

ANA MARIA DUARTE DIAS COSTA

ESTUDO DO MIOCÁRDIO VENTRICULAR DE RATOS,
CUJAS MÃES FORAM INJETADAS COM PALMITATO
DE VITAMINA A, NO DÉCIMO DIA DE GESTAÇÃO

*Tese devidamente
corrigida de corr.
fornida com a
Resolução CCFB/036/83
Piracicaba, 31/01/86*

Tese apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba -
UNICAMP, para obtenção do
grau de Doutor em Odontologia.
Área de concentração: Farma-
cologia.

PIRACICABA - 1985

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Ao meu pai (in memorian) e minha mãe,
que me ensinaram a cumprir sempre o dever
com retidão e devotamento;

Ao meu marido, José Ronaldo,
pelo apoio, estímulo e compreensão;

Às minhas filhas, Rosane e Marina,
pela compensação de todo meu esfor
ço,

dedico este trabalho.

Agradeço, de modo muito especial,

ao Prof. Dr. José Renan Vieira da Cos
ta, verdadeiro pesquisador, que sempre
lutou para elevar no meio científico
o nome de nossa Escola, por ter parti
cipado ativamente deste Trabalho com
segurança e capacidade admiráveis ,
bem como pela amizade e interesse de-
monstrado no decorrer do mesmo.

Agradeço

ao Prof.Dr. Samir Tufic Arbex, pelo apoio e incentivo, bem como pela amizade e atenção com que sempre nos distinguiu.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração do presente Trabalho e de modo especial:
- Ao Professor Doutor Amado Leonísio de Azevedo, pelo apoio e confiança que sempre nos gratificou.
- À Senhorita Leonilda Stanziola, pela cooperação prestada na coleta e processamento do material.
- À Professora Fátima de Souza, pela confecção dos gráficos.
- Ao Professor José Sebastião Martins, pela colaboração na execução da análise estatística do referente Trabalho.
- Ao Departamento de Morfologia da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, pela oportunidade que nos ofereceu para a realização deste Trabalho em suas dependências, bem como pelo incentivo dispensado durante o mesmo.
- Ao Departamento de Ciências Fisiológicas da FOP na pessoa do Prof. Dr. Antônio Carlos Néder, pelos ensinamentos recebidos e o convívio amigo no decorrer do nosso curso de Pós-Graduação.
- Ao Professor Maciro Manoel Pereira, Chefe do Departamento de Clínica e Cirurgia da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, pela amizade e constante estímulo aos integrantes de seu Departamento.

- Agradeço à Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP - através de seu digníssimo Diretor, Doutor Luiz Valdrighi, pela oportunidade que nos ofereceu para a realização do pós-graduação, bem como à Universidade Estadual de Campinas, através de seu Magnífico Reitor Doutor José Aristodemo Pinotti, pelo incentivo dispensado aos que se dedicam ao ensino e à pesquisa.
- À Bacharela em Direito, Sra. Ângela Ap. Reis e Me-deiros, pelos trabalhos datilográficos e revisão gramatical.
- Ao Sr. Carlos Bernardes Pereira, pelo zelo com os animais utilizados no presente experimento.
- Agradeço à Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, através de seu digníssimo Diretor Prof. Vínio Barbosa Tamburini, pelo apoio de sempre.

I N D I C E

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Efeitos da Vitamina A nos Tecidos	3
1.2. Interação Vitamina A e Membranas Celulares	7
1.3. Interação Vitamina A e Adrenal	8
1.4. Vitamina A e Coração	9
1.5. Proposição	10
2. MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1. Material	12
2.2. Técnica de Determinação do Período de Gravidez.	13
2.3. Técnica de Dissecção e Pesagem	13
2.4. Técnicas Histológicas	14
2.5. Técnicas Morfométricas	14
2.5.1. Técnica de CHALKLEY	14
2.5.2. Cariometria	15
2.6. Técnicas Estatísticas	17
2.6.1. Teste da Mediana	17
3. RESULTADOS	19
3.1. Resultados Morfológicos	20
3.1.1. Peso Corporal e Ventricular	20
3.1.2. Resultados Histológicos	33
3.2. Resultados Morfométricos	37
3.2.1. Técnica da CHALKLEY	37
3.2.2. Cariometria	52
4. DISCUSSÃO	69
5. CONCLUSÕES	77
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

1. INTRODUÇÃO

VITAMINA A - Considerações gerais

A descoberta da vitamina A deve-se a trabalhos de diversos pesquisadores isoladamente como HOPKINS (1912), McCOLLUM & DAVIS (1913) e OSBORNE & MENDEL (1914). Estes autores estudando o crescimento de ratos com dietas purificadas, verificaram que a suplementação das rações com leite ou diversas fontes de gordura levava a uma sensível melhora, tanto no crescimento como, nas lesões oculares destes. Estes mesmos autores tentaram a extração etérea destes alimentos e chegaram a uma substância que foi denominada "A lipossolúvel", por McCOLLUM & DAVIS (1913).

A vitamina A ocorre em tecidos animais, porém muitos vegetais contêm substâncias com atividade de vitamina A e STEENBOCK (1919) após várias observações, postulou que a atividade de vitamina A era originada por pigmentos amarelos carotenóides.

Segundo WEST & cols. (1969), o ca

roteno é uma molécula simétrica, que possui dois anéis de β-ionona ligados por uma cadeia carbônica. As substâncias que apresentam estes dois anéis ou um dos dois são compostos precursores de vitamina A. As substâncias do grupo da vitamina A, ou seja, que apresentam atividade de vitamina A, são todo-trans vitamina A, sendo designadas atualmente como "todo-transretinol", e da mesma maneira são nomeados os seus derivados, sendo que o termo vitamina A ainda continua a ser utilizado para todos os compostos desse grupo, bem como compostos de estrutura ainda não determinada, mas que possuem a atividade biológica do retinol (GANGULY, 1967).

A vitamina A está intimamente associada tanto a lipídios quanto à proteínas, particularmente às lipoproteínas (MALLIA & cols., 1975), sendo estas lipoproteínas importantíssimas no transporte da vitamina A no plasma sanguíneo circulante.

1.1. EFEITOS DA VITAMINA A NOS TECIDOS

Os efeitos da deficiência de vitamina A (MOORE 1957, 1964) e da hipervitaminose A (RODAHL, 1950; MOORE, 1957) foram intensamente estudados nos tecidos. MOORE (1957, 1964, 1965) enumerou uma série de anormalidades observadas em um ou outro dos seguintes animais: rato, coelho, cão, boi, galinha, macaco e homem, no transcorrer de uma avitaminose A. Essas anormalidades seriam representadas por adaptação de feitiosa ao escuro, deficiência de crescimento, ceratinização das membranas mucosas, xeroftalmia, infecção secundária, falha na modelação óssea, com a produção de osso espesso e sem função em lugar de um osso mais fino, lesões nervosas, aumento da pressão do fluido cerebro-espinhal desenvolvida independentemente ou asso-

ciada com os ossos deformados do crânio, hidrocefalia, anormalidades na reprodução do testículo e aborto, doenças da pele e morte.

As lesões resultantes da administração de doses elevadas de vitamina A, estudadas por MOORE (1957, 1965), incluem: anormalidades na pele, aumento da pressão do fluido cérebro espinhal, náuseas, vômitos e anormalidades ósseas no homem, fratura óssea, hemorragia interna profusa e fatal, deficiência secundária de vitamina K, mal formações congênitas fraqueza muscular, perda de pelo, edema das pálpebras, curvatura pronunciada da coluna vertebral, fraturas espontâneas e parada de crescimento no rato.

Condições de hipervitaminose A, em ratos adultos, foi observada, quando da administração oral de doses maciças de biosterina (um concentrado isolado de óleo de fígado de bacalhau) por MOORE & WANG, 1945. As mais características lesões ocorridas foram fraturas no esqueleto, sendo mais constantes nos animais jovens, e também hemorragias internas e externas com lesões superficiais, em forma de crateras, as quais se assemelham as que ocorrem em humanos atacados de escorbuto.

Foi também observado que o esqueleto de animais que receberam excesso de concentrado de óleo de fígado de bacalhau tornavam-se tão frágeis que os animais sofriam fraturas espontâneas dos membros posteriores e anteriores, verificando-se em alguns casos, que as extremidades daquelas fraturas anquilosavam formando calos ósseos grandes e irregulares (DAVIES & MOORE, 1934).

RODAHL & MOORE (1943) observaram que ratos submetidos a uma hipervitaminose A, algumas vezes morriam devido a intensa hemorragia interna.

MOORE & WANG (1945) constataram hemorragias uterinas em ratas grávidas, quando da administração, em excesso de óleo de fígado de bacalhau ou de acetado de vitamina A.

O efeito do excesso de vitamina A sobre a epiderme ocasiona metaplasia e foi estudada in vitro por FELL & MELLANBY (1953), WEISS & JAMES (1955) e in vivo por LAWRENCE & BERN (1960, 1963) e HARDY (1968).

Quando da aplicação de vitamina A na epiderme, observou-se aumento acentuado da espessura de toda a epiderme, hiperplasia, hipertrofia, além de um aumento na atividade mitótica, tanto no rato (SABELLA & cols., 1951; BERN & cols., 1955), no camundongo (LAWRENCE & BERN, 1958) como no hamster (LAWRENCE & cols., 1960). Quando aplicada diretamente na vagina de ratas, verificou-se inibição da corneificação do epitélio vaginal (KAHN, 1954).

FRANQUIN & cols. (1969), estudando o efeito da hipervitaminose A sobre o epitélio gengival de ratos, constataram redução marcante na camada córnea, aumento dos grânulos cerato-hialinos e espessamento da membrana basal.

Com relação a testículos frente a hipervitaminose A, podemos citar os trabalhos de MADDOCK & cols. (1953), em ratos recém-desmamados e de LAMANO CARVALHO (1977) em ratos jovens, os quais mostraram uma degeneração testicular frente ao excesso de vitamina A.

Alterações renais induzidas pela hipervitaminose A, em embriões de ratos, foram descritas por KALTER & WARKANY (1960, 1961) e por LOPES (1973) durante a lactação. Estes autores observaram uma atrofia renal bem como das vias urinárias nesses animais.

Os efeitos da hipervitaminose A em glândulas foram bastante estudados por REGEZI & ROWE (1972) na glândula sub-mandibular do rato; LOPES (1978) em todas as glândulas salivares de ratos; COSTA & cols. (1978, 1979) nas glândulas de Harder e lacrimal respectivamente; PICCOLO & cols. (1978) na glândula nasal lateral do rato; LEMOS MOURA & cols. (1980) na glândula adrenal. Em todas essas glândulas observou-se uma atrofia e evidente com excessão da glândula lacrimal e adrenal nas quais foi observado uma hipertrofia e hiperfunção frente a hipervitaminose A.

O estudo de anomalias produzidas pela administração de doses relativamente grandes nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário de ratos foi realizado por KALTER & WARKANY (1961), os quais mostraram anomalias nesses animais como: alterações de pele, orelhas, olhos, face, boca, dentes, língua, timo, costelas, cérebro, coração, grandes vasos, circulação fetal, rins, bexiga, ductos genitais, reto, anus, cauda e membros. Alguns dos defeitos encontrados e até então ainda não relatados foram: incisivos superiores e inferiores supra-numerários, anquiloglossia lateral, ducto crânio-faringêio, timo cervical, aneurisma coronário, rim ectópico cruzado, fístula retro-vesical e ausência da artéria umbelical.

Quando da administração de doses não teratogênicas de vitamina A em ratas grávidas durante períodos críticos de desenvolvimento intra-uterino, alterações como exoftalmia, baixo peso, boca pe-

quena e muitas vezes ausente foram observadas por COSTA & DIAS COSTA (1984)

1.2. INTERAÇÃO VITAMINA A E MEMBRANAS CELULARES -

A vitamina A penetra entre os lipídios e as proteínas quando em nível adequado atuando como um agente de ligação entre os lipídios e as proteínas, estabilizando assim a estrutura da membrana. Desta forma, tanto o excesso como a falta de vitamina A causam problemas à estrutura normal das células.

A administração de doses excessivas de vitamina A no rato, camundongo, cobaio, coelho e galinha, provoca inicialmente um aumento de 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; LUCY & cols., 1961; FELL & cols., 1962; DINGLE & LUCY, 1962; JANOFF & McCRUSKEY, 1962; WEISSMANN & cols., 1963; GLAUERT & cols., 1963; LUCY & cols., 1963; DANIEL & cols., 1966; GLICK & KERR, 1968). Esses pesquisadores verificaram também que o rompimento das membranas provocava um aumento da atividade enzimática resultante 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) & DINGLE (1961), estudando células fracionadas do fígado de rato, verificaram que a liberação daquelas enzimas pelo lisossomo, 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 cul-

tura contendo vitamina A observaram alterações citológicas como o aumento da área de superfície da membrana plasmática e das membranas das organelas, vacúolos autofágicos e heterofágicos, 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 o 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. Esses autores puderam verificar que a proliferação rápida do retículo endoplasmático rugoso era aditiva e que a membrana desse retículo se comportava de um modo diferente das demais membranas celulares, frente a vitamina A.

1.3. INTERAÇÃO VITAMINA A E ADRENAL

O mecanismo de ação da vitamina A na produção de numerosas lesões tanto na hipó como na hipervitaminose A resulta não somente como consequência da ação direta da vitamina A nas membranas celulares, mas também da ação direta de fatores endócrinos, mais especificamente com relação a glândula adrenal.

AMES & cols. (1954), verificaram que ratos submetidos a hipervitaminose A apresentavam hipertrofia e hiperfunção da córtex da adrenal. Esses dados foram confirmados por TAKEKOSHI, (1964).

RAM & MISRA (1975), mostraram no rato que o excesso da vitamina A provocava um

aumento na produção e liberação de corticosteróides pela adrenal. Esses corticosteróides lançados na circulação protegiam os lisossomos celulares da ação labilizante da vitamina A. Porém, quando a estimulação da adrenal pela vitamina A era prolongada, a quantidade de adrenocorticóides sintetizados e liberados diminuía provocando então desintegração lisossômica nas células.

1.4. VITAMINA A e CORAÇÃO

É evidente que todo desequilíbrio, tanto por carência como por excesso de vitamina A, provoca a fragilidade dos lisossomos tendo, como consequência, a liberação de hidrolases que se encontram inativas nessas organelas. Daí resulta uma implicação fundamental dos lisossomos, em todas as estruturas teciduais, sendo que, a integridade funcional de numerosos órgãos depende da ação da vitamina A justamente no controle dessa integridade. Entre os órgãos sensíveis a um eventual desequilíbrio na quantidade de vitamina A, figura o coração.

NICHELLE & CARLINO, (1953) estudando o efeito da administração excessiva de vitamina A no rato verificaram uma degeneração das fibras musculares do coração. Estas alterações também foram evidenciadas por STREBEL & cols. (1969), os quais estudando os efeitos da administração de 50.000 UI de vitamina A por dia no rato durante 16 dias, verificaram no coração além de necrose de fibras do miocárdio, calcificação na túnica média das artérias. Um fato importante evidenciado nesse trabalho se refere a via de administração da vitamina A, pois essas alterações foram evidenciadas somente quando a vitamina era administrada por via intraperitoneal e nunca observadas quando se utilizava a via oral.

Em 1973 LEELAPRUTE & cols., mostraram a importância da via de administração e do tipo de vitamina A na produção experimental de alterações cardio-vasculares no rato.

