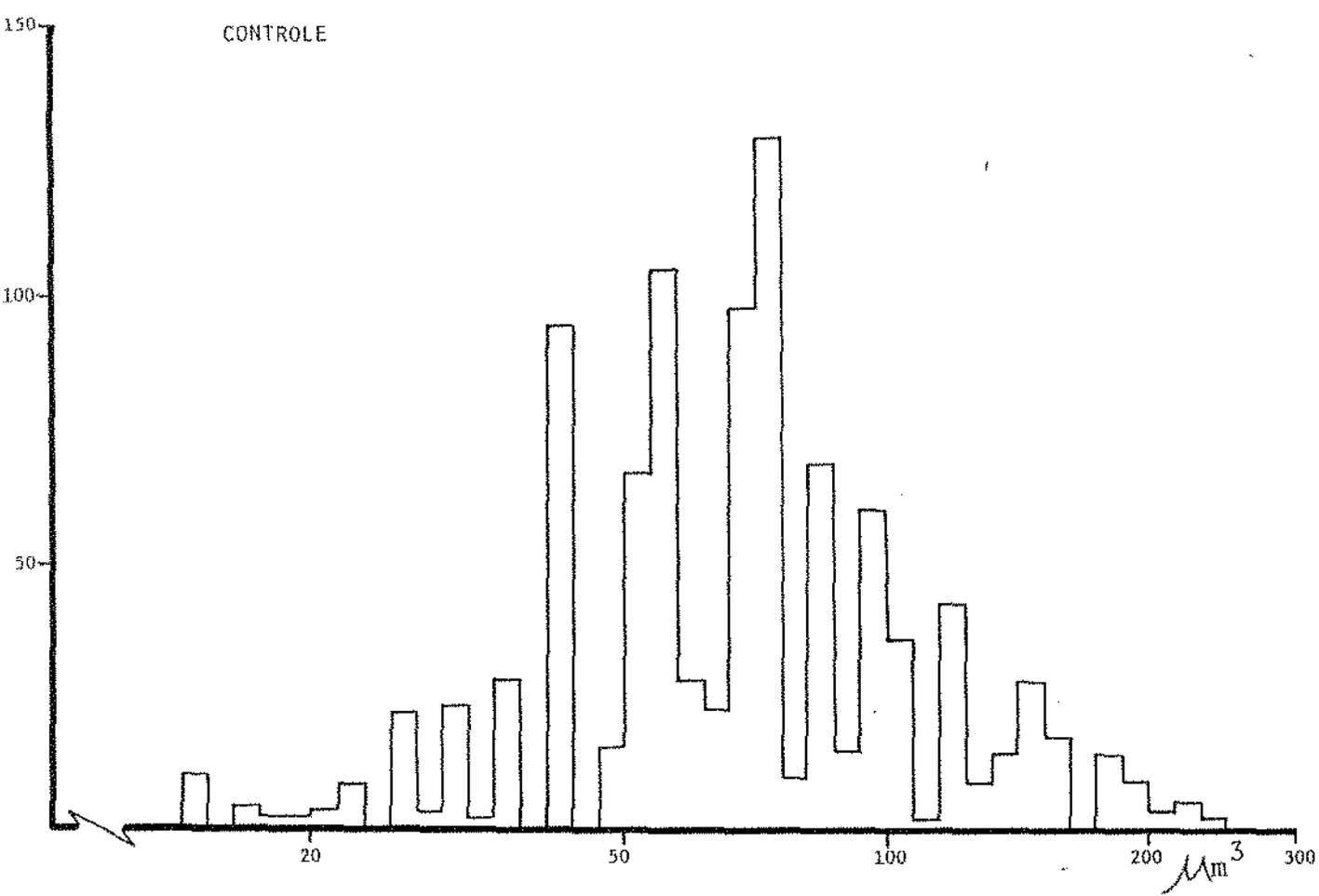
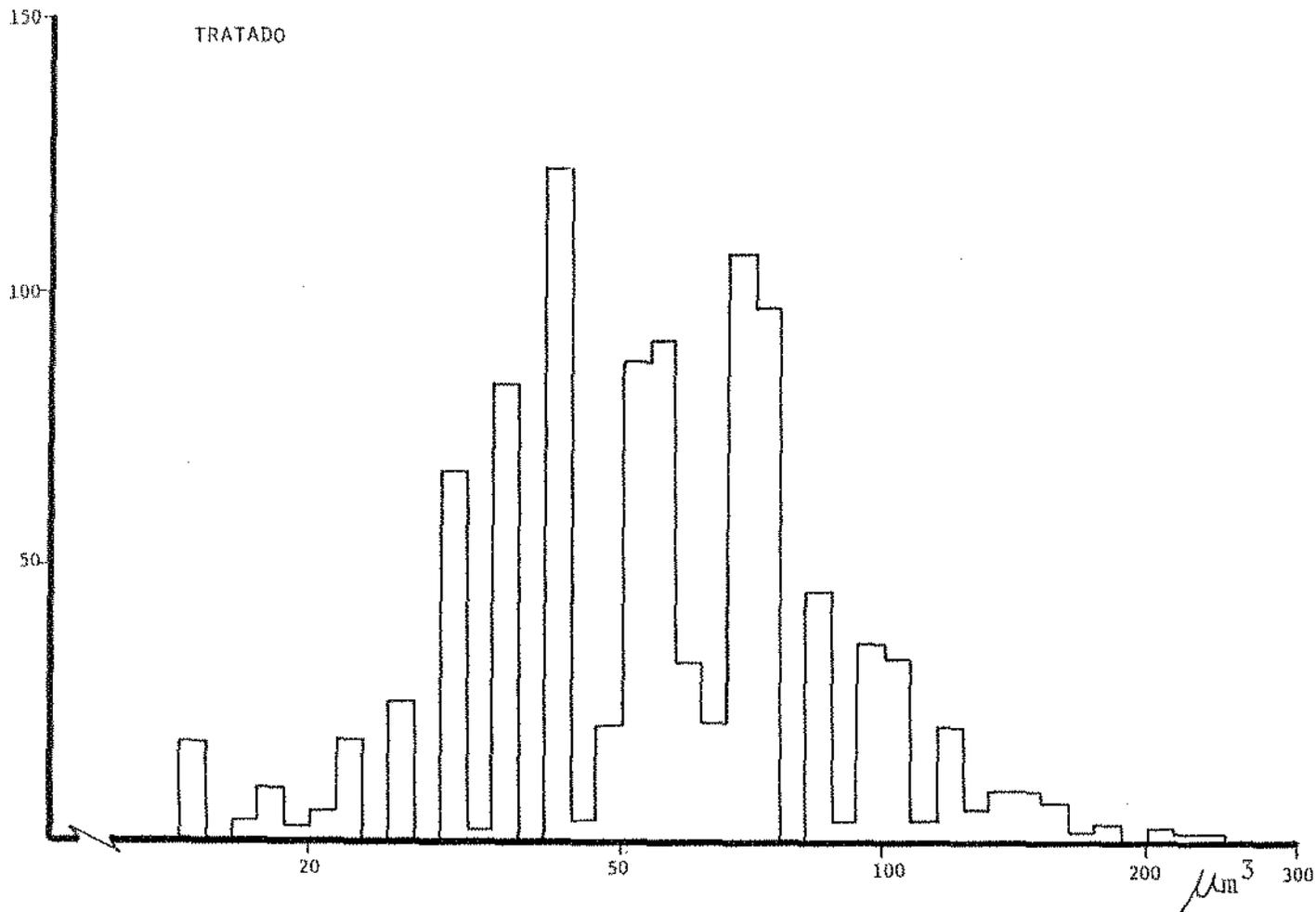