Em 1982, COSTA utilizando 20.000 UI de vitamina A por 10 dias, intraperitonealmente, estudou morfométricamente as alterações no coração de ratos jovens, observando uma acentuada diminuição da largura das fibras musculares cardíacas, acompanhada de uma diminuição dos volumes nucleares e miocitólise.

1.5. PROPOSIÇÃO

O estudo do coração de ratos recém-nascidos e em lactação, cujas mães receberam uma única dose de vitamina A de 30.000 UI no décimo dia de gestação não foi verificado na literatura pertinente, constituindo o propósito do presente trabalho, o qual foi planejado com os seguintes objetivos:

1. Verificar as possíveis alterações ponderais presentes no coração de ratos recém-nascidos e em lactação provocadas por uma dose única de vitamina A não teratogênica durante a vida intra-uterina.

2. Quantificar as alterações estruturais presentes no miocárdio ventricular desses animais.

3. Mostrar se uma pequena dose de vitamina A quando administrada num período crítico do desenvolvimento de ratos seria capaz de lesar o coração dos mesmos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

1

2.1. MATERIAL

Foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus*, variedade Wistar), obtidos do biotério da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas. Esses animais representam filhotes recém-nascidos e em lactação de 20 ratas grávidas divididos em 2 grupos:

Grupo I - tratados: 30 ratos obtidos de 10 ratas que receberam uma única injeção intraperitoneal de 0,2 ml de Arovit (Palmitato de vitamina A em solução coloidal hidromiscível - produtos Roche) contendo 30.000 UI de vitamina A no décimo dia de gravidez.

Grupo II - controle: 30 ratos obtidos de 10 ratas que receberam uma única injeção intraperitoneal de 0,2 ml de solução salina (solução de NaCl a 0,85%) no décimo dia de gravidez.

As ratas de ambos os gru-

pos estudados 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 DISSECAÇÃO E PESAGEM:

Os filhotes de ambos os grupos estudados foram pesados e sacrificados aos 1, 5, 10 e 15 dias de vida pós-natal (15 de cada grupo para o 1º dia e 5 de cada grupo para os outros dias, totalizando 60 animais) por inalação de éter anestésico.

Após secção e rebatimento da porção ventral do tórax dos animais, os corações foram retirados e imersos rapidamente numa solução salina a 4°C, com a finalidade de manter suas contrações para completa expulsão do sangue contido em suas cavidades. A seguir foram colocados numa solução de Bouin (Formaldeído - 15ml, Ácido Pícrico - 85ml, Ácido Acético glacial 5ml) para fixação e 24 horas depois os ventrículos foram separados dos átrios e colocados em álcool 70%. É importante registrar que o esqueleto fibroso ficou com os ventrículos. Em seguida, foi realizada a pesagem dos ventrículos em balança de precisão (Micronal 0,001mg) e também a medida dos volumes absolutos dos mesmos com o auxílio de uma seringa graduada 1.1000 (ml)

2.3. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

Os ventrículos de todos os animais após a pesagem e medida do volume foram desidratados em álcool, numa série crescente de graduações, diafanizados em benzol e incluídos em parafina. Os blocos foram cortados com 7 micrômetros de espessura e os cortes foram corados pela hematoxilina-eosina (HE) para

observação ao microscópio de luz.

2.4. TÉCNICAS MORFOMÉTRICAS

2.4.1. Técnica de CHALKLEY

Com a finalidade de avaliar percentualmente as estruturas do miocárdio ventricular, empregou-se neste estudo a técnica de CHALKLEY (1943). Utilizou-se, para tal uma ocular preparada com quatro pontos padrão e uma objetiva de imersão (100X). Cada ponto padrão correspondia a extremidade livre de uma seta e as estruturas histológicas escolhidas (citoplasma, núcleo da fibra muscular e tecido intersticial), foram registradas individualmente. Foram determinadas quantas vezes as estruturas eram atingidas pelos pontos padrão e contados 1.000 pontos para cada ventrículo cardíaco de cada animal. Os valores numéricos obtidos das estruturas do miocárdio ventricular dos animais tratados e controles foram transformados em valores percentuais.

Essa 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.

2.4.2. Cariometria

Os volumes reais dos núcleos das fibras ventriculares do miocárdio dos diversos grupos experimentais foram obtidos através de medidas cariométricas.

Os cortes foram focalizados ao microscópio óptico, com objetiva de imer-

Essa 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 fibras ventriculares do miocárdio 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 (Olympus).

Os núcleos das fibras musculares foram projetados sobre papel, com um 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 dos núcleos. Para a obtenção dos volumes, os eixos maior e menor foram medidos, obtendo-se ainda, por meio da média geométrica dos 2 primeiros, um terceiro eixo. Em seguida, foi aplicada a fórmula do volume do elipsóide de acordo com VALERI & cols. (1967)

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

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

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 do 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:

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

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:

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

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 esse valor em milímetros. Por sua vez o valor 1.000D está ampliado 1.140X, razão pela qual é preciso dividi-lo por 1.140 para ter-se o valor real do eixo. Assim temos:

$$V = \frac{\pi}{6} \cdot \frac{1.000 D_1}{1140} \cdot \frac{1.000 D_2}{1140} \cdot \frac{1.000D_1}{1140} \cdot \frac{1.000D_2}{1140}$$

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

$$V = 0,35341426 \cdot D_1 \cdot D_2 \cdot D_1 \cdot D_2$$

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 e interstício) entre os grupos controle 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 medida (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 dessas amostras se aplica com maior sucesso que a comparação das médias.

Esse teste permite concluir se duas amostras provêm de populações que tem 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 (χ^2) permite decidir quanto a aceitação de H_0 , que admite serem as duas amostras provenientes de populações da mesma mediana.

A variável χ^2 é calculada pela fórmula:

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

Estabelecendo α , que neste trabalho foi tomado a um nível de 95% ($\alpha = 0,5$), 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 ven- tricular

A dosagem de vitamina A utilizada neste trabalho juntamente com a maneira pela qual foi administrada, não provocou mal formações visíveis nos animais considerados tratados. Pôde-se observar que esses animais apresentaram um comportamento normal no que concerne a postura, movimentos corporais, apetite 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 décimo dia de gestação, apresentou-se menor (5,1g + 0,634) quando comparado ao dos animais controle (6,5g + 0,444).

Neste grupo de animais o peso e o volume dos ventrículos (Tabela 2) também apresentaram uma diferença marcante de valores quando se comparou os valores absolutos dos dois grupos. Para os animais controle observou-se um peso ventricular médio igual a $27,95 \text{ mg} \pm 3,232$ e um volume ventricular médio igual a $0,017 \text{ ml} \pm 0,0030$ e para os tratados, um peso ventricular médio igual a $20,50 \text{ mg} \pm 1,973$ e um volume ventricular igual a $0,009 \text{ ml} \pm 0,0007$.

A Tabela 3 mostra que o peso corporal dos animais controle ($11,78\text{g} \pm 0,454$) que foram sacrificados com 5 dias de vida não apresentou uma grande diferença dos pesos dos animais tratados ($11,16\text{g} \pm 0,890$), o mesmo acontecendo com relação ao peso e volume ventricular dos animais deste grupo (Tabela 4) controle (peso ventricular igual a $47,26 \text{ mg} \pm 3,486$; volume igual a $0,027\text{ml} \pm 0,025$) e tratados (peso ventricular igual a $47,96 \text{ mg} \pm 0,952$; volume igual a $0,027 \text{ ml} \pm 0,0010$).

Já o peso corporal dos animais sacrificados com 10 dias de vida, apresentou-se um pouco diferente (Tabela 5), nos animais controle ($21,46\text{g} \pm 0,439$) em relação aos tratados que apresentaram peso menor ($20,28 \text{ g} \pm 0,742$). Essa pequena diferença também foi observada com relação aos pesos e volumes ventriculares deste grupo, onde foi observado nos animais controle, um peso ventricular igual a $104,54 \text{ mg} \pm 3,202$ e um volume ventricular igual a $0,049 \text{ ml} \pm 0,0004$ e nos tratados um peso e volume um pouco menor ou seja, um peso ventricular igual a $100,64 \text{ mg} \pm 2,922$ e um volume ventricular igual a $0,048 \text{ ml} \pm 0,0013$ (Tabela 6).

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

Peso corporal (g) controle	Peso corporal (g) tratado
7,2	5,7
6,1	6,0
6,1	5,5
6,1	5,8
6,2	5,8
6,6	5,0
6,6	4,6
6,7	4,5
6,1	4,5
6,1	4,7
7,4	4,8
6,7	4,6
6,9	6,1
6,9	4,4
7,0	4,5
\bar{X} 6,58	\bar{X} 5,1
\pm 0,444	\pm 0,634

TABELA 2 - Pesos e volumes ventriculares, médias e erro padrão das médias dos animais controle e tratados, sacrificados no 19 dia de vida.

Peso ventricular (mg)		Volume ventricular (ml)	
controle	tratado	controle	tratado
31,7	23,4	0,020	0,010
24,5	23,0	0,014	0,010
24,8	20,6	0,014	0,009
28,9	21,0	0,018	0,009
29,1	23,0	0,018	0,010
30,1	20,0	0,019	0,009
29,8	20,0	0,019	0,009
28,6	19,0	0,017	0,009
22,0	19,0	0,010	0,009
24,3	19,0	0,015	0,009
32,3	20,0	0,021	0,009
29,5	20,6	0,019	0,009
28,0	23,4	0,018	0,010
24,0	16,6	0,014	0,007
31,7	19,0	0,020	0,009
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
27,95	20,50	0,017	0,009
$\pm 3,232$	$\pm 1,973$	$\pm 0,0030$	$\pm 0,0007$

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

Peso corporal (g) controle	Peso corporal (g) tratado
12,0	11,2
11,3	11,1
12,3	12,5
12,0	10,0
11,3	11,0
\bar{x} 11,78 $\pm 0,454$	\bar{x} 11,16 $\pm 0,890$

TABELA 4 - Pesos e volumes ventriculares, médias e erro padrão das médias dos animais controle e tratados sacrificados no 59 dia de vida.

Peso ventricular (mg)		Volume ventricular (ml)	
controle	tratado	controle	tratado
49,4	48,2	0,029	0,028
43,4	47,6	0,025	0,028
50,0	49,2	0,030	0,029
50,0	46,6	0,030	0,026
43,5	48,2	0,025	0,028
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
47,26	47,96	0,027	0,027
$\pm 3,486$	$\pm 0,952$	$\pm 0,025$	$\pm 0,0010$

A Tabela 7 mostra a média dos pesos corporais dos animais tratados e controle sacrificados com 15 dias de vida pós-natal. Pela análise desta Tabela observou-se que o grupo controle apresentou um peso corporal maior (26,64 g \pm 1,715) quando comparado ao tratado (21,9 g \pm 6,850). Já o peso ventricular destes animais apresentou-se diferente, pois nos controles foi de 96,82 mg (\pm 6,059) enquanto nos tratados foi de 107,1 mg (\pm 13,831), ou seja, os animais tratados apresentaram o peso ventricular maior do que os dos controle. Com relação ao volume, este mostrou-se semelhante nos dois grupos, controle (0,059 ml \pm 0,0016) e tratados (0,051 ml \pm 0,0050) (Tabela 8).

TABELA 5 - Pesos corporais, médias e erro padrão das médias dos animais tratados e controle, sacrificados no 109 dia de vida.

Peso corporal (g) controle	Peso corporal (g) tratado
21,5	20,0
21,1	20,4
21,3	20,6
21,2	21,2
22,2	19,2
\bar{X}	\bar{X}
21,46	20,28
$\pm 0,439$	$\pm 0,742$

TABELA - Pesos e volumes ventriculares, médias e erro padrão das médias dos animais controle e tratados sacrificados no 10º dia de vida.

Peso ventricular (mg)		Volume ventricular (ml)	
controle	tratado	controle	tratado
100,0	102,0	0,050	0,050
104,0	98,1	0,049	0,047
104,7	100,0	0,050	0,049
105,0	105,0	0,050	0,050
109,0	98,1	0,050	0,048
\bar{X} 104,54	\bar{X} 100,64	\bar{X} 0,049	\bar{X} 0,048
\pm 3,202	\pm 2,922	\pm 0,0004	\pm 0,0013

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

Peso corporal (g) controle	Peso corporal (g) tratado
27,0	15,0
27,6	14,5
26,1	24,5
24,0	25,5
28,5	30,0
\bar{x} 26,64 $\pm 1,715$	\bar{x} 21,9 $\pm 6,850$

TABELA 8 - Pesos e volumes ventriculares, médias e erro padrão das médias dos animais controle e tratados sacrificados no 15º dia de vida.

Peso ventricular (mg)		Volume ventricular (ml)	
controle	tratado	controle	tratado
101,2	97,0	0,060	0,048
105,0	102,0	0,060	0,050
94,9	99,0	0,058	0,050
91,0	131,0	0,058	0,060
92,0	106,5	0,062	0,048
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
96,82	107,1	0,059	0,051
\pm 6,059	\pm 13,831	\pm 0,0016	\pm 0,0050

O gráfico I mostra um comportamento diferente do peso dos ventrículos dos corações dos ratos controle e tratados quando se leva em conta os dias de sacrifício. Ao se analisar essa Figura observamos que o peso ventricular dos recém-nascidos apresentou-se menor nos animais tratados do que nos controles. Os animais sacrificados com 5 e 10 dias de vida já apresentaram um peso ventricular mais ou menos equivalente, enquanto nos sacrificados com 15 dias evidenciou-se um peso ventricular dos tratados maior do que os dos controles. *Tais diferenças não se mostraram tão evidentes na projeção gráfica dos volumes ventriculares em relação aos dias de sacrifício (Graf.2), talvez pela falta de uma medida mais adequada para esse volume.*

Do exposto, conclui-se que a vitamina A provocou nos animais tratados uma diminuição do peso corporal mesmo que pequena durante todo o período estudado.

Entretanto, quando se leva em conta o peso dos ventrículos dos corações, o inverso se torna evidente, ou seja, a vitamina A provocou uma hiperplasia fibrosa ventricular nos animais tratados a medida que os mesmos aumentam de idade.

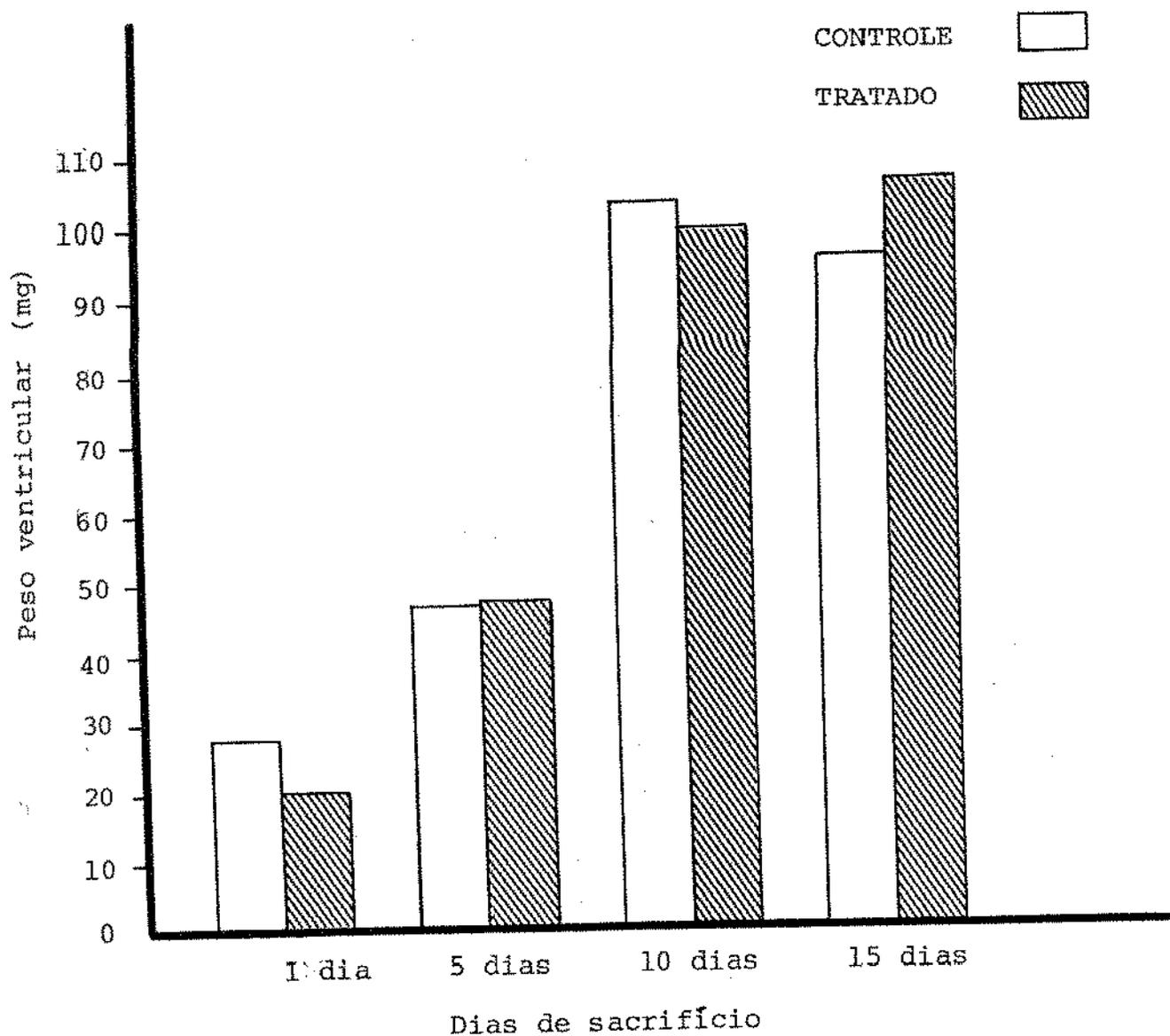


GRÁFICO 1 - Representação gráfica dos pesos ventriculares dos corações dos ratos controle e tratados em função aos dias de sacrifício.

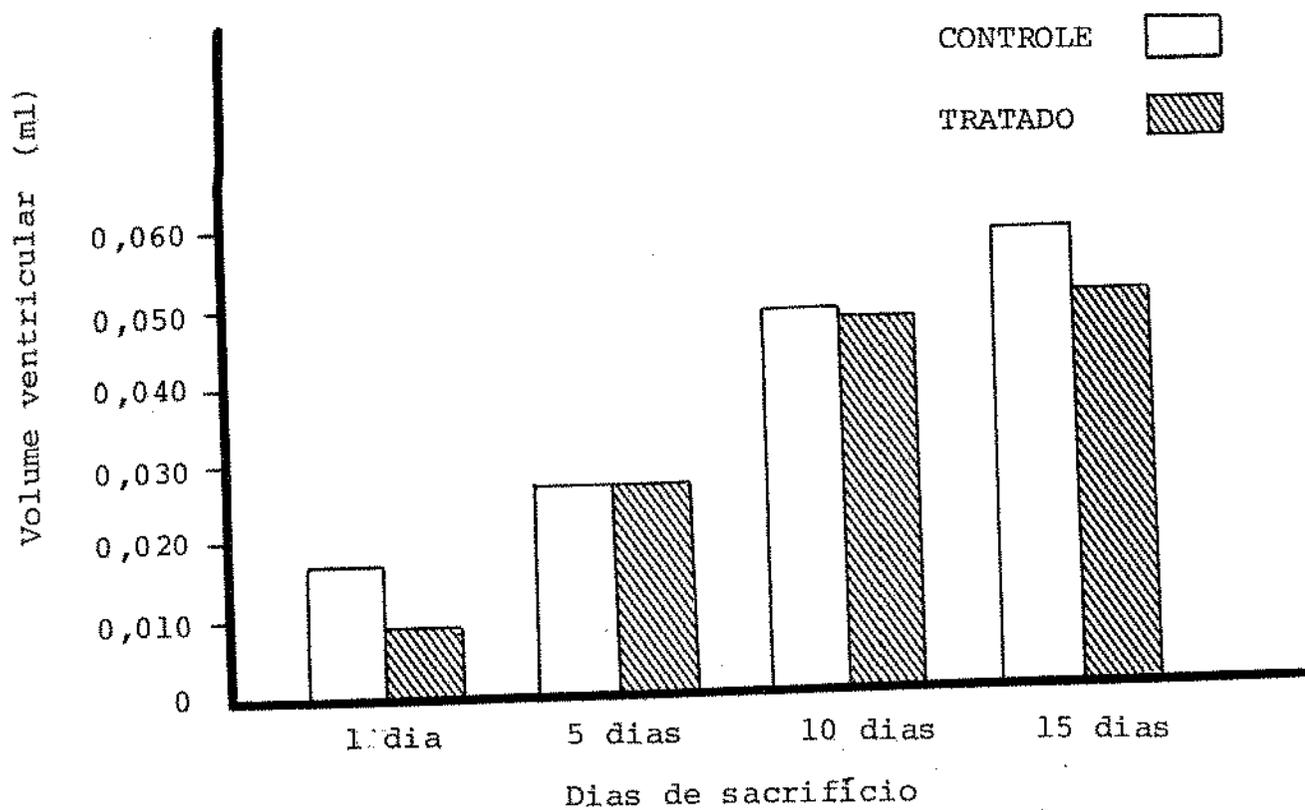


GRÁFICO 2 - Representação gráfica dos volumes absolutos dos ventrículos dos corações dos ratos controle e tratados em função aos dias de sacrifício.

3.1.2. Resultados Histológicos.

O músculo cardíaco dos ratos controle apresentou-se histologicamente com um aspecto um pouco diferente de acordo com a idade estudada em consequência do próprio processo de desenvolvimento do coração. Nos ratos recém-nascidos as fibras musculares ainda não apresentavam uma orientação bem definida (Fig. 1 A e B) como a encontrada em idades mais avançadas, como por exemplo nos animais com 15 dias de vida (Fig. 1 C e D).

Nos recém-nascidos as figuras de mitose foram bastante numerosas e o número destas diminuiu gradativamente com o aumento da idade. As fibras musculares apresentaram-se mais definidas nos animais mais velhos, bem como os núcleos mostraram maior uniformidade quanto a forma, tamanho e afinidade tintorial. As estriações transversais do citoplasma das miocélulas também mostraram-se mais evidentes nos ratos com 15 dias de vida (Fig. 1 D).

Ainda nos animais controle o tecido intersticial apresentou-se contínuo com a camada subendocárdica e com o epicárdio, sendo encontrado ao redor das fibras miocárdicas. O espaço entre as fibras apresentou-se com dimensões variadas, sendo que nos animais de idade mais avançada esse pôde ser melhor evidenciado. Os fibroblastos que constituem as células mais comuns desse interstício e os vasos sanguíneos foram observados também em grande número.

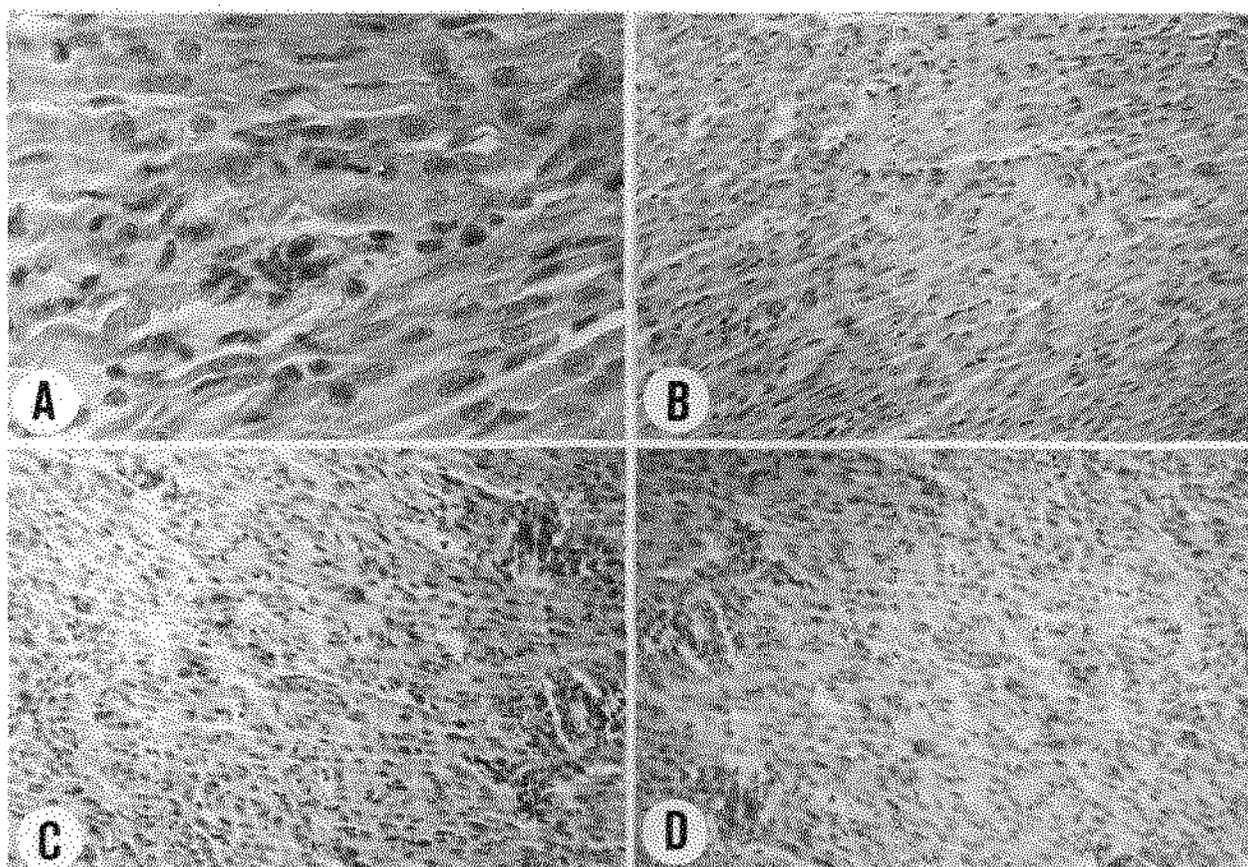
Nos animais cujas mães receberam uma dose única de vitamina A no décimo dia da gestação, algumas diferenças teciduais foram observadas nas diversas estruturas estudadas quando, comparados aos controle. Assim, um menor número de figuras de mitoses foi observado nos animais recém-nascidos (comparar Figs. 1 A e 1 E). Com relação ao aspecto estrutural e afinidade tintorial das fibras, levando-se em conta o citoplasma e o núcleo, uma grande semelhança aos controle foi evidente (Figs. 1 E, F, 2 A, B, C e D), mas a largura das fibras foi sempre menor nos tratados. Já o espaço intersticial, aumentou com a idade do animal em maior proporção, do que o dos ratos controle.

FIGURA I - (A) Rato tratado de 5 dias de vida.
Miocárdio. Observa-se ainda uma desorga-
nização quanto a orientação das fibras.
HE. 480 X

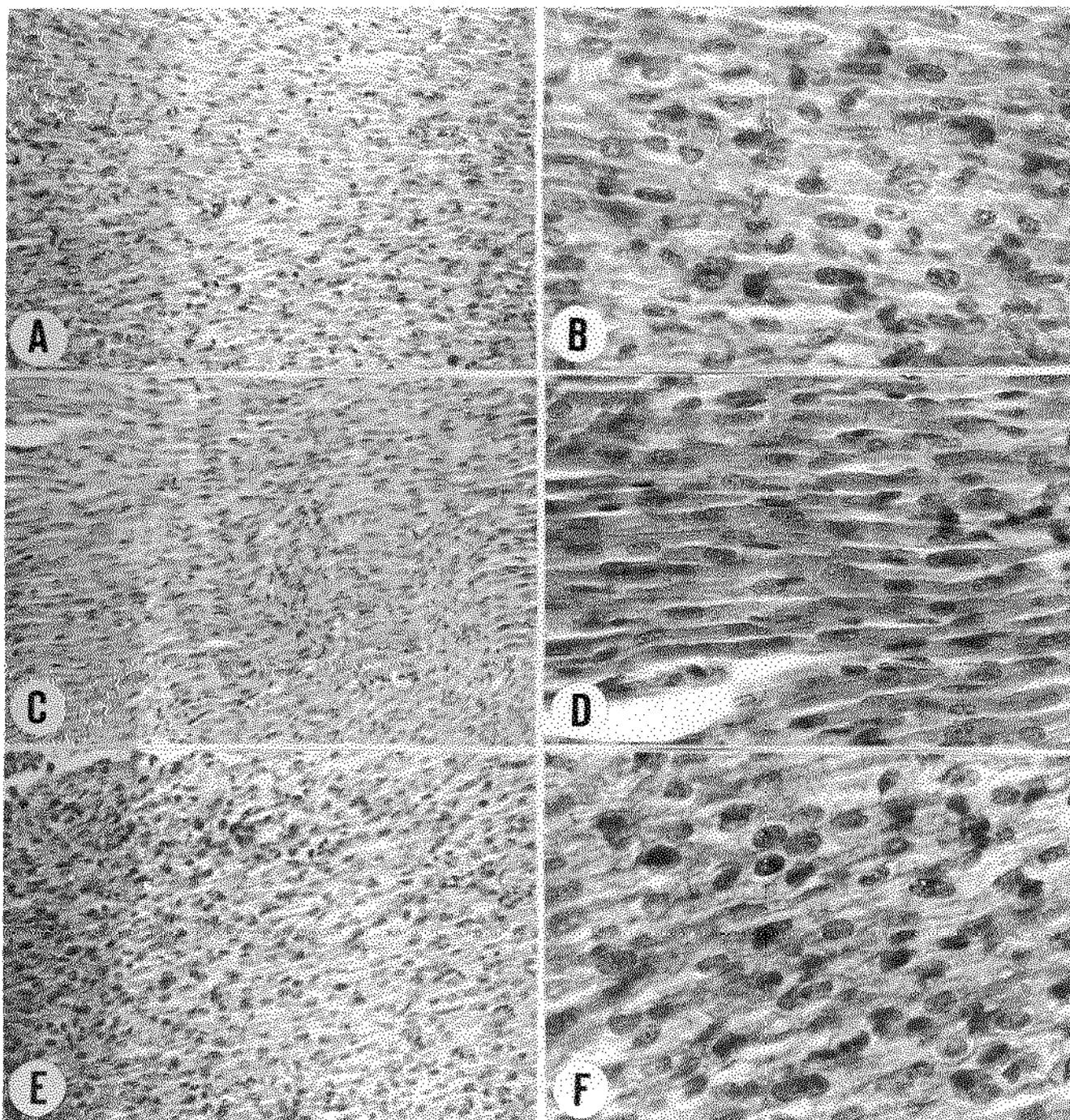
(B) Rato tratado de 5 dias de vida.
Aspecto geral do miocárdio. HE 150 X

(C) Rato tratado de 10 dias de vida. Aspecto
geral do miocárdio. HE. 150 X

(D) Rato tratado de 15 dias de vida. Aspecto
geral do miocárdio. HE. 150 X



- FIGURA II - (A) Rato controle recém-nascido. Aspecto geral do miocárdio. Observa-se grande número de mitoses. HE. Aumento 150 X
- (B) Rato controle recém-nascido. Aspecto geral do miocárdio. HE. 480 X
- (C) Rato controle com 15 dias de vida. Miocárdio normal, já apresentando uma orientação definida das fibras musculares. HE. 150 X
- (D) Rato controle com 15 dias de vida. Miocárdio. Observa-se uma orientação padronizada das fibras e as estriações transversais destas. HE. 480 X
- (E) Rato tratado recém-nascido. Aspecto geral do miocárdio. Observa-se menor número de mitose do que nos controle. HE. 150 X
- (F) Rato tratado recém-nascido. Aspecto geral do miocárdio. HE. 480 X



3.2. RESULTADOS MORFOMÉTRICOS

3.2.1. Técnica de CHALKLEY

Na Tabela 9 estão expressos os valores percentuais e as médias das estruturas escolhidas, isto é, citoplasma e núcleo das fibras musculares e tecido intersticial, do miocárdio ventricular dos animais controle e tratados (animais cujas mães foram injetadas com 30.000 UI de vitamina A no décimo dia de gestação), sacrificados no 1º dia de vida. Estes valores estão representados graficamente no Gráfico 3.