Tabela 26 - Número de núcleos das células acinares da glândula lacrimal extra orbitária de ratos controle e tratados, sacrificados no 5º dia de vida.

Intervalo de classe (μm^3)	Número de núcleos Controle	Frequência relativa %	Número de núcleos Tratados	Frequência relativa %
0 — 50	472	47,2	435	43,5
50 — 100	484	48,4	525	52,5
100 — 150	41	4,1	33	3,3
150 — 200	3	0,3	7	0,7
	1.000	100%	1.000	100%

Tabela 27 - Número de núcleos das células acinares da glândula lacrimal extra orbitária de ratos controle e tratados, sacrificados no 10º dia de vida.

Intervalo de classe (μm^3)	Número de núcleos Controle	Frequência relativa %	Número de núcleos Tratados	Frequência relativa %
0 — 50	564	56,4	550	55,0
50 — 100	427	42,7	434	43,4
100 — 150	9	0,9	16	1,6
150 — 200				
	1.000	100%	1.000	100%

Tabela 28 - Número de núcleos das células acinares da glândula lacrimal extra orbitária de ratos controle e tratados, sacrificados no 15º dia de vida.

Intervalo de classe (μm^3)	Número de núcleos Controle	Frequência relativa %	Número de núcleos Tratados	Frequência relativa %
0 — 50	496	49,6	603	60,3
50 — 100	488	48,8	389	38,9
100 — 150	13	1,3	8	0,8
150 — 200	3	0,3		
200 — 250				
	1.000	100%	1.000	100%

Tabela 29 - Número de núcleos das células acinares da glândula lacrimal extra orbitária de ratos controle e tratados, sacrificados no 20º dia de vida.

Intervalo de classe (μm^3)	Número de núcleos Controle	Frequência relativa %	Número de núcleos Tratados	Frequência relativa %
0 — 50	514	51,4	593	59,3
50 — 100	456	45,6	390	39,0
100 — 150	21	2,1	11	1,1
150 — 200	9	0,9	6	0,6
200 — 250				
	1.000	100%	1.000	100%

Tabela 30 - Número de núcleos das células acinares da glândula lacrimal extra orbitária de ratos controle e tratados, sacrificados no 25º dia de vida.

Intervalo de classe(μm^3)	Número de núcleos Controle	Frequência relativa %	Número de núcleos Tratados	Frequência relativa %
0 — 50	216	21,6	380	38,0
50 — 100	603	60,3	525	52,5
100 — 150	102	10,2	71	7,1
150 — 200	69	6,9	20	2,0
200 — 250	10	1,0	4	0,4
	1.000	100%	1.000	100%

Tabela 31 - Média e erro padrão das médias dos volumes nucleares das células acinares das glândulas lacrimais extra orbitárias, em micrômetros cúbicos, dos animais controle e tratados, sacrificados no 1º dia de vida.

CONTROLE	TRATADO
47,91	51,62
56,78	45,07
70,03	49,44
67,33	51,76
66,82	59,28
60,26	57,72
56,10	66,22
62,59	68,63
56,83	55,81
70,01	58,38
\bar{X} 61,46 (±7,21)	\bar{X} 56,39 (±7,31)

Tabela 32 - Médias e erropadrão das médias dos volumes nucleares das células acinares das glândulas lacrimais extra orbitárias, em micrômetros cúbicos, dos animais controle e tratados, sacrificados no 5º dia de vida.

CONTROLE	TRATADO
52,53	55,58
57,27	50,28
70,02	48,96
46,63	43,21
51,33	66,18
55,15	53,43
55,01	62,14
52,40	62,35
48,32	58,04
52,64	63,94
\bar{X} 57,13 (± 9,00)	\bar{X} 56,41 (± 7,45)

Tabela 33 - Médias e erro padrão das médias dos volumes nucleares das células acinares das glândulas lacrimais extra orbitárias, em micrômetros cúbicos, dos animais controle e tratados, sacrificados no 10º dia de vida.

CONTROLE	TRATADO
48,97	42,82
42,84	45,90
44,09	54,98
42,61	44,87
41,38	49,99
45,70	54,24
46,11	47,85
48,04	49,87
49,48	44,55
47,37	45,76
\bar{X} 45,65	\bar{X} 48,08
(\pm 2,83)	(\pm 4,12)

Tabela 34 - Médias e erro padrão das médias dos volumes nucleares das células acinares das glândulas lacrimais extra orbitárias, em micrômetros cúbicos, dos animais controle e tratados, sacrificados no 15º dia de vida.