TABELA 9 - Valores percentuais, médias destes valores e erro padrão das médias de citoplasma, núcleo e interstício ventricular do miocárdio ventricular dos ratos controle e tratados, sacrificados no 1º dia de vida.

Citoplasma		Núcleo		Interstício	
C	T	C	T	C	T
73,9	71,4	18,0	19,3	8,1	9,3
72,0	70,9	18,9	18,4	9,1	10,7
71,1	70,6	19,6	19,6	9,3	9,8
73,0	69,9	18,0	20,0	9,0	10,1
73,3	71,3	18,4	19,2	8,3	9,5
74,0	64,1	17,2	19,7	8,8	16,2
69,9	64,0	17,3	20,2	12,8	15,8
74,0	65,7	17,6	20,7	8,4	13,6
74,6	65,2	18,6	19,6	6,8	15,2
72,8	67,2	20,5	18,1	6,7	14,7
75,3	68,2	17,8	17,4	6,9	14,4
73,8	68,7	19,6	17,1	6,6	14,2
72,6	62,2	18,1	17,8	9,3	14,0
74,6	66,3	20,0	20,7	5,4	13,0
76,1	70,0	18,6	19,6	5,3	10,4
\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
73,40 (+1,59)	68,11 (+2,58)	18,54 (+0,99)	19,16 (+1,14)	8,05 (+1,88)	12,72 (+2,47)

Analisando-se a Tabela 9 verificou-se que para o citoplasma da fibra muscular, foram obtidos os valores percentuais médios iguais a 73,40 ($\pm 1,59$) para os controles e 68,11 ($\pm 2,58$) para os tratados. Quando da análise de variância após transformação angular (Tabela 13) verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os valores dos animais controle em relação aos tratados.

Observando-se os valores percentuais médios para os núcleos, verificou-se não haver diferença entre esses valores para ambos os grupos de animais estudados, isto é, 18,54 ($\pm 0,99$) para os controle e 19,16 ($\pm 1,14$) para os tratados. A análise de variância comprovou este fato. (Tabela 13).

Para o tecido intersticial, a diferença dos valores médios obtidos para os animais controle (8,05 $\pm 1,88$) e tratados (12,72 $\pm 2,47$) apresentou diferença estatisticamente significativa após a aplicação da análise de variância.

A vitamina A provocou uma diminuição relativa no citoplasma e um aumento de tecido intersticial nos animais tratados quando comparados aos animais controle.

Na tabela 10, acham-se expressos os valores percentuais e as médias das estruturas estudadas do miocárdio ventricular dos animais controle e tratados, sacrificados com 5 dias de vida, obtidos com o emprego da Técnica de CHALKLEY (1943). No gráfico 4 estão representados graficamente estes valores.

Após a análise desta tabela, verificou-se que os valores para citoplasma continuaram ainda diferentes (71,48 $\pm 2,82$ para os controle e 66,70 $\pm 1,84$ para os tratados), como também os do interstício (4,88 $\pm 1,21$ para os controle e 14,22 $\pm 0,87$ nos tratados). Nestes animais observou-se ainda, com relação aos

núcleos das fibras uma pequena diferença entre os valores. Após a análise de variância as diferenças entre os valores de todas as estruturas estudadas foram estatisticamente significantes, mesmo para os núcleos das fibras musculares. (Tabela 14)

A vitamina A além de provocar uma diminuição do citoplasma e aumento do interstício, parece ter provocado também um desarranjo na estrutura nuclear desse grupo de animais, os quais se apresentaram menores quando comparados com os animais controle.

TABELA 10 - Valores percentuais, médias destes valores e erro padrão das médias de citoplasma, núcleo e interstício do miocárdio ventricular dos ratos controle e tratados sacrificados no 59 dia de vida.

Citoplasma		Núcleo		Interstício	
C	T	C	T	C	T
74,1	63,8	21,1	21,0	4,8	15,2
71,8	66,4	24,5	19,2	3,7	14,4
68,2	66,8	27,6	20,4	4,2	12,8
74,3	68,6	20,9	17,2	4,8	14,2
69,0	67,9	24,1	17,6	6,9	14,5
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
71,48	66,70	23,64	19,08	4,88	14,22
($\pm 2,82$)	($\pm 1,84$)	($\pm 2,76$)	($\pm 1,67$)	($\pm 1,21$)	($\pm 0,87$)

Os valores percentuais e as médias das estruturas escolhidas, citoplasma, núcleo e tecido intersticial dos ventrículos dos corações dos animais controle e tratados, sacrificados com 10 dias de vida, obtidos com o emprego da Técnica de CHALKLEY (1943), estão expressos na Tabela 11 e graficamente no Gráfico 5.

Analisando-se essa tabela verificou-se que os animais tratados apresentaram valores percentuais iguais a 60,46 (\pm 4,20) para citoplasma , 18,00 (\pm 0,81) para o núcleo e 21,54 (\pm 4,55) para o tecido intersticial, enquanto que os animais controle apresentaram para essas mesmas estruturas, os seguintes percentuais: 74,82 (\pm 1,28), 19,02 (\pm 0,51) e 6,28 (\pm 0,79) respectivamente. Quando se aplicou a análise de variância, verificou-se que entre os dois grupos de animais estudados o citoplasma da fibra muscular e o tecido intersticial mostraram-se estatisticamente diferentes, enquanto os valores nucleares não foram significantes (Tabela 15).

A vitamina A provocou nestes animais uma diminuição do citoplasma e um aumento do interstício do miocárdio ventricular quando comparados aos animais controle.

TABELA 11 - Valores percentuais, médias destes valores e erro padrão das médias de citoplasma, núcleo e interstício do miocárdio ventricular dos ratos controle e tratados sacrificados no 10º dia de vida.

Citoplasma		Núcleo		Interstício	
C	T	C	T	C	T
72,6	65,8	19,8	18,6	7,6	15,6
75,9	63,7	18,7	18,3	6,0	18,0
75,2	59,7	19,3	17,4	5,5	22,9
75,4	56,0	18,6	18,8	6,0	25,2
75,0	57,1	18,7	16,9	6,3	26,0
\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
74,82	60,46	19,02	18,00	6,28	21,54
($\pm 1,28$)	($\pm 4,20$)	($\pm 0,51$)	($\pm 0,81$)	($\pm 0,79$)	($\pm 4,55$)

C - Controle

T - Tratado

Na Tabela 12 acham-se expressos os valores percentuais e as médias das estruturas estudadas do miocárdio ventricular dos animais controle e tratados sacrificados com 15 dias de vida. A projeção gráfica desses valores está representada no Gráfico 6.

TABELA 12 - Valores percentuais, médias destes valores e erro padrão das médias de citoplasma, núcleo e interstício do miocárdio ventricular dos ratos controle e tratados sacrificados no 15º dia de vida.

Citoplasma		Núcleo		Interstício	
C	T	C	T	C	T
75,8	62,1	19,7	17,4	4,5	20,5
72,7	58,2	18,6	18,2	8,7	23,6
75,2	56,8	19,3	16,8	5,5	26,4
75,0	60,3	18,7	15,5	6,3	24,2
75,0	57,4	18,6	13,5	6,4	29,1
\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
74,74	58,96	18,98	16,28	6,28	24,76
($\pm 1,19$)	($\pm 2,20$)	($\pm 0,50$)	($\pm 1,84$)	($\pm 1,55$)	($\pm 3,21$)

C - Controle

T - Tratado

Da sua análise verificou-se haver neste período, diferenças estatisticamente significantes nos percentuais obtidos para os animais tratados e para os animais controle apenas no que se refere ao tecido intersticial ($24,76 \pm 3,21$ e $6,28 \pm 1,55$ respectivamente). Com relação aos constituintes das fibras musculares ou seja, citoplasma e núcleo, os valores percentuais mostraram-se maiores para o citoplasma dos controles ($74,74 \pm 1,19$) em relação aos tratados ($58,96 \pm 2,20$) e semelhantes para o núcleo ($18,98 \pm 0,50$) para os controles e $16,28 \pm 1,84$ para os tratados.

Esse fato foi comprovado quando da aplicação da análise de variância (Tabela 16).

Nesses animais a vitamina A provocou a nível ventricular uma diminuição do citoplasma e um aumento do tecido intersticial quando comparado aos animais controle. Do que foi exposto conclui-se que as fibras musculares dos ventrículos do coração dos animais tratados apresentaram um desenvolvimento menor em todo o período estudado, enquanto o tecido intersticial aumentou progressivamente até o final do período experimental em decorrência da ação da vitamina A durante a vida intra-uterina.

TABELA 13 - Análise de variância dos ângulos correspondentes às percentagens do citoplasma, núcleo e interstício do miocárdio ventricular dos ratos controle e tratados, sacrificados com 1 dia de vida. Valores de F.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F
Citoplasma				
Entre grupos	88,39	1	88,39	42,50*
Erro	58,23	28	5,24	
Total	146,62	29		
Núcleo				
Entre grupos	1,49	1	1,49	2,41 ^{N.S.}
Erro	17,31	28	0,67	
Total	18,80	29		
Interstício				
Entre grupos	148,22	1	148,22	34,9*
Erro	118,78	28	9,54	
Total	267,00	29		

* = significativo ao nível de 0,01, valor crítico de F = 7,64

N.S. = não significante

TABELA 14 - Análise de variância dos ângulos correspondentes às percentagens do citoplasma, núcleo e interstício do miocárdio ventricular dos ratos controle e tratados, sacrificados com 5 dias de vida. Valores de F.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F
Citoplasma				
Entre grupos	22,20	1	22,18	9,989*
Erro	39,77	28	4,99	
Total	61,97	29		
Núcleo				
Entre grupos	25,25	1	25,25	10,22*
Erro	19,75	28	5,63	
Total	45,00	29		
Interstício				
Entre grupos	223,49	1	223,49	150,57*
Erro	11,87	28	29,42	
Total	235,36	29		

* = significativo ao nível de 0,05, valor crítico de
F = 4,20

TABELA 15 - Análise de variância dos ângulos correspondentes às percentagens do citoplasma, núcleo e interstício do miocárdio ventricular dos ratos controle e tratados, sacrificados com 10 dias de vida. Valores de F.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F
Citoplasma				
Entre grupos	194,92	1	194,92	57,13*
Erro	27,29	28	27,78	
Total	222,21	29		
Núcleo				
Entre grupos	1,11	1	1,11	3,67 ^{N.S.}
Erro	2,41	28	0,44	
Total	3,52	29		
Interstício				
Entre grupos	426,24	1	426,24	75,61*
Erro	45,10	28	59,92	
Total	471,34	29		

* = significativo ao nível de 0,01, valor crítico de F = 7,64

N.S. = não significativo

TABELA 16 - Análise de variância dos ângulos correspondentes às percentagens do citoplasma, núcleo e interstício do miocárdio ventricular dos ratos controle e tratados, sacrificados com 15 dias de vida. Valores de F.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F
Citoplasma				
Entre grupos	233,60	1	233,60	207,47*
Erro	9,00	28	30,32	
Total	242,60	29		
Núcleo				
Entre grupos	8,03	1	8,03	7,19 ^{N.S.}
Erro	8,94	28	2,12	
Total	16,97	29		
Interstício				
Entre grupos	590,77	1	590,77	151,06*
Erro	31,28	28	77,75	
Total	622,05	29		

* = significativo ao nível de 0,01, valor crítico de F = 7,64

N.S. = não significativo

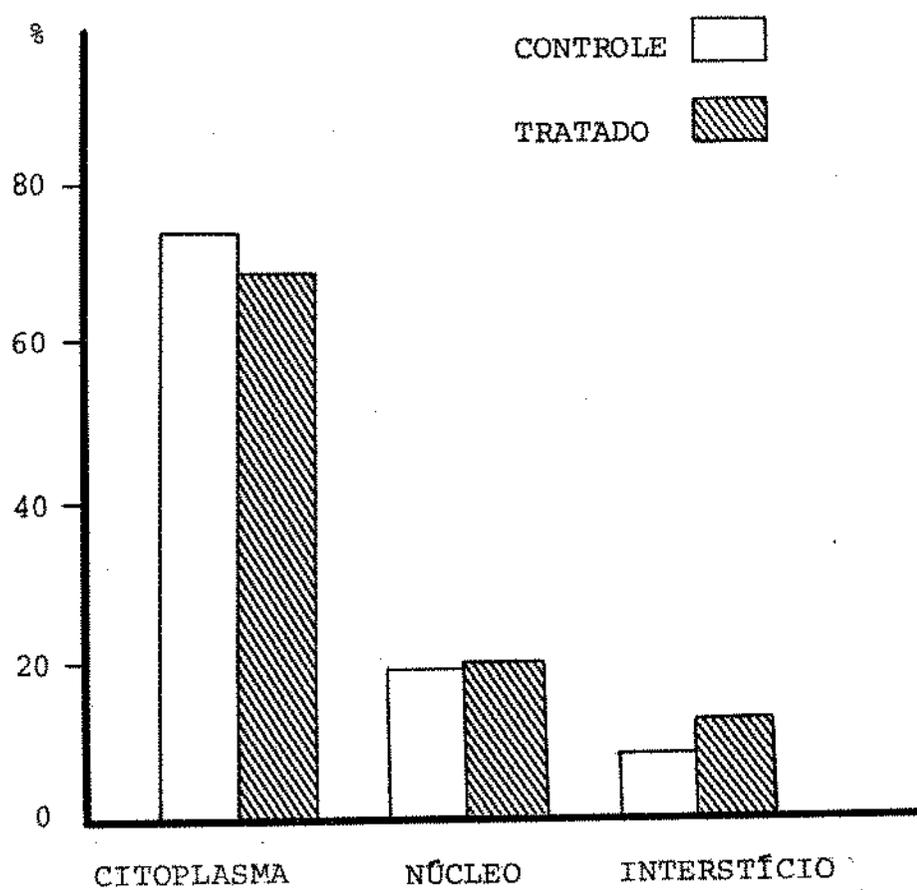


GRÁFICO 3 - Média dos valores correspondentes à percentagens de citoplasma, núcleo e interstício do miocárdio ventricular dos ratos controle e tratados, sacrificados no 1º dia de vida.