CONTROLE	TRATADO
48,97	52,67
46,83	44,16
46,12	44,88
47,03	47,72
52,34	39,04
54,98	44,22
59,37	48,05
48,69	60,95
44,91	44,59
44,19	49,70
\bar{X}	\bar{X}
49,34	47,59
(± 4,83)	(± 5,97)

Tabela 35 - Médias e erro padrão das médias dos volumes nucleares das células acinares das glândulas lacrimais extra orbitárias, em micrômetros cúbicos, dos animais controle e tratados, sacrificados no 20º dia de vida.

CONTROLE	TRATADO
61,26	46,46
55,81	46,58
56,00	43,67
57,11	49,59
47,07	48,67
50,27	50,78
50,55	46,63
47,13	44,49
51,24	46,63
44,63	48,52
\bar{X} 52,10 (± 5,27)	\bar{X} 47,20 (± 2,20)

Tabela 36 - Médias e erro padrão das médias dos volumes nucleares das células acinares das glândulas lacrimais extra orbitárias, em micrômetros cúbicos, dos animais controle e tratados, sacrificados no 25º dia de vida.

CONTROLE	TRATADO
87,37	63,24
71,60	47,38
86,63	54,97
68,14	62,87
84,74	58,42
69,41	67,50
74,15	65,76
71,09	68,65
93,50	56,47
62,41	79,72
\bar{X} 76,90 (±10,29)	\bar{X} 62,49 (±8,87)

4. DISCUSSÃO

As conseqüências do excesso ou da deficiência de vitamina A em períodos críticos do desenvolvimento embrionário são traduzidas por malformações características. Estes períodos foram denominados "períodos teratogênicos" por GIROUD (1963).

O primeiro autor a descrever que a carência maternal de vitamina A era teratogênica foi HALE (1935). Este autor observou em suínos, malformações como fenda palatina, lábio leporino, microftalmia e rins com formato de ferradura. Estas mesmas alterações foram observadas no embrião do rato por WILSON & WARKANY (1948) e ROUX & cols. (1962).

GIROUD & cols. (1958, 1959), demonstraram que a administração de doses excessivas de vitamina A em ratas grávidas provocou a formação de embriões com hidronefroses, abaulamento anormal do ureter e aplasia da bexiga. Em 1959, GIROUD & MARTINET descreveram malformações e abortos em grande percentagem, quando da administração de doses excessivas de vitamina A em coelhas grávidas. Estas malformações eram traduzidas por: atrofia dos membros com redução do número de dedos, estreitamento da face, prognatismo, hemorragias oculares, deslocamento de retina e fibrose do humor vítreo.

MARIN-PADILHA e FERM (1965) demonstraram que uma única dose de 20.000 UI de retinol administrada intraperitonealmente entre o 5º e o 11º dia de gravidez de hamsters grávidas produzia embriões que também eram portadores de malformações como: anencefalia das órbitas, espinha bífida, lábio leporino, malformações de membros e presença de hérnias.

Segundo MARIN-PADILHA (1966), em ratas grávidas, os e-

feitos da vitamina A começam a se manifestar 6 horas depois da administração da droga. Se o embrião achar-se num período de desenvolvimento crítico, teremos profundas modificações estruturais traduzidas, inicialmente, por um aumento do espaço intercelular, aumento de líquido e dilatação dos sinusóides, atingindo o embrião na seguinte ordem: mesoderma cefálico, mesoderma axial não segmentado e mesoderma para-axial. De acordo com esse autor, as alterações iniciais concorrem para a degeneração mesodérmica que, conseqüentemente, deixa desprotegido o tubo neural, que se degenera e induz malformações. Estas malformações são conseqüências de alterações das membranas celulares, de modificações da estrutura físico-química das células, de desequilíbrios metabólicos e de modificações da atividade enzimática.

Em nosso material, não foram observadas malformações visíveis nem reabsorções de embriões. Os animais apresentaram uma postura normal, apetite e desenvolvimento corporal semelhante aos dos animais controle. O não aparecimento de malformações visíveis poderia ser devido a dois fatores: em primeiro lugar, a vitamina utilizada foi em forma de palmitato que apresenta uma menor atividade do que o retinol - (MARIN-PADILHA & FERM, 1965) e, em segundo lugar, o dia do período de gravidez em que foi administrada a droga, bem como a dose utilizada. Em experimentos anteriores, quando da utilização de doses mais elevadas, pôde-se observar uma intensa reabsorção fetal, presença de exoftalmia, ausência da boca e da coluna vertebral. Da dose por nós utilizada, resultou somente animais normais ao primeiro contato, com peso corporal semelhante ao peso dos ani -

mais controle. Esta alteração ponderal persistiu durante todo o experimento. (Tabelas 1, 3, 5, 7, 9 e 11).

Já o peso das glândulas lacrimais não acompanhou o peso corporal dos animais pois, apesar de ocorrer um desenvolvimento semelhante entre os animais controle e tratados, a média dos pesos das glândulas foi maior nos ratos controle quando comparada a dos tratados, em todos os períodos estudados. Este fato sugere uma diminuição de peso glandular nos animais tratados, provocado pela vitamina A.

Histologicamente as glândulas lacrimais dos animais cujas mães receberam vitamina A no 10º dia de gestação mostraram-se com desenvolvimento de arquitetura mais precoce e alterações estruturais que oscilavam entre períodos de normalidade e períodos de desorganização. Aos 5 dias de vida nos animais tratados, pôde-se observar um aspecto arquitetônico bastante definido, diferentemente dos controles, que só passaram a apresentar este aspecto aos 10 dias de vida. Os núcleos das células acinares apresentaram-se, no início do experimento, um pouco menores que os controles, passando em seguida por um período de normalidade em relação ao tamanho e diminuindo de tamanho, gradativamente, até o final do experimento. Os ácinos também apresentaram uma diminuição de tamanho gradativo, com um ligeiro aumento da luz acinar após o 10º dia de vida. O tecido intersticial mostrou-se mais espesso no início do experimento, diminuindo de espessura à medida que se aproximava do final. Estas observações sugeriram que a vitamina A provocou, no início do experimento, uma hiperatividade glandular, a

qual foi seguida por um período de estase . (Figuras 2 e 3).