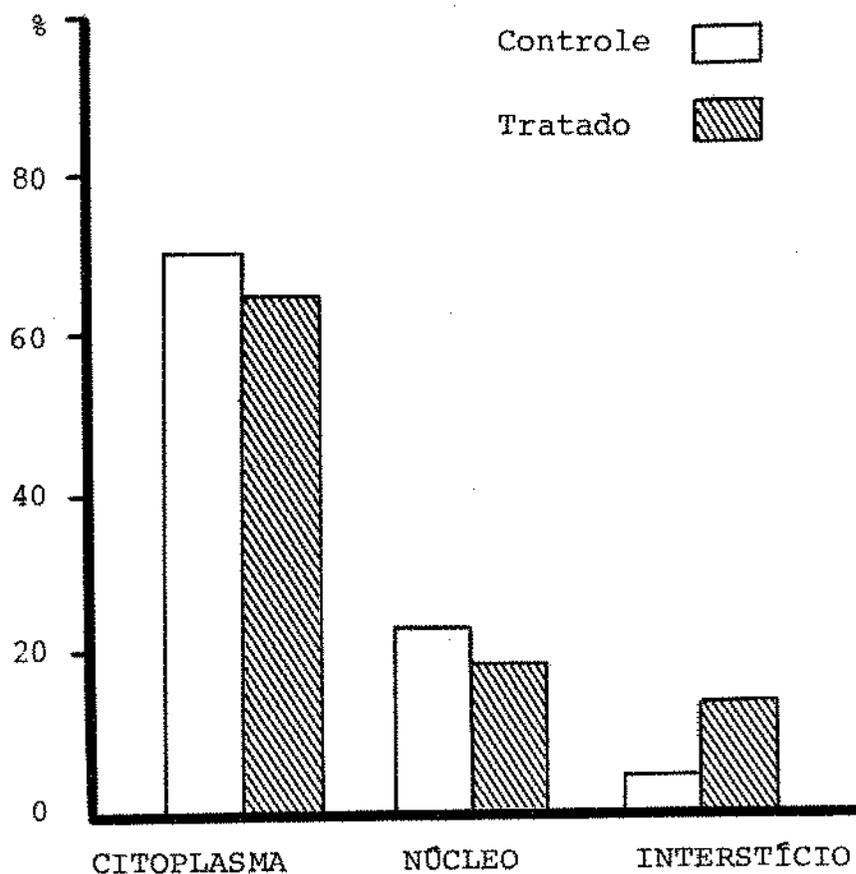


GRÁFICO 4 - Médias dos valores correspondentes à percentagens de citoplasma, núcleo e interstício do miocárdio ventricular dos ratos controle e tratados, sacrificados no 5º dia de vida.

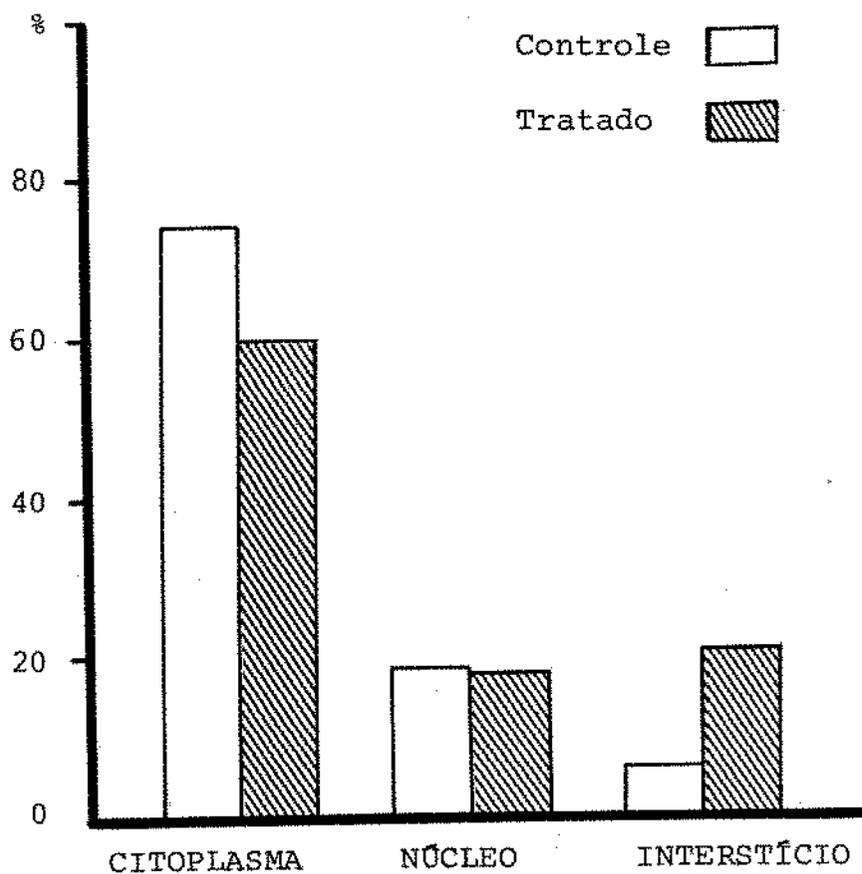


GRÁFICO 5 - Médias dos valores correspondentes à percentagens de citoplasma, núcleo e interstício do miocárdio ventricular dos ratos controle e tratados, sacrificados no 10º dia de vida.

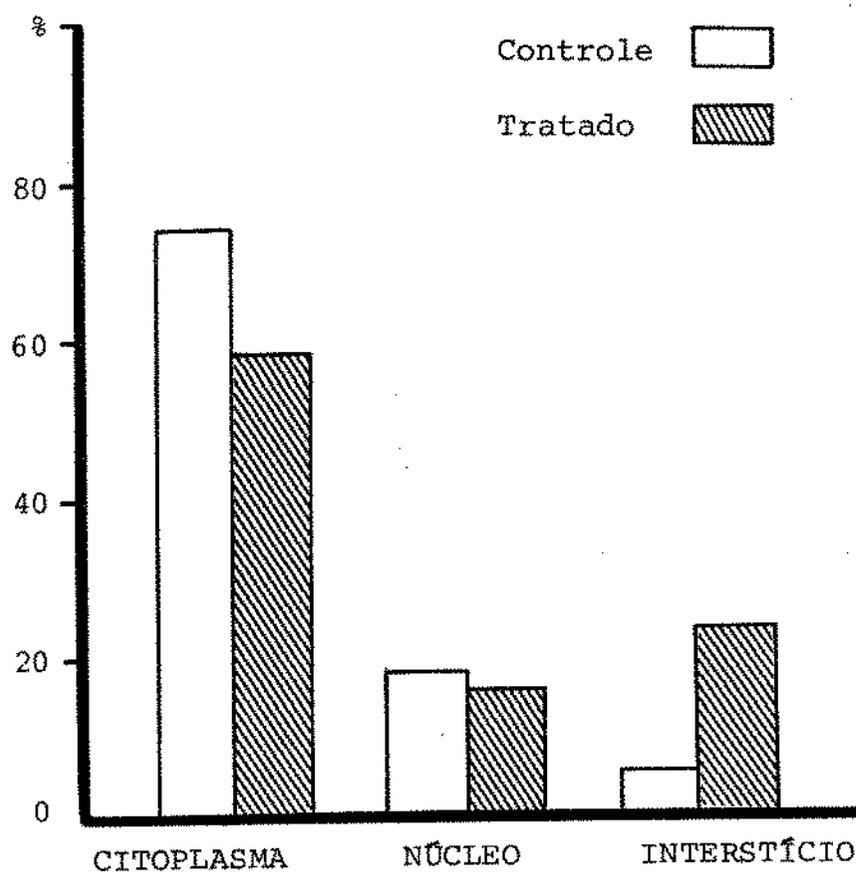


GRÁFICO 6 - Médias dos valores correspondentes à percentagens de citoplasma, núcleo e interstício do miocárdio ventricular dos ratos controle e tratados, sacrificados no 15º dia de vida.

3.2.2. Cariometria

Analisando-se a Tabela 21, verificou-se que os volumes nucleares das fibras musculares dos ventrículos dos corações de ratos em cujas mães foram injetadas com uma dose única de vitamina A no décimo dia de gestação e sacrificados com 1 dia de vida foram menores ($62,71 \mu\text{m}^3 \pm 18,41$) do que os animais controle ($113,72 \mu\text{m}^3 \pm 10,77$). E na Tabela 17 observou-se que a maior percentagem de volumes nucleares dos animais tratados estava entre os valores 50 — 100 (53,3%) e que a dos animais controle já se encontravam no intervalo 100 — 150 (41,5%). Para confirmação destes dados, foi construído com o auxílio de uma régua logarítmica, um histograma (Gráfico 7), onde está representada a distribuição de freqüência dos volumes nucleares absolutos das fibras musculares do miocárdio ventricular dos animais sacrificados com 1 dia de vida pós-natal. Pela análise desta Figura observou-se um desvio para a esquerda da mediana nos animais tratados, fato este que foi confirmado quando da aplicação do teste da mediana. Considerando-se o quadro abaixo:

	Grupo controle	Grupo tratado	Total
Valores menores que a mediana	171	945	1116
Valores iguais ou maiores que a mediana	1329	555	1884
Total	1500	1500	3000

obteve-se um χ^2 de valor 426,29 que, quando comparado com o χ^2 tabelado de valor 3,84, levou a rejeição da hipótese de que os valores fossem iguais.

Com relação aos volumes nucleares das fibras do miocárdio ventricular dos animais controle e tratados com 5 dias de vida, foi verificado pela análise da Tabela 22 que nos animais tratados os volumes nucleares apresentaram-se com resultado semelhante ao caso anterior, ou seja, menores ($43,65\mu\text{m}^3 \pm 2,80$) que os dos animais controle ($114,39\mu\text{m}^3 \pm 12,30$), tal fato foi confirmado quando se analisou a Tabela 18, uma vez que a maior percentagem de volumes nucleares nos animais tratados estava entre os valores 0 — 50 (73,%), enquanto que a maior percentagem de volumes nucleares nos animais controle estava entre os valores 100 — 150 (47,8%). Esta diferença foi bastante evidenciada pela análise do Gráfico 8 onde estão representadas as distribuições de frequência dos volumes nucleares nos animais controle e tratados, onde observou-se um deslocamento para a esquerda da mediana dos animais tratados. Esse desvio foi confirmado quando da aplicação do teste da mediana. Considerando-se o quadro abaixo:

	Grupo controle	Grupo tratado	Total
Valores menores que a mediana	25	473	500
Valores iguais ou maiores que a mediana	475	27	500
Total	500	500	1000

obteve-se um χ^2 de valor 796,05 que, quando comparado com o χ^2 tabelado de valor 3,84, levou a rejeição da hipótese que os valores fossem iguais.

Analisando-se a Tabela 23, verificou-se que os volumes nucleares das fibras musculares do miocárdio ventricular dos animais tratados e sacrificados com 10 dias de vida foram menores ($39,15 \mu\text{m}^3 \pm 3,03$) que os dos animais controle ($100,94 \mu\text{m}^3 \pm 5,25$). Na Tabela 19 este fato mostrou-se evidente, pois a maior percentagem de volumes nucleares daqueles animais tratados estava entre os valores 0 — 50 (81,8%), enquanto nos controle a maior frequência se mostrou no intervalo de classe 50 — 100 (52,6%).

O Gráfico 8 onde está representado o histograma de frequência dos volumes nucleares dos animais acima mencionados, mostrou um deslocamento a esquerda da mediana nos animais tratados em relação aos controle, o qual 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	17	473	490
Valores iguais ou maiores que a mediana	483	27	510
Total	500	500	1000

obteve-se um χ^2 no valor de 828,43 que, quando comparado ao χ^2 tabelado, de valor 3,84, levou rejeição da hipótese H_0 .

Os animais sacrificados com 15 dias de vida, cujas mães receberam uma única dose de vitamina A, mostraram-se ainda com os volumes nucleares das fibras musculares do miocárdio ventricular diferentes (Tabela 24), $(37,56 \mu\text{m}^3 \pm 6,86)$ nos tratados e $(81,63 \mu\text{m}^3 \pm 10,99)$ nos animais controle. Na Tabela 20 foram confirmados estes dados, onde se observou que a maior percentagem de volumes nucleares dos animais tratados estava entre os valores 0 — 50 (80,2%), valores estes que se assemelham aos grupos anteriores, enquanto os controle apresentaram a maior percentagem entre os valores 50 — 100 (74,6 %).

Analisando-se o Gráfico 10, onde está representado o histograma de freqüência dos valores nucleares relativos a este último grupo observou-se ainda um desvio a esquerda da mediana para os tratados o qual foi confirmado quando da aplicação do teste da mediana. Considerando-se os dados constantes no quadro abaixo, obteve-se um χ^2 no valor de 592,38, que quando comparado ao χ^2 tabelado, de valor 3,84, levou a rejeição da possibilidade desses valores serem semelhantes.

	Grupo controle	Grupo tratado	Total
Valores menores que a mediana	20	401	421
Valores iguais ou maiores que a mediana	480	99	579
Total	500	500	1000

Baseado nestes resultados pode-se concluir que a injeção de uma única dose de vitamina A em uma rata no décimo dia de gestação, provocou nos filhotes, mais especificamente, nas fibras do miocárdio ventricular, um menor crescimento volumétrico nuclear quando comparados aos animais controle. Essa diferença de valores absolutos do volume nuclear mostrou-se evidente tanto em ratos recém-nascidos quanto naqueles sacrificados durante a lactação no 5º, 10º e 15º dia de vida.

TABELA 17 - Número de núcleos das fibras musculares ventriculares dos corações 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	40	2,7	559	37,3
50 — 100	554	37,0	799	53,3
100 — 150	622	41,5	126	8,4
150 — 200	230	15,4	15	1,0
200 — 250	41	2,7	-	-
250 — 300	9	0,5	-	-
300 — 350	4	0,2	-	-
	1500	100%	1500	100%

TABELA 18 - Número de núcleos das fibras musculares ventriculares dos corações 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	1	0,2	365	73,0
50 — 100	159	31,8	134	26,8
100 — 150	239	47,8	1	0,2
150 — 200	83	16,6	-	-
200 — 250	15	3,0	-	-
250 — 300	3	0,6	-	-
300 — 350	-	-	-	-
	500	100%	500	100%

TABELA 19 - Número de núcleos das fibras musculares ventriculares dos corações de ratos con trole e tratados, sacrificados no 10º dia de vida.

Intervalo de classe (μm^3)	Número de núcleos con- trole	Frequência Relativa	Número de núcleos trata- dos	Frequência Relativa
0 — 50	3	0,6	409	81,8
50 — 100	263	52,6	91	18,2
100 — 150	189	37,8	-	-
150 — 200	43	8,6	-	-
200 — 250	2	0,4	-	-
250 — 300	-	-	-	-
300 — 350	-	-	-	-
	500	100%	500	100%

TABELA 20 - Número de núcleos das fibras musculares ventriculares dos corações 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	20	4,0	401	80,2
50 — 100	373	74,6	99	19,8
100 — 150	101	20,2	-	-
150 — 200	6	1,2	-	-
200 — 250	-	-	-	-
250 — 300	-	-	-	-
300 — 350	-	-	-	-
	500	100%	500	100%

TABELA 21 - Médias e erro padrão das médias dos volumes nucleares das fibras musculares cardíacas dos ventrículos em micrômetros cúbicos, dos animais controle e tratados, sacrificados no 19 dia de vida.

Controle	Tratado
102,20	89,45
99,97	86,20
113,28	85,26
103,42	75,13
120,37	54,94
133,37	47,76
106,12	53,24
103,05	48,65
128,24	48,53
129,64	60,03
121,64	58,92
116,23	44,22
109,35	41,65
107,64	50,82
111,33	95,86
\bar{x}	\bar{x}
113,72	62,71
(\pm 10,77)	(\pm 18,41)

TABELA 22 - Médias e erro padrão das médias dos volumes nucleares das fibras musculares cardíacas dos ventrículos, em micrômetros cúbicos, dos animais controle e tratados sacrificados no 5º dia de vida.