Os nossos resultados morfométricos confirmaram os achados histológicos, uma vez que os resultados obtidos com a técnica de CHALKLEY (1943) revelaram que a vitamina A provocou um pequeno aumento citoplasmático e da luz acinar, voltando aos valores normais no final do experimento, sendo que o inverso ocorreu com o tecido intersticial (Tabelas 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 e 24 e Figuras 4, 5, 6, 7, 8 e 9).

Assim observou-se que, apesar das glândulas dos animais tratados serem menores do que as dos animais controle, sugerindo uma menor quantidade de parênquima estroma , uma maior atividade glandular nos períodos iniciais do experimento foi observada, retornando à atividade normal no final do experimento. Uma explicação razoável que esclarece a diminuição do parênquima desta glândula poderia ser considerada como resultante da ação direta da vitamina A nas membranas das células epiteliais embrionárias, responsáveis pela formação da glândula lacrimal durante o desenvolvimento intra-uterino, pois a análise histológica mostrou um menor número de figuras de mitose nos animais tratados, o que certamente ocorreu pela degeneração de um grande número daquelas células. Existem evidências de que a vitamina A, em excesso, causa um aumento da permeabilidade das membranas da célula, incluindo as organelas - (FELL & cols., 1962). O aumento da permeabilidade da membrana lisossomal promove o seu rompimento, liberando enzimas digestivas hidrolíticas aí contidas, as quais destruiriam a célula (GLICK & KERR, 1968). Segundo APPELMANS & DE DUVE (1955) e

DINGLE (1961) a liberação das enzimas lisossomais depende, em muito, da concentração de vitamina A.

Sabe-se que a vitamina A é mobilizada do fígado e leva da aos tecidos por meio de um sistema de transporte altamente regulado. Este sistema envolve 2 proteínas plasmáticas: a proteína ligada ao retinol (RBP) e a pré-albumina. A vitamina A circula no plasma normalmente na forma de retinol, especialmente ligada a RBP que, por outro lado, forma um complexo proteína-proteína com a pré-albumina. Estas proteínas servem, então, para transportar a vitamina A do fígado para as membranas.

Os casos de alterações teciduais por ação da vitamina A parecem ocorrer "in vivo", somente quando o nível de vitamina A no organismo é tal, que o retinol começa a circular no plasma e atingir as membranas numa outra forma que aquela ligada à RBP. MALLIA & cols. (1975), estudando ratos submetidos a doses excessivas de vitamina A, verificaram que o nível de RBP estava reduzido significativamente e que a maior parte da vitamina A circulava no plasma, como esteroides do retinol, associado a lipoproteínas de pequena densidade. Desta maneira, a liberação desregulada e não específica de vitamina A até os tecidos levaria à toxicidade. Tais fatos receberam apoio no estudo sobre transporte de vitamina A em humanos, realizado por SMITH & GOODMAN (1976).

Uma outra atuação da vitamina A sobre as células glandulares embrionárias seria a de maneira indireta, mediada pela adrenal materna, pois sabe-se que a vitamina A atua direta

mente na função desta glândula (SEAYE, 1958). Além disso, há uma relação entre a permeabilidade da membrana e os hormônios da glândula. A vitamina A, introduzida no organismo, provocaria então, um aumento da permeabilidade da membrana da célula e das organelas (DINGLE & LUCY, 1965) e exerceria sua ação nos tecidos da glândula adrenal (MATHUR & cols., 1973 ; MISRA & SRIVASTAVA, 1974). Tendo em vista que a vitamina A afeta a estabilidade estrutural dos lisossomos (DINGLE, 1961; FELL & DINGLE, 1963; ROELS & cols., 1969) e que os corticosteróides, por outro lado, protegem os lisossomos de desintegração (FELL & THOMAS, 1961) e que a vitamina A provoca hipertrofia e hiperfunção da adrenal mediada pela hipófise, RAM & MISRA (1975) admitiram que nos casos de estimulação máxima da adrenal pela vitamina A, a síntese e liberação de corticosteróides também deveriam ser máximas, vindo assim, proteger as membranas dos lisossomos da ação direta da vitamina A. Entretanto, a estimulação pela vitamina A, quer pela administração prolongada no rato adulto, quer pela administração de doses excessivas através do leite no rato em lactação, provoca uma diminuição nos níveis de colesterol e de ácido ascórbico na glândula adrenal, e sabe-se que o ácido ascórbico inibe a ruptura da cadeia do colesterol, influenciando, consequentemente, a gênese dos esteróides. Quando essa hiperatividade da adrenal não fosse proporcional às concentrações séricas de vitamina A, haveria diminuição na síntese e na liberação de adrenocorticóide, resultando na desintegração dos lisossomos e desencadeando, portanto, processo degenerativo nas

células responsáveis pela formação da glândula lacrimal.

Com o emprego da cariometria, os núcleos das células secretoras foram avaliados morfológicamente, quando se observou que os volumes nucleares nos ratos tratados eram menores que os dos controles na maioria dos períodos experimentais - (Figuras 10, 11, 12, 13, 14 e 15). Esta diminuição do volume nuclear poderia ser responsável pelo período de estase observado na glândula no final do experimento, pois ocorreria menor síntese de RNA mensageiro, bem como de enzimas e, consequentemente, de outras substâncias produzidas pela glândula. Este fato também explicaria o menor peso dessas glândulas nestes períodos finais de estudo, sugerindo, portanto, estase e início de exaustão glandular. É interessante ressaltar que estes achados foram exatamente o oposto dos achados de COSTA & cols. (1979), quando se estudaram volumes nucleares da glândula lacrimal de ratos adultos, onde foi observada a ocorrência de uma população nuclear de tamanho extremamente variável, de vários graus de ploidia.

O comportamento diferente da glândula lacrimal frente ao excesso de vitamina A em relação ao de outras glândulas como as salivares e da glândula de Harder (REGESI e ROWE, 1972; LOPES & cols., 1973; LOPES & cols., 1974; PETENUSCI e cols., 1976; BUONAROTT & cols., 1977; LOPES & cols., 1978; LOPES & cols., 1979; LOPES & cols., 1980; LOPES & cols., 1981; COSTA & cols., 1978; ROCHA, 1987), poderia basear-se também na correlação entre as alterações das membranas celulares e das organelas (controladas pela adrenal) com outros hormônios que

interferem na estrutura e funcionamento desta glândula. Assim é que, a hipervitaminose A provoca, em ratos, a liberação de LH pela hipófise e ACTH pela adrenal. Estes hormônios, segundo EBLING & cols. (1975) estimulam o desenvolvimento e funcionamento da glândula lacrimal. Este fato explicaria, de uma maneira razoável, o não aparecimento de degeneração celular nesta glândula frente a vitamina A, como acontece com outras glândulas exócrinas. Para melhor conhecimento do efeito de vitamina A nessa glândula, seriam necessários estudos posteriores a nível de microscopia eletrônica, que verificassem uma possível proliferação do retículo endoplasmático rugoso e do complexo de Golgi, o que justificaria a maior atividade da glândula; estudos que verificassem se o tempo de ação da vitamina A foi insuficiente para causar possíveis danos celulares irreversíveis como degenerações e hiperplasia fibrosa e, finalmente, estudos bioquímicos que analisassem o produto de secreção desta glândula.

5. CONCLUSÕES

As glândulas lacrimais extra orbitárias de ratos cujas mães receberam 30.000 UI de Vitamina A no décimo dia de gestação e dos seus controles, foram estudadas histológica e morfometricamente, o que permitiu ao autor as seguintes conclusões:

1. O peso corporal dos animais controle e tratados foi semelhante nos animais sacrificados até o 15º dia de vida, sendo que os tratados mostraram, em alguns períodos, variações mínimas, sem importância significativa. Já nos animais sacrificados no 20º e 25º dias de vida, o peso corporal dos tratados passou a ser maior que o dos controles.
2. O peso glandular dos animais controle e tratados, em todos os períodos estudados, foi maior nos controles quando comparado ao dos tratados.
3. A análise histológica demonstrou que as glândulas lacrimais extra orbitárias dos animais tratados apresentaram um desenvolvimento de arquitetura mais precoce. Os ácinos apresentaram-se, no final do experimento, com menor altura celular e núcleos também ligeiramente menores. O mesmo fato foi observado com relação à espessura dos septos fibrosos e da área da luz acinar.

4. Os achados morfométricos confirmaram os resultados histológicos, pela aplicação da técnica de CHALKLEY (1943), a qual demonstrou que a vitamina A provocou um pequeno aumento citoplasmático e da luz acinar, voltando aos valores normais no final do experimento, sendo que o inverso ocorreu com o tecido intersticial.

5. Os estudos morfométricos evidenciaram um volume nuclear menor nos animais tratados que o observado nos controles, na maioria dos períodos experimentais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLUWALIA, B. & BIERI, J.G. Effect of exogenous hormones on the male reproductive organs of Vitamin A- deficient rats. J. Nutr.; 100: 715-724. 1970.
- AHLUWALIA, B. & BIERI, J.G. Local stimulatory effect of Vitamin A on spermatogenesis in the rat. J. Nutr.; 101 141-152, 1971.
- AHUJA, H.C. & MISRA, U.R., 1973: Apud RAM, G.C. & MISRA, U. R. In: Studies on mode of action of Vitamin A. Internat. I. Vit. Nutr. Res.; 45: 3-19, 1975.
- APPELMANS, F. & DE DUVE, C. Further observations on the binding of acid phosphatase by rat liver particles. Biochem. J., 59:426.433. 1955.
- BAQUICHE, M. Le dimorphisme sexuel de la glande de LOWENTHAL chez le rat albinos. Acta anat. 36: 247, 1959.
- BISWAS, N:M. & DEB, C. Testicular degeneration in rats during hypervitaminosis A. Endokrinologie, 49: 64-69, 1965.
- BISWAS, N.M. & MUKHERJI, M. Effects of excess vitamin A on pituitary gonadal axis in rats. Anat. Anz., 123:337 1968.
- BROOKSBANK, B.W.L.; WILSON, D.A.A. & CLOUCH, G. The in vivo uptake of [³H] androsta-4,16-dien-3-one in tissues of the adult male rat. J. Endocr., 57:297, 1973.
- BUONAROTT, I.; BIRMAN, E.G.; LOPES, R.A. & AZOUBEL, R. Estudo morfológico de glândulas salivares, esôfago, duodeno e intestino grosso de ratos submetidos à hipervitaminose A crônica. Rev. Fac. Farm. Odont. Ribeirão Preto, 14: 73-79, 1977.