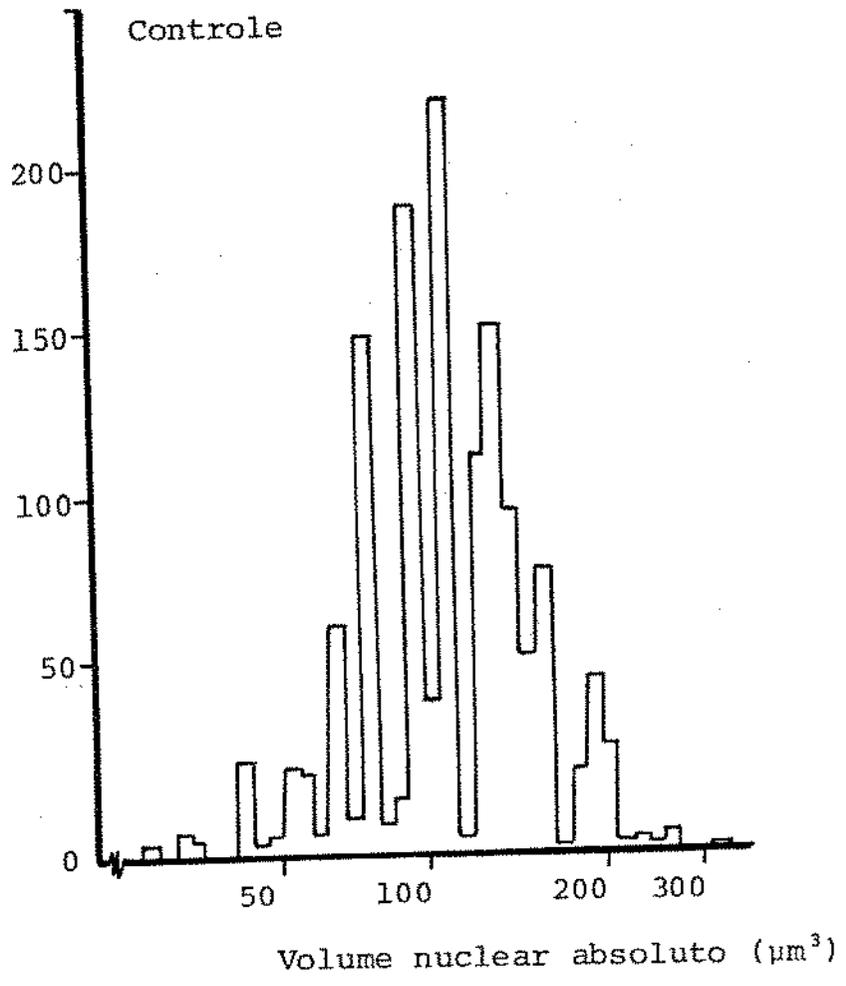
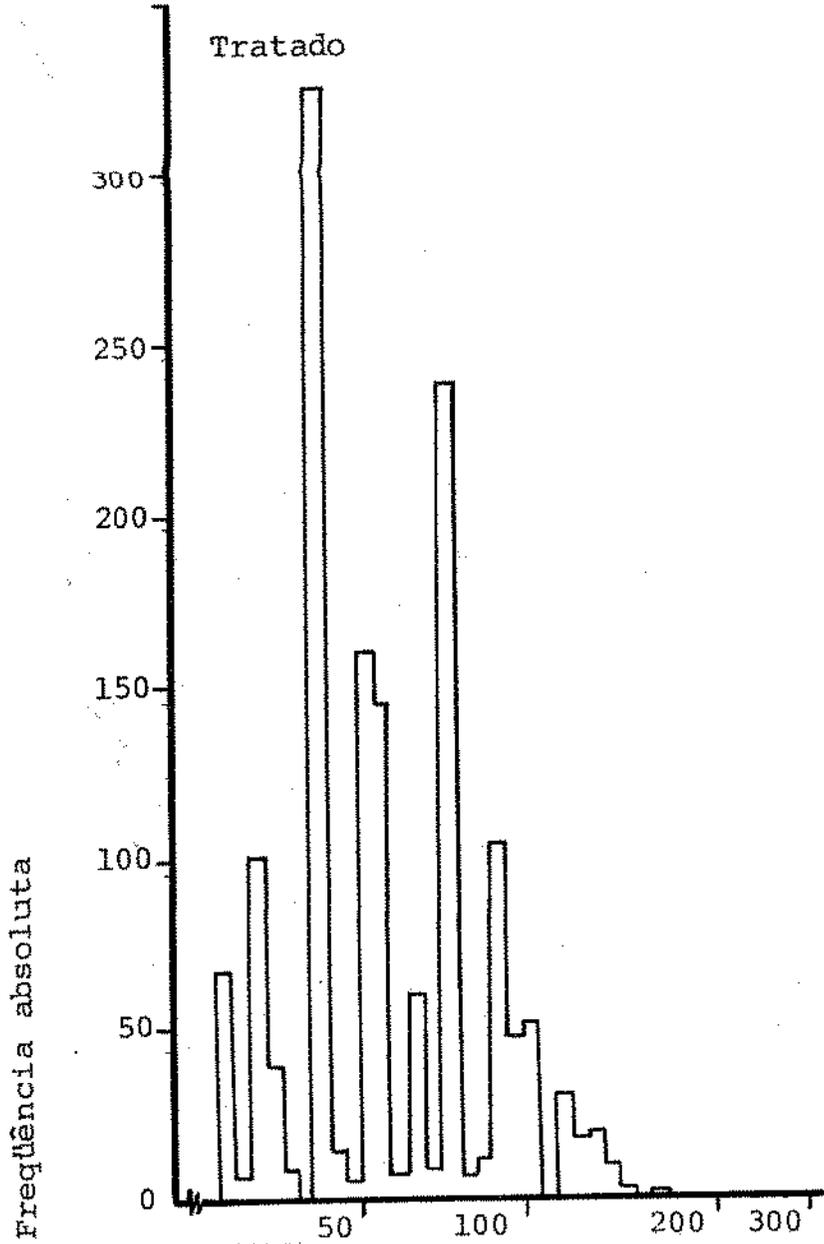
Controle	Tratado
132,66	45,79
111,33	44,84
100,00	44,19
119,25	44,72
108,73	38,75
\bar{x}	\bar{x}
114,39	43,65
(\pm 12,30)	(\pm 2,80)

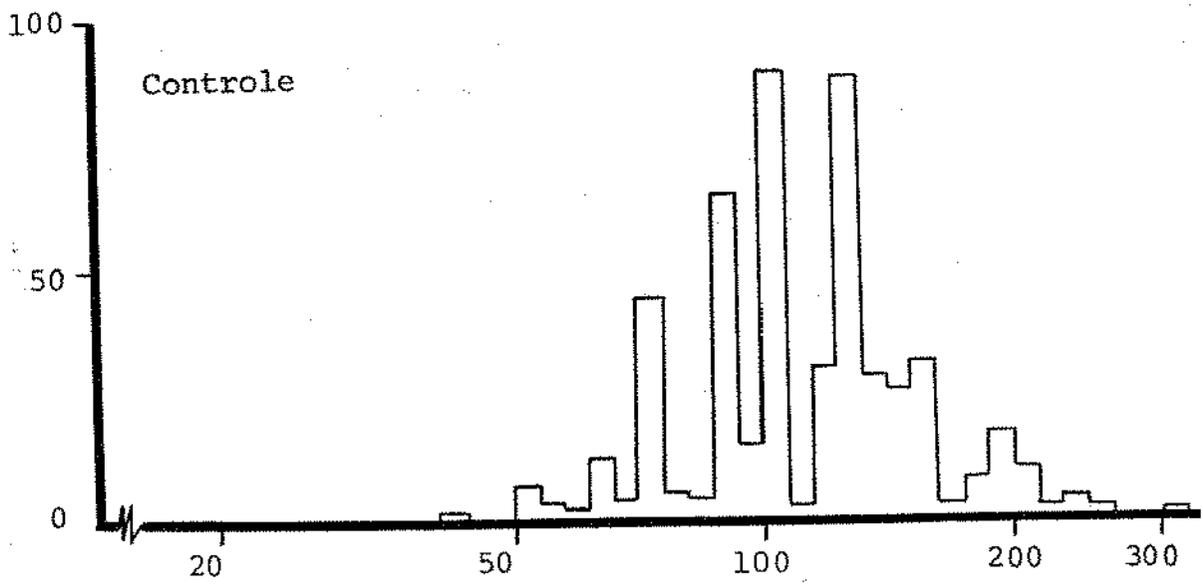
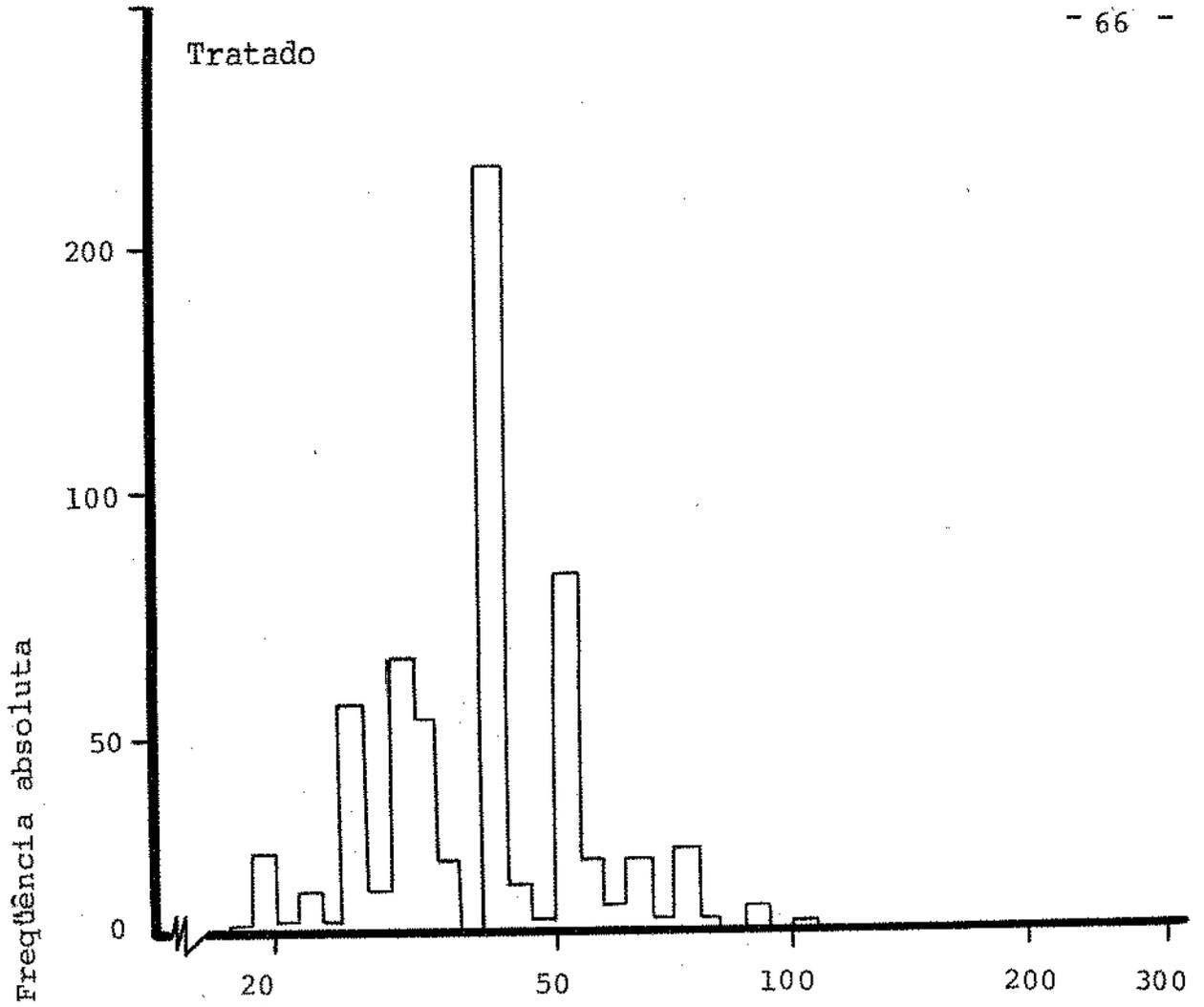
TABELA 23 - Médias e erro padrão das médias dos volumes nucleares das fibras musculares cardíacas dos ventrículos, em micrômetros cúbicos, dos animais controle e tratados, sacrificados no 10º dia de vida.

Controle	Tratado
102,27	43,05
91,87	41,78
105,00	36,74
104,07	37,61
101,53	36,57
\bar{x}	\bar{x}
100,94	39,15
(\pm 5,25)	(\pm 3,03)