- CAVALLERO, C. The influence of various steroids on the Loe_wenthal lachrymal glands of the rat. Acta Endocr. Suppl., 51:861, 1960.
- CHALKLEY, H.W. Method for the quantitative morphologic analysis of tissues. J. Nat. Cancer Inst., 4: 47, 1943.
- COHLAN, S.Q. Excessive intake of vitamin A as a cause of congenital anomalies in the rat. Science, 117:535-536, 1953.
- COHLAN, S.Q. Congenital anomalies in the rat produced by the excessive intake of vitamin A during pregnancy. Pediatrics, 13: 556-557, 1954.
- COSTA, J.R.V.; IUCIF, S. & LOPES, R.A. Effect of hypervitaminosis A on the Harderian gland in rats. A morphologic and morphometric study. Internat. J. Vit. Nutr. Res. ; 48: 113-122, 1978.
- COSTA, J.R.V.; IUCIF, S. & LOPES, R.A. Efeitos da hipervitaminose A na glândula lacrimal extra-orbitária do rato. Estudo morfológico e morfométrico. Cien. cult., 31: 189-196, 1979.
- COSTA, J.R.V. da & DIAS COSTA, A.M.D. Comunicação pessoal; 1984.
- DANIEL, M.R.; DINGLE, J.T.; GLAUERT, A.M. & LUCY, J.A. The action of excess vitamin A alcohol on the fine structure of rat dermal fibroblasts. J. Cell. Biol., 30:465-475, 1966.
- DEUSCHLE, F.M.; GEIGA, J.F.; WARKANY, J. Analysis of an anomalous oculodentofacial pattern in newborn rats produced by maternal hypervitaminosis A. J. Dental. Res. 38:

149-155, 1959.

- DIAS COSTA, A.M. O estudo do miocárdio ventricular de ratos cujas mães foram injetadas com palmitato de vitamina A, no décimo dia de gestação. Tese. Fac. Odontologia - Piracicaba. UNICAMP, 1985.
- DINGLE, J.T.; LUCY, J.A. & FELL, H.B. Effect of excess of vitamin A on the metabolism and composition of embryonic chick-limb cartilage grown in organ culture. Biochem. J., 79: 497-499, 1961.
- DINGLE, J.T. Studies on the mode of action of excess of vitamin A. III. Release of a bound protease by the action of vitamin A. Biochem. J., 79: 509, 1961.
- DINGLE, J.T. Release of a bound protease by the action of vitamin A. Biochem. J., 79: 509-512, 1961.
- DINGLE, J.T.; LUCY, J.A. The effect of vitamin A on the stability of the erythrocyte membrane. Biochem. J., 84: 611-620, 1962.
- DINGLE, J.T. & LUCY, J.A. Membrane phenomenon in relation to vitamin A. Proc. Nutr. Soc., 24: 170, 1965.
- EBLING, F.J.; EBLING, E.; RANDALL, V. & SKINNER, J. The effect of hypophysectomy and of bovine hormonal growth on the responses to testosterone of prostate, preputial, harderian and lachrymal glands and of brown adipose tissue in the rat. J. Endocr., 66: 401. 1975.
- FELL, H.B. & THOMAS, L. Comparison of the effects of papain and vitamin A on cartilage. II. The effects on organ cultures of embryonic skeletal tissue. J. Exper. Med., 111 : 719-744, 1960.

- FELL, H.B. & THOMAS, L. The influence of hydrocortisone on the action of excess vitamin A on limb-bone rudiments in culture. J. Exper. Med., 114:343-462, 1961.
- FELL, H.B.; DINGLE, J.T. & WEBB, M. The specificity of the effect on embryonic chick-limb cartilage in culture and on isolated rat liver lysosomes. Biochem. J., 83: 63 - 69, 1962.
- FELL, H.B. & DINGLE, J.T. Studies on the mode of action of excess of vitamin A. I. Lysosomal protease and degradation of cartilage matrix. Biochem. J. 87: 403-408, 1963
- FELLINGER, K. & HOCHSTÄDT; O. Ueber die antithyreoidale Wirkung des vitamins A. Wien. Klin. Wschr., 49: 1339-1340, 1934.
- GLAUERT, A.M.; DANIEL, M.R.; LUCY, J.A. & DINGLE, J.T. Changes in the fine structure of erythrocytes during haemolysis by vitamin A. J. Cell. Biol., 17:111-121, 1963 .
- GIROUD, A. & MARTINET, M. Malformations embryonnaires par hypervitaminose A. Arch. Fr. Pédiatr., 12: 292-300, 1955.
- GIROUD, A. & MARTINET, M. Hypovitaminose A et hypervitaminose A chez le jeune et chez l'embryon. Centre Int. l'Enfance, 2: 55-68, 1956.
- GIROUD, A.; MARTINET, M.; ROUX, C. Urétéro- hydronephrose expérimentale chez l'embryon par hypervitaminose A. Arch. Frand. Pédiat., 15: 540-552, 1958.
- GIROUD, A.; MARTINET, M.; ROUX, C. Considérations a propos des hydronephroses par hypervitaminose A chez l'embryon de rat. Arch. Anat. Pathol., 7: 113-120, 1959.

- GIROUD, A. Période tératogène et son importance. IN CONGRESS DE L'UNION THERAPEUTIQUE INTERNACIONALE, 8^o Bruxelles, 26-28 de setembro, p. 15-21, 1963.
- GIROUD, A. Nutrition of the embryo Fed. Proc., 27 (1): 163-184, 1968.
- GLICK, D. & KERR, W.J. Effect of vitamin A "in vitro" on histamine release and structure of mast cells. Exper. Cell. Res., 53: 129-134, 1968.
- HALE, F. The relation of Vitamin A to anophthalmos in pigs. Amer. J. Ophthalm., 18: 1087, 1935.
- JANOFF, A. & McCLUSKEY, R.T. Effect of excess vitamin A on acid-phosphatase content of guinea pig peritoneal leukocytes. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 110: 586-589, 1962.
- KALTER, H. & DEUSCHLE, M.F. Congenital malformations experimentally induced by hypervitaminosis A. Ohio, American Association for the Advancement of Science, p.273-292, 1966.
- KNUDSEN, P.A. Congenital malformations of upper incisors in exencephalic mouse embryos, induced by hypervitaminosis A. Acta. Odont. Scand. 23(4): 391-409, 1965.
- KNUDSEN, P.A. congenital malformations of lower incisors and molars in exencephalic mouse embryos, induced by hypervitaminosis A. Acta. Odont. Scand., 24(1): 55-71, 1966.
- LAMANO CARVALHO, T.L.; LOPES, R.A.; AZOUBEL, R & FERREIRA, A.L. Morphometric study of testicle alterations in rats submitted to hypervitaminosis A. Internat. J. Vit. Nutr Res., 1978.

- LOGARAS, G. & DRUMMOND, J.C. Vitamin A and the Thyroid. Bi
ochem. J., 32: 964-968, 1938.
- LOPES, R.A., MAIA CAMPOS, G.; VALERI, V.; IUCIF, S. & AZOU
BEL, R. Morphologic effects of hypervitaminosis A on pos
terior lingual salivary glands of the rat. Rev. Fac. Farm
Odont. Ribeirão Preto. 10: 23-30, 1973.
- LOPES, R.A.; VALERI, V.; IUCIF, S.; AZOUBEL, R. & MAIA CAM
POS, G. Effect of hypervitaminosis A on the tests of
the rat during lactation. Internat. J. Vit. Nutr. Res.,
44: 159-166, 1974.
- LOPES, R.A.; AZOUBEL, R.; VALERI, V.; IUCIF, S. & GOSUEN,
L.C. Morphologic effects of hypervitaminosis A on rat
sublingual glands. J. Dent. Res., 53: 757, 1974.
- LOPES, R.A.; COSTA, J.V.R.; MAIA CAMPOS, G.; PICCOLO, A.M.
& PETENUSCI, S.O. Estudo morfométrico dos efeitos da hi
pervitaminose A na glândula salivar lingual posterior -
(de von EBNER) do rato. Rev. Fac. Farm. Odont. Ribeirão
Preto, 15: 79-86, 1978.
- LOPES, R.A.; PICCOLO, A.M.; PETENUSCI, S.O.; COSTA, J.V.R.
& MAIA CAMPOS, A.M. Effect of hypervitaminosis A on ton
gue muscles of the rat. A morphometric study. Internat-
J. Vit. Nutr. Res., 49: 235-239, 1979.
- LOPES, R.A.; COSTA, J.R.V.; MAIA CAMPOS, G.; PICCOLO, A.M.
& PETENUSCI, S.O. Estudo morfométrico da reversibilida
de das alterações da glândula submandibular do rato sub
metido à hipervitaminose A. Rev. Fac. Farm. Odont. Ri -
beirão Preto, 16: 97-109, 1979.
- LOPES, R.A.; COSTA, J.R.V.; MAIA CAMPOS, G.; PETENUSCI, S.
O. & PICCOLO, A.M. Morphometric study of the effects of

- hypervitaminosis A on the sublingual gland of the rat . Arch. Latinoamer. Nutr., 30: 210-222, 1980.
- LOPES, R.A.; COSTA, J.R.V.; PICCOLO, A.M.; MAIA CAMPOS, G. & PETENUSCI, S.O. Estudo da reversibilidade das alterações presentes da glândula de WEBER do rato submetido à hipervitaminose A. Rev. Esc. Farm. Odont. Alfenas. 3:7-16, 1980.
- LOPES, R.A.; PICCOLO, A.M.; COSTA, J.R.V.; MAIA CAMPOS, G. & PETENUSCI, S.O. Estudo morfométrico dos efeitos da hipervitaminose A na glândula submandibular do rato. Cien. cult., 32: 926-931, 1980.
- LOPES, R.A.; MAIA CAMPOS, G.; PICCOLO, A.M.; COSTA, J.R.V. & PETENUSCI, S.O. Estudo morfométrico da reversibilidade das alterações da glândula sublingual de ratos submetidos à hipervitaminose A. Rev. Fac. Farm. Odont. Ribeirão Preto, 18: 11-20, 1981.
- LOPES, R.A.; PETENUSCI, S.O.; COSTA, J.R.V.; PICCOLO, A.M. & MAIA CAMPOS, G. Estudo morfométrico da reversibilidade das alterações das glândulas palatinas de ratos submetidos à hipervitaminose A. MEMÓRIA, 2: 31-38, 1982.
- LUCY, J.A.; LUSCOMBE, B.C. & DINGLE, J.T. Mitochondrial swelling. Biochem. J.; 89:419-425, 1963.
- MALLIA, A.K.; SMITH, J.E.; GOODMAN, D.S. Metabolism of retinol binding protein and vitamin A during hypervitaminosis A in the rat. J. Lipid. Res. 16:180, 1975.
- MARIN-PADILHA, M. & FERM, V.H. Somite necrosis and developmental malformations induced by vitamin A in the golden hamster. J. Embryol. Exper. Morphol., 13:1-8, 1965.

- MARIN-PADILHA, M. Mesodermal alterations induced by hypervitaminosis A. J. Embryol. Exper. Morphol., 15: 261-269 1966.
- MATHUR, A.R.; RAMANATHAN, R. & MISRA, V.K. Effects of feeding excess of vitamin A and vitamin C on liver, plasma and adrenal lipids of rats. Internat. J. Vit. Nutr. Res. 44: 19-25, 1973.
- MODIS, L.; SPREGA, A.; SUVEGES-MODIS, J. & CONTI, G. Recherches histochimiques et biochimiques sur des rats en hyperet.hypovitaminose A. Acta. anat., 83: 481-504. 1972
- MISRA, V.K. & SRIVASTAVA, N. Stimulation of cholesterologenesis by ascorbic acid in adrenal of rats fed vitamin A. Internat. J. Vit. Nutr. Res., 44: 230-233, 1974.
- MORRIS, G.M. & STEELE, G.E. The effect of excess vitamin A on the development of rat embryos in culture. J. Embryol. Exp. Morphol. 32: 505, 1974.
- NATANSON, A.O.; MITASHOVA, N.I. & CHUVAEV, A.V. Role of hypophysis in development of adrenal hypertrophy in rats with hypervitaminosis A. Fed. Proc. (Transl. Supp.) 25: 59-62, 1966.
- NOWELL, N.W. & CHESTER-JONES, I. Some aspects of the storage and secretion of corticotrophin and gonadotrophins. Acta. Endocr. 26: 273-285. 1957.
- PETENUSCI, S.O.; LOPES, R.A.; SILVA NETTO, C.R. & MAIA CAMPOS, G. Contribuição ao estudo dos efeitos da hipervitaminose A nas glândulas salivares e adrenal do rato. Rev. Fac. Farm. Odont. Ribeirão Preto, 13:35-40, 1976.
- PICCOLO, A.M.; LOPES, R.A. & PETENUSCI, S.O. Efeitos da

hipervitaminose A nas glândulas salivares do cobaio. Biológica. Ribeirão Preto, 3: 7-11, 1977.