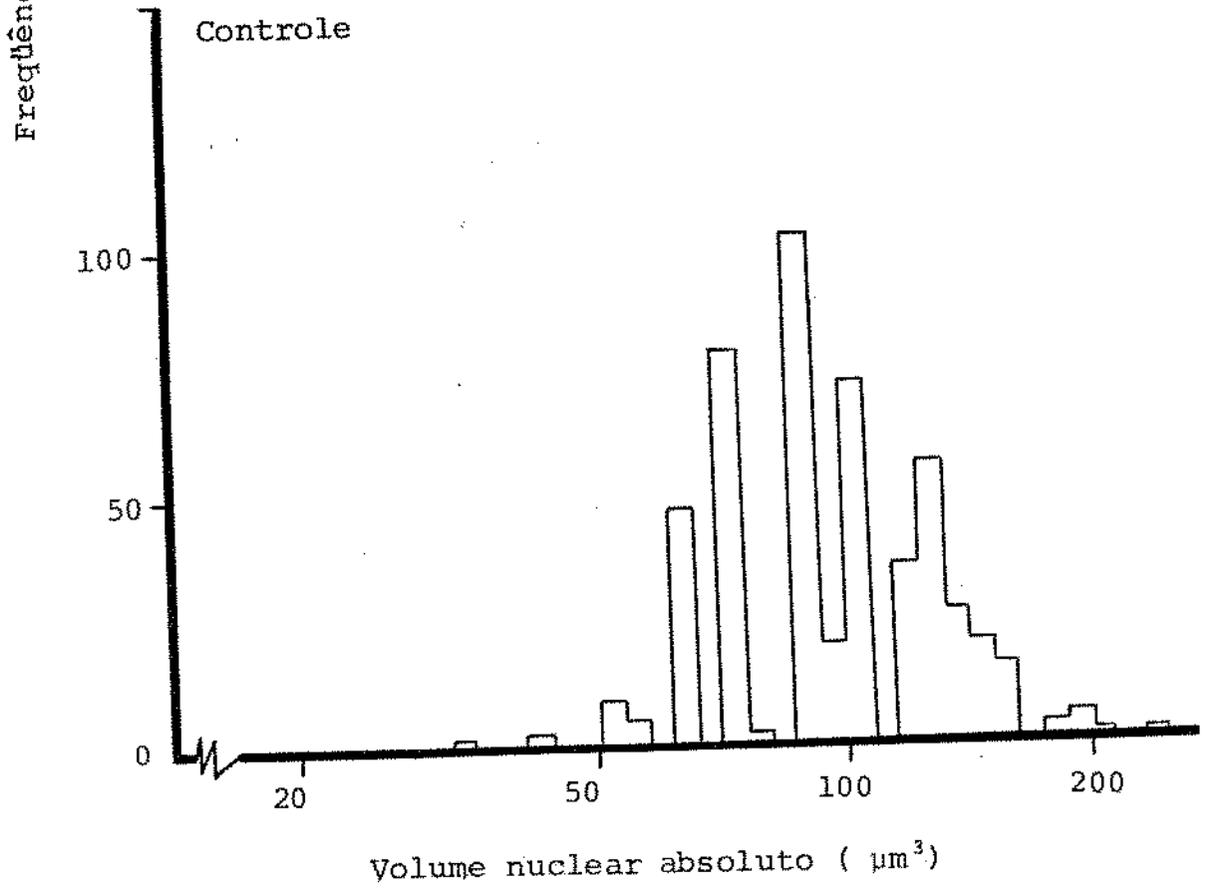
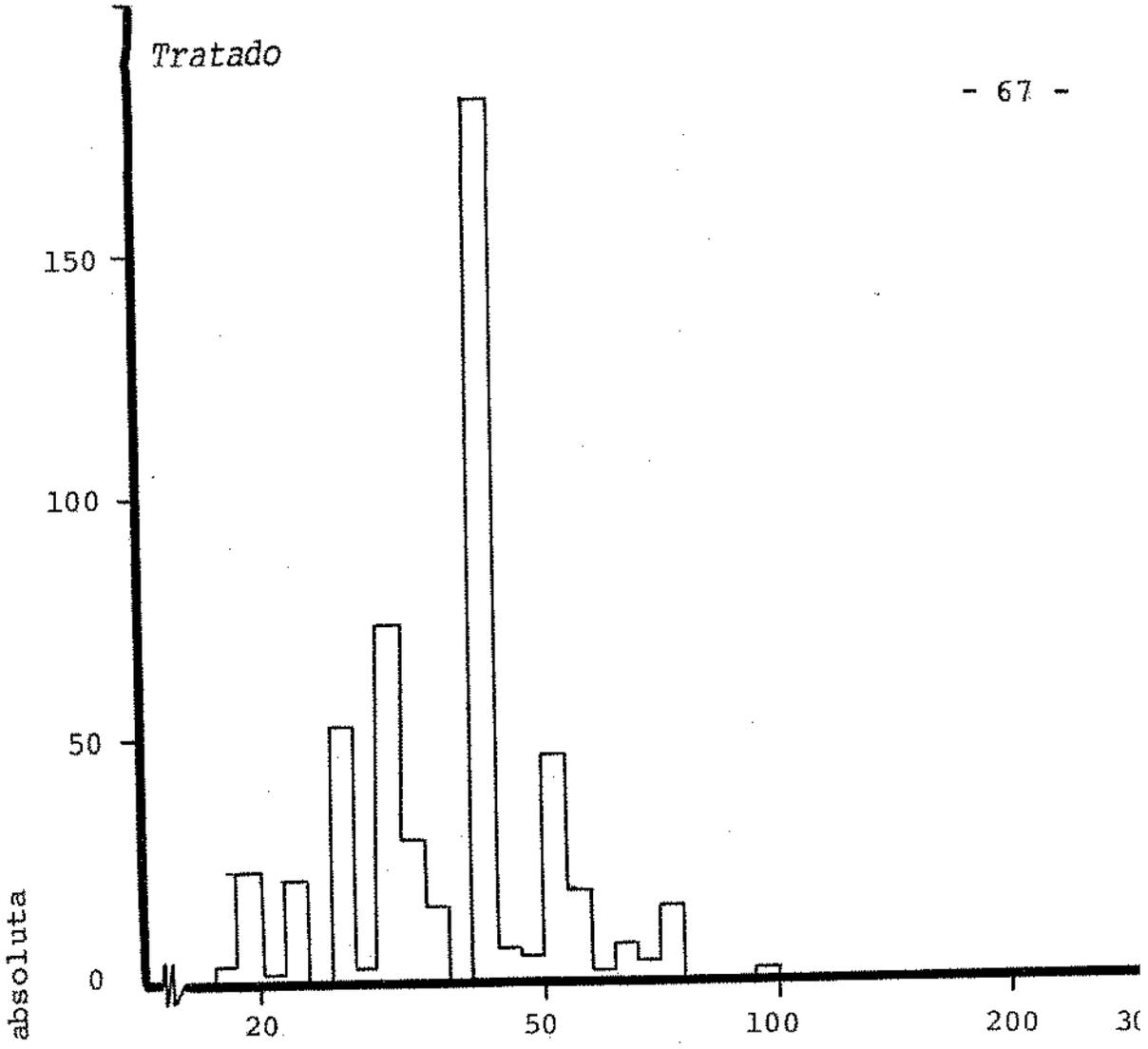
TABELA 24 - Médias e erro padrão das médias dos volumes nucleares das fibras musculares cardíacas dos ventrículos, em micrômetros cúbicos, dos animais controle e tratados sacrificados no 15º dia de vida.

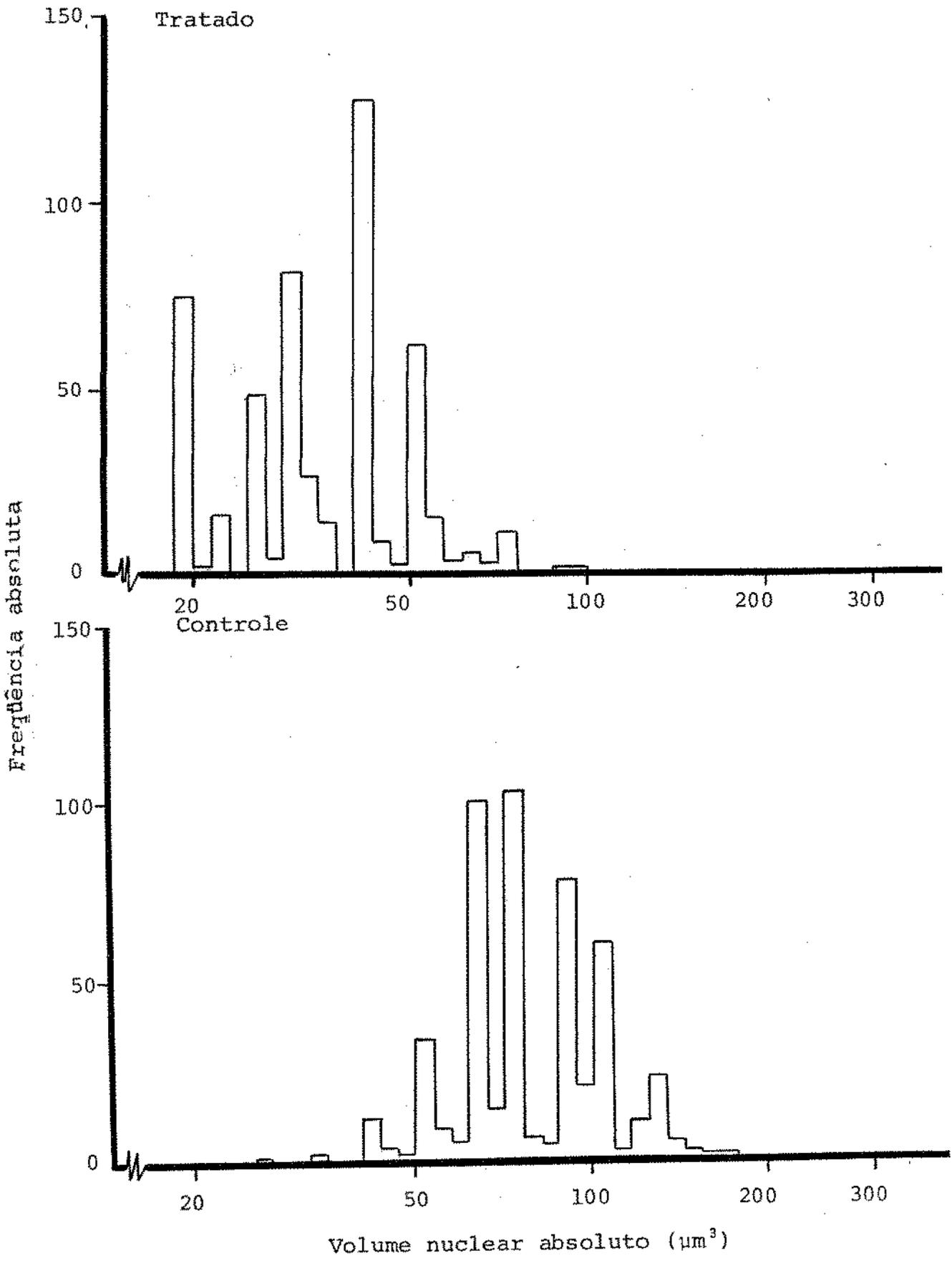
Controle	Tratado
65,47	45,03
83,21	36,79
85,65	41,38
95,52	37,91
78,30	26,73
\bar{x}	\bar{x}
81,63	37,56
(\pm 10,99)	(\pm 6,86)





Volume nuclear absoluto (μm^3)





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 materna de vitamina A era teratogênica foi HALE (1935). Este autor observou em suínos, malformações como fenda palatina, lábio leporino, microoftalmia 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 provocaram 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 & 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 produziam embriões que também eram portadores de malformações como: anencefalia, anopia, hipoplasia das órbitas, espinha bífida, lábio leporino, malformações de membros e presenças de hérnias.

Segundo MARIN-PADILHA (1966) em ratas grávidas, os efeitos 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 foi observado malformações visíveis nem reabsorções de embri-

ões. 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 por 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, porém com peso corporal menor do que o peso dos animais controle. Esta alteração ponderal persistiu durante todo o experimento.

Um fato que explicaria o baixo peso poderia ser devido à redução na ingestão de alimentos pela mãe em consequência da diminuição de apetite após a injeção de vitamina A, tendo IUCIF & cols. (1972) demonstrado que animais hipervitaminóticos apresentavam uma diminuição do volume do estômago, portanto ingeriam menor quantidade de alimentos, fato que comprometia a nutrição dos fetos. Associado a este item poder-se-ia também levar em conta a maior eliminação de urina pela rata como foi demonstrado por PETENUSCI & cols. (1978), em ratos com hipervitaminose A. A perda de água cada vez mais constante pela mãe e a maior excreção de proteína pela urina poderia também ser responsável pelo baixo peso dos filhotes ao nascimento.

Já, o peso ventricular não acompanhou o peso corporal dos animais, pois apesar do peso ventricular médio dos animais controle recém-nascidos, ser maior (27,95 mg) do que os tratados (20,50mg), no final do experimento, ou seja, aos 15 dias, os pesos

ventriculares foram maiores nos tratados (170,10 mg) do que o dos controle (96,82 mg). Este fato sugere uma hiperplasia do ventrículo do coração dos ratos tratados provocados pela vitamina A.

Histologicamente, os ventrículos dos corações dos animais cujas mães receberam vitamina A no décimo dia de gestação apresentaram diferenças estruturais representadas por diminuição do número de figuras de mitoses nos recém-nascidos, fibras musculares mais delgadas com estriações transversais não tão evidentes como nos controle e o tecido intersticial aumentou consideravelmente entre as fibras (Figuras 3 E, 3 F, 4 A, B, C e D). Este fato sugere que a vitamina A teria provocado uma proliferação de fibras colágenas no miocárdio ventricular desses animais. Esta proliferação de fibras colágenas poderia explicar o aumento de peso ventricular observado nos vários períodos estudados.

Os nossos resultados morfométricos confirmaram os achados histológicos, uma vez que os resultados obtidos com o emprego da Técnica de CHALKLEY (1943) revelaram que a vitamina A provocou uma diminuição do citoplasma das fibras musculares cardíacas e um aumento do tecido intersticial, quando comparados aos resultados dos animais controle (vide Tabelas 9, 10, 11 e 12 e Figuras 5, 6, 7 e 8).

Os núcleos das fibras musculares foram avaliados morfometricamente com o emprego da cariometria, quando se observou que os volumes nucleares dos ratos tratados eram menores que os dos controle em todos os períodos experimentais.

Uma explicação razoável que esclarece o fenômeno da diminuição percentual do citoplasma das fibras, obtido pela técnica de CHALKLEY (1943), poderia ser considerada, como resultante da ação direta da vitamina A nas membranas dos mioblastos

durante o desenvolvimento intra-uterino, pois a análise histológica mostrou uma diminuição das mitoses, o que certamente ocorreu pela degeneração de grande número das 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 (1961) & DINGLE (1961) a liberação das enzimas lisossomais dependem em muito da concentração de vitamina A.

Sabe-se que a vitamina A é mobilizada do fígado e levada 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 efeito 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 a 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 esteres do retinol, associado a lipoproteínas de pequena densidade. Desta maneira a liberação desregulada e não específica de vitamina A até os tecidos levaria a toxicidade. Tais fatos receberam apoio no estudo sobre o transporte

de vitamina A em humanos, realizado por SMITH & GOODMAN (1976). A possível ação direta da vitamina A sobre os mioblastos e fibras do coração em desenvolvimento recebe apoio nos trabalhos de STREBEL & cols., (1969), os quais trabalhando com o coração de ratos adultos, observaram que a administração oral de vitamina A sob a forma de ester não atuaria sobre as fibras cardíacas, pois uma vez absorvida pelo intestino seria transformada na forma alcoólica. Por outro lado, a administração da droga por via intraperitoneal, como a executada neste trabalho, possibilitaria a uma maior quantidade de vitamina A, passar através da placenta para os fetos e atingir o coração destes na sua forma original de ester, resultando no desencadeamento de alterações degenerativas das membranas, incluindo lisossomos dos mioblastos e fibras musculares dos corações dos fetos.

Uma outra atuação da vitamina A sobre os mioblastos seria a de maneira indireta, mediada pela adrenal materna, pois sabe-se que a vitamina A atua diretamente na função dessa glândula (SELYE, 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 (AHUJA & MISRA, 1973, citado em RAM & MISRA, 1975; 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 hiperplasia e hiperfunção da adrenal mediada pela hipófise. RAM & MISRA (1975), admitiram que nos casos de estimulação máxima da adrenal pela vi

tamina A, a síntese e liberação de corticosteróides também deveria ser máxima, vindo assim a proteger a membrana 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 no rato jovem, provoca uma diminuição nos níveis de colesterol e de ácido ascórbico na glândula adrenal e sabe-se que o ácido ascórbico inibe a rutura da cadeia lateral do colesterol, influenciando conseqüentemente 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 adrenocorticóides resultando na desintegração dos lisossomos e desencadeando portanto processo degenerativo nos mioblastos dos corações dos animais utilizados.

Outra explicação razoável para a diminuição percentual de citoplasma de fibras musculares e conseqüentemente um aumento gradativo do conjuntivo intersticial poderia basear-se aos efeitos de catecolaminas liberadas no plasma materno, atuando diretamente no coração fetal em desenvolvimento. Sabe-se que as catecolaminas podem exercer uma ação destrutiva no miocárdio (RAAB, 1953, 1963; RONA & cols., 1959; FERRANS & cols., 1969), sendo liberadas em conseqüência do stress nutricional pelo qual passam as mães que receberam vitamina A, ingerindo uma menor quantidade de alimento, o que poderia levá-las a uma carência proteica. PISSAIA & cols., 1980, já haviam demonstrado em ratos mal nutridos alterações cardíacas traduzidas por miocitólise e aumento do conjuntivo no coração. A exposição continuada durante um certo tempo dos animais em formação aos níveis elevados de catecolaminas, poderia desempenhar um papel importante no desenvolvimento do tipo tecidual característico observado nos nossos animais tratados, desenvolvido durante a vida intra uterina.