PICCOLO, A.M.; LOPES, R.A.; PETENUSCI, S.O.; COSTA, J.R.V. & MAIA CAMPOS, M.C. Efeitos da hipervitaminose A na porção serosa da glândula nasal lateral do rato. Biológica Ribeirão Preto, 4: 3-11, 1978.

RAM, G.C. & MISRA, V.K. Effects of vitamin A and phenobarbital on liver endoplasmic reticulum of rats. Internat. J. Vit. Nutr. Res., 44: 391, 1974.

RAM, G.C. & MISRA, V.K. Studies on mode of action of vitamin A. Internat. J. Vit. Nutr. Res. 45: 3-19, 1975.

REGESI, J.A. & ROWE, N.H. Morphologic effects of hypervitaminosis A on rat submandibular gland. Archs. Oral. Biol 17: 1609-1618, 1972.

ROCHA, W. Estudo morfométrico e Histopatológico dos efeitos da hipervitaminose A, na glândula de HARDER de ratos, durante a lactação. Tese. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1987.

RODRIGUES, M.A. Estudo cariométrico do córtex da glândula supra-renal (adrenal) de ratos, cujas mães receberam injeções de Palmitato de Vitamina A no décimo dia de gestação. Em publicação. 1987.

ROELS, O.A.; ANDERSON, O.R.; LUI, N.S.T.; SHAN, D.O. & TROUT, M.E. Vitamin A and membranes. Amer. J. Clin. Nutr 22: 1020, 1969.

ROSA, R.; GRIECO, M:L. & NICOLAU, J. The effect of hypervitaminosis A on the sialic acid and hexosamina contents

- of the salivary glands of rats, Internat. J. Vit. Nutr. 46: 369-372, 1976.
- ROUX, C.; FOURNIER, P. DUPUIS, Y. & DUPUIS, R. Carence t era tog ene en vitamin A. Biol. N onat., 4: 371-8, 1962.
- SADHU, D.P. & BRODY, S. Excess vitamin A ingestion, thyroid size and energy metabolism. Amer. J. Physiol., 149: 400-403, 1947.
- SADHU, D.P. & TRUSCOTT, B.L. Hypervitaminosis A and the distribution of body iodine. Endocrinology, 43: 120-123, 1948.
- SADHU, D.P. Vitamin A iodine and thyrotrophic hormone content of the anterior pituitary. Amer. J. Physiol., 152: 263-266, 1948.
- SAFFRAN, M. Mechanism of adrenocortical control. Brit. Med Bull. 18: 122-126, 1962.
- SELYE, H. Sensitization of the skeleton to vitamin A overdosage by cortisol. Arthritis Rheum, 1: 87, 1958.
- SHERWOOD, T.C.; TOOTH, L.A. & CARR, K. Effects of cod-liver oil on basal metabolism and on thyroid gland. Endocrinology. 18: 254-255, 1934.
- SHICHIJO, K. & SHINODA, S. Effect of fat-soluble vitamin on thyroid function. Folia Endocr. Jap. 37: 100, 1962.
- SIEGEL, S. Nonparametric Statistics for the behavioral. Science, N. York, Mc Graw-Hill, 1956.
- SILVA NETTO, C.R.; PETENUSCI, S.O.; LOPES, R.A.; MAIA CAM-

- POS, G. & NONAKA, K.O. Determinação do ácido ascórbico na adrenal de ratos submetidos à hipervitaminose. Rev. Fac. Farm. Odont. Ribeirão Preto. 12: 67-74. 1975.
- SMITH, F.R. & GOODMAN, D.S. Vitamin A transport in human vitamin A toxicity. N. Engl. J. Med., 294: 805, 1976.
- STUDER A., ZBINDEN, G. & UEHLIGER, E. 1962. Apud NATANSON, A.D.; MITASHOVA, N.I. & CHUVAEV, A.V. In: Role of hypophysis in development of adrenal hypertrophy in rats with hypervitaminosis A. Fed. Proc. Transl. Suppl. 25: 59-62 1966.
- TAKEHKOSHI, S. The mechanism of vitamin A induced teratogenesis. J. Embryol. Exp. Morphol. 12: 263, 1964.
- THOMAS, L.; McCLUSKEY, R.T.; POTTER, J.L. & WEISSMANN, G. Comparison of the effects of papain and vitamin A on cartilage. J. Exper. Med., 11: 705-717, 1960.
- UOTILA, U. Uber die Schilddrüsenveränderungen bei A-, B-, C- and D-Avitaminosen. Virschows Arch. Path. Anat., 301 535-546, 1938.
- VALERI, V.; CRUZ, A.R.; BRANDÃO, J.H.S. & LISON, L.A. Relationship between cell nuclear volume and deoxyribonucleic acid of cell of normal epithelium of carcinoma in situ and of invasive carcinoma of the uterine cervix. Acta Cytol., 11: 488-496, 1967.
- WEISSMANN, G.; UHR, J.W. & THOMAS, L. Acute hypervitaminosis A in guinea pigs. Effects on acid hydrolases. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 112: 284-281, 1963.
- WILSON, J.G. & WARKANY, J. Malformations in the genito-urinary tract induced by maternal vitamin A deficiency in

the rat. Amer. J. Anat., 83: 357-408, 1948.

YOUNG, D.L.; POWELL, G.; McMILLAN, W.O. Phenobarbital-induced alterations in phosphatidylcholine and triglyceride synthesis in hepatic endoplasmatic reticulum. J. Lipid. Res. 12: 1-8, 1971.