5. CONCLUSÕES

Os ventrículos dos corações de ratos cujas mães receberam 30.000 UI de vitamina A no 10º dia de gestação e dos seus controles, foram estudados histológica e morfometricamente, o que permitiu ao autor as seguintes conclusões:

1. O peso corporal dos animais cujas mães receberam uma única dose de vitamina A no décimo dia de gestação, apresentou-se menor durante os períodos experimentais, em relação aos dos animais controle.
2. O peso dos ventrículos dos corações dos animais tratados foi maior do que o dos animais controle, sugerindo uma hipertrofia ventricular provocada pela vitamina A.

3. A análise histológica demonstrou que os ventrículos dos corações dos animais tratados apresentaram diminuição do número de figuras de mitoses, fibras musculares mais delgadas e um tecido intersticial consideravelmente maior, quando comparados aos ventrículos dos animais controle.

4. Os achados acima foram confirmados morfometricamente pela técnica de CHALKLEY (1943), a qual demonstrou um aumento percentual do tecido intersticial e uma pequena diminuição do citoplasma das fibras musculares, no coração dos animais tratados quando comparados aos animais controle.

5. Os estudos morfométricos evidenciaram um volume nuclear menor nos animais tratados em relação aos animais controle.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMES, S.R.; SWANSON, W.J.; RISLEY, H.A. & HARRIS, P.L.
Vitamin A aldehydes metabolism, biopotency an toxicity. Fed.Proc., 13: 174, 1954.
- APPELMANS, F. & DE DUVE, C. Further observations on the binding of acid phosphatase by rat liver particles. Biochem. J., 59: 426, 1955.
- BERN, H.A.; ELIAS, J.J.; PICKETT, P.B.; POWAR, T.R. & HARKNESS, M.N. The influence of vitamin A on the epidermis. Amer. J. Anat., 96: 419-441, 1955.
- CHACKO, K. Ultrastructural observations on mitosis in myocardial cells of the rat embryo. Amer. J. Anat., 135: 305-311, 1972.

- CHALKLEY, H.W. Method for the quantitative morphologic analysis of tissues J. Nat. Cancer Inst., 4: 47, 1943.
- CHEESEMAN, D.F.; LEE, W.L. & ZAGALSKY, P.F. Carotenoproteins in invertebrates. Biol. Rev. 42: 131-160, 1967.
- COLLAZO, J.A.; RODRIGUES, J.S. Hypervitaminosis A. Klin Wschr., 12: 1732-34, 1933.
- COSTA, J.R.V. da. Efeitos da hipervitaminose A no músculo cardíaco do rato. Estudo Histopatológico e Morfométrico. Ribeirão Preto, 1982. Tese - Fac. Med. Rib. Preto - USP.
- COSTA, J.R.V. da & DIAS COSTA, A.M.D. Dados não publicados, 1984.
- COSTA, J.R.V. da, 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. da; IUCIF, S. & LOPES, R.A. Efeitos da hipervitaminose A na glândula lacrimal extra-orbitária do rato. Estudo morfológico e morfométrico. Ciência e Cultura, 31: 190-196, 1979.
- 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, 1966.
- DAVIES, A.W. & MOORE, T. Vitamin A and carotene. XI The distribution of vitamin A in the organs of the normal and hypervitaminotic rat. Biochem. J., 28: 288 - 95, 1934.

- DINGLE, J.T. Release of a bound protease by the action of vitamin A. Biochem.J., 79: 509, 1961.
- DINGLE, J.T. & LUCY, J.A. Studies on the mode of action of excess of vitamin A. V. The effect of vitamin A on the stability of the erythrocyte membrane. Biochem.J., 98: 173, 1962.
- DINGLE, J.T. & LUCY, J.A. Membrane phenomenon in relation to vitamin A. Proc.Nutr.Soc., 24: 170, 1965.
- 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, 1961.
- FELL, H.B.; DINGLE, J.T.; WEBB, M. The specificity on the effect on embryonic chick-limb cartilage in culture and on isolated rat liver lysosomes. Biochem. J., 83: 63-69, 1962.
- FELL, H.B. & MELLANBY, E. Metaplasia produced in cultures of chick ectoderm by high vitamin A. J.Physiol., 119: 470-488, 1953.
- 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 chick-limb-bone rudiments in culture. J. Exper.Med. 114: 343-462, 1961.

- FELL, H.B. & DINGLE, J.T. Studies on the mode of action of excess of vitamin A. Lysosomal protease and degradation of cartilage matrix. Biochem.J. 87: 403-408, 1963.
- FERRANS, V.J.; HIBBS, R.G.; WALSH, J.J. & BURCH, G.E. Histochemical and electron microscopical studies on the cardiac necrosis produced by sympathomimetic agents. Ann.N.Y.Acad.Sci. 156: 309, 1969.
- FRANQUIN, J.C.; KORNER, W.F.; WEISER, H. & BAUME, L'epithélium gingival du rat blanc soumis à une carence in vitamine A et à une hypervitaminose A. Schweiz Mschr. Zahnheilk., 19: 926, 1969.
- GANGULY, J. Metabolism of vitamin A. J.Sci.Ind.Res. 26: 110-130, 1967.
- GIROUD, A.; MARTINET, M.; ROUX, C. Urétéro - néphronose expérimentale chez l'embryon par hypervitaminose A. Arch.Franc.Pédiat., 15: 540-552, 1958.
- GIROUD, A.; MARTINET, M.; ROUX, C. Considérations a propos des hydronéphroses 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, 89 Bruxelles, 26- 28 de setembro, 1963. p. 15-21.
- GIROUD, A. & MARTINET, M. Malformations oculaires avec fibrose du vitré chez embryons de lapin soumis à l'hypervitaminose A. Soc.Ophth. de France, 3: 1-11, 1959.

- GLAUERT, A.M.; DANIEL, M.R.; LUCY, J.A.; & DINGLE, J.T.
Changes in the fine structure of erythrocyte during
haemolysis by vitamin A. J. Cell. Biol., 17: 111-121,
1963.
- 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. Ophthal., 18: 1087, 1935.
- HARDY, M.H. Glandular metaplasia of hair follicles and
other responses to vitamin A excess in cultures of
rodent-skin. J. Embryol. Exptl. Morph., 19: 157, 1968.
- HOPKINS, S.G. Feeding experiments illustrating the im-
portance of accessory factors in the normal dietari-
es. J. Physiol., 44: 425-460, 1912.
- IUCIF, S.; AZOUBEL, R.; LOPES, R.A.; BUONAROTT, I. &
ABREU, L.M.C. Ação da hipervitaminose A no estômago
do rato adulto. Rev. Fac. Farm. Odont. Rib. Preto, 9: 47,
1972.
- JANOFF, A. & MCCLUSKEY, R.T. Effect of excess vitamin
A on acid-phosphatase content of quinea pig perito-
neal leucocytes. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.,
110: 586-589, 1962.
- KAHN, R.H. Effect of locally applied vitamin A and es-
trogen on the rat vagina. Am. J. Anat., 95: 309-28,
1954.

- KALTER, H.G. & WARKANY, J. Congenital mal formation of the rectum and uro-genital system enduced by maternal hypervitaminosis A in strains of inbred mice. Anat. Rec., 136: 219, 1960.
- KALTER, H.G. & WARKANY, T. Experimental production of congenital malformations in strains of inbred mice by maternal treatment with hypervitaminosis A. Amer.J. Pathol., 38: 1-22, 1961.
- LAMANO CARVALHO, T.L. Estudo da reversibilidade das lesões testiculares de ratos adultos submetidos à hipervitaminose A. Ribeirão Preto, 1977. Dissertação de Mestrado; Rib. Preto - USP .
- LAWRENCE, D.J. & BERN, H.A. On the specificity on the response of mouse epidermis to vitamin A. J. Invest. Derm., 31: 313-325, 1958.
- LAWRENCE, D.J. & BERN, H.A. Mucous metaplasia and mucous gland formation in keratinized adult epithelium in situ treated with vitamina A. Exp.Cell.Res., 21: 443-446, 1960.
- LAWRENCE, D.J. & BERN H.A. Vitamin A and mucous metaplasia. Ann. N.Y. Acad. Sci., 106: 646-653, 1963.
- LAWRENCE, D.J., BERN, H.A. & STEDMAN, M.G. Vitamin A and keratinization. Ann. Otol., 69: 645, 1960.
- LEELAPRUTE, V.; BOONPUCKNAVIG, V; BHAMARAPRAVATI, N. & VEERAPRADIST, W. Hypervitaminosis A in rat. Arch. Pathol., 96: 5, 1973.

LEMOS MOURA, S.; IUCIF, S.; LOPES, R.A.; COSTA, J.R.V. & AZOUBEL, R. Hipervitaminose A experimental no rato. Estudo morfológico e morfométrico do cortex e da medula da Adrenal. Medicina, 11: 1 - 10, 1980.

LOPES, R.A. Efeitos da hipervitaminose A sobre o testículo e o rim do rato, durante a lactação: Estudo alométrico e histopatológico. Ribeirão Preto, 1973, Tese, Fac.Farm.Odont.Rib. Preto - USP.

LOPES, R.A. Estudo da reversibilidade das lesões glandulares salivares de ratos submetidos a hipervitaminose A. Ribeirão Preto, 1978, Tese - Fac.Farm.Odont. Rib. Preto - USP.

LUCY, J.A.; DINGLE, J.T. & FELL, H.B. A possible role of intracellular proteases in the gradation of cartilage matrix. Biochem.J., 79: 500, 1961.

LUCY, J.A.; LUSCOMBE, M. & DINGLE, J.T. Studies on the mode of action of excess of vitamin A. VIII. Mitochondrial swelling. Biochem.J., 89: 419, 1963.

MADDOCK, C.L.; COHNE, J. & WOLBACH, S.B. Effect of hypervitaminosis A on the testes of the rat. Arch.Path. 56: 333-40, 1953.

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. Mesodermal alterations induced by hypervitaminosis A. J. Embryol. Exper.Morphol., 15: 261-269, 1966.

- 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.
- MATHUR, A.R.; RAMANATHAN, R. & MISRA, U.K. Effects of feeding excess of vitamin A and vitamin C on liver, plasm and adrenal lipids of rats. Internat. J. Vit. Nutr. Res., 44: 19-25, 1973.
- MCCOLLUM, E.V. & DAVIS, M. The necessity of certain lipids in the diet during growth. J. Biol.Chem. 15: 167-175, 1913.
- MELAX, H. & LEESON, T.S. Electron microscope study of myocardial tissue space contents in rat heart. Cardio vasc. Res., VI: 89-94, 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.
- MOORE, T. Vitamin A. Amsterdam, Elsevier, 1957.
- MOORE, T. Vitamin A and Proteins. Vitamin. & Horm. 18: 431-437, 1964.
- MOORE, T. Vitamin A deficiency and excess. Proc.Nutr. Soc., 24: 129-135, 1965.
- MOORE, T. & WANG, Y.L. Hypervitaminosis A. Biochem.J., 39: 222-228, 1945.

- 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.
- NICHELE, G. & CARLINO, L. Superdosaggio di vitamin A nel ratto albino. Pediat.Internaz., 4: 401, 1953.
- OSBORNE, T.B.; & MENDEL, L.B. The influence of cod liver oil and some other fats on growth. J. Biol. Chem. 17: 401-408, 1914.
- PICCOLO, A.M.; LOPES, R.A.; PETENUSCI, S.O.; COSTA, J. R.V. & CAMPOS, M.C. Efeitos da hipervitaminose A na porção serosa da glândula nasal lateral do rato. Biológica, 4: 3-11, 1978.
- PETENUSCI, S.O.; LOPES, R.A. & TONELLA, J. Estudo de alguns parâmetros fisiológicos e metabólicos em ratas submetidas à hipervitaminose A. Rev.Fac.Farm.Odont., Ribeirão Preto, 15: 91, 1978.
- PISSAIA, O.; ROSSI, M.A. & OLIVEIRA, J.S.M. The heart in protein-calorie malnutrition in rats: morphological, electrophysiological and biochemical changes. J. Nutr., 2035, 1980.
- RAAB, W. Hormonal and neurogenic cardiovascular disorders. Baltimore: Willians and Wilkins Co., 1953.
- RAAB, W. Neurogenic multifocal destruction of myocardial tissue. Rev.Canad.Biol., 22: 217, 1963.

- RAM, G.C. & MISRA, V.K. Effects of vitamin A and phenobarbital on liver endoplasmatic 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 hiper vitaminosis A on rat submandibular gland. Archs:oral Biol., 17: 1609-1618, 1972.
- RODAHL, K. Hypervitaminosis A in rat. J. Nutr., 41: 399, 1950.
- RODAHL, K. & MOORE, T. The vitamin A content and toxicity of bear and seal liver. Biochem.J. 37: 166-168, 1943.
- 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: 1.020, 1969.
- RONA, G.; CHAPPEL, C.I.; BALASZ, T. & GAUDRY, R. An infarctlike myocardial lesion and the toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. Arch. Path., 67: 443, 1959.
- ROUX, C.; FOURNIER, P. DUPUIS, Y. & DUPUIS, R. Carence tératogène en vitamin A. Biol. Néonat., 4: 371-8, 1962.
- SABELLA, J.D.; BERN, H.A. & KAHN, P.H. Effect on locally applied vitamin A and estrogen on rat epidermis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 76: 499, 1951.

- SELYE, H. Sensitization of the skeleton to vitamin A overdose by cortisol. Arthritis Rheum., 1: 87, 1958.
- SIEGEL, S. Nonparametric Statistics for the Behavioral Science, N. York, Mc Graw-Hill, 1956.
- SMITH, F.R. & GOODMAN, D.S. Vitamin A transport in human vitamin A toxicity. N. Engl. J. Med., 294: 805, 1976.
- STEENBOCK, H. Special articles - White corn vs. yellow corn and a probable relation between the fat-soluble vitamins and yellow plant pigments. Science, 50: 352-353, 1919.
- STREBEL, R.F.; GIRERD, J. & WAGNER, B.M. Cardiovascular calcification in rats with hypervitaminosis A. Arch. Path., 87: 290, 1969.
- TAKEKOSHI, S. The mechanism of vitamin A induced teratogenesis. J. Embryol. Exp. Morphol., 12: 263, 1964.
- THOMAS, L.; McCLUSKEY, R.T.; PORTER, J.L. & WEISSMANN, G. Comparison of the effect of papain and vitamin A on cartilage. I. The effects in rabbits. J. Exp. Med., 111: 705, 1960.
- VALERI, V.; CRUZ, A.R.; BRANDÃO, J.S.H. & LISON, L.A. Relationship between cell nuclear volume and deoxyribonucleic acid of cell of normal epithelium, of carcinoma "in situ" and of invasive carcinoma of the uterine cervix. Acta Cytol., 11: 488, 1967.
- WEISS, P. & JAMES, R. Skin metaplasia in vitro induced by brief exposure to vitamin A. Exp. Cell. Res., 3 (suppl.) : 381, 1955.

WEISSMANN, G.; UHR, J.W. & THOMAS, L. Acute hypervitaminosis A in quinea-pigs. 1. Effects on acid hydrolases. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 112: 284, 1963.

WEST, E.S.; TODD, W.R.; MASON, H.S. & VAN BRUGGEN, J. T. Bioquímica médica. Interamericana, 4a. Edição , 1969.

WILSON, J.G. & WARKANY, J. Malformations in the genitourinary tract induced by maternal vitamin A deficiency in the rat. Amer. J. Anat., 83: 357-408, 1948.

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