

IVANIRA JOSÉ BECHARA

"ESTUDOS CARIOLÓGICOS EM CÉLULAS DE CAMUNDONGOS APÓS TRATAMENTO COM OXAMNIQUINE. / I. ESTRUTURA CROMATÍNICA. II. FREQUÊNCIA DE TIPOS NUCLEARES EM MÚSCULO CARDÍACO".

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia da
UNICAMP para obtenção do
grau de Mestre em Biologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza S.Mello

Campinas - SP

1981

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais
e irmãs.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello, pela sua orientação constante, segura e consciente.

Ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da UNICAMP, onde o presente trabalho foi realizado, na pessoa de seus professores, colegas e funcionários, pela amizade e colaborações prestadas.

Ao Prof. Dr. José Antonio Cordeiro, do Departamento de Estatística do Instituto de Matemática, Estatística e Ciência da Computação da UNICAMP, pela sua orientação nos testes estatísticos da segunda parte deste trabalho e também pela sua atenção, dedicação e interesse sempre constantes.

Ao Prof. Dr. Luiz Cândido de Souza Dias, pelo fornecimento do xarope Mansil utilizado neste trabalho.

As funcionárias do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela atenção e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro, sob a forma de uma Bolsa de Mestrado.

À sra. Maria Célia Giorgi Almeida, pelo excelente trabalho de datilografia.

À minha irmã Ana, pela boa vontade e valiosa ajuda na montagem das fotografias.

Aos meus pais, por todo apoio e compreensão sem
pre demonstrados.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para
minha formação e me ajudaram durante a realização deste traba-
lho.

ÍNDICE

I.	INTRODUÇÃO	1
II.	MATERIAIS E MÉTODOS	6
	1. Basofilia e anisotropia nucleares	6
	2. Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco	9
III.	RESULTADOS	12
	1. Basofilia e anisotropia nucleares	12
	2. Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco	31
IV.	DISCUSSÃO	96
	1. Basofilia e anisotropia nucleares	96
	2. Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco	97
V.	CONCLUSÕES	99
VI.	RESUMO	100
VII.	SUMMARY	101
VII.	BIBLIOGRAFIA	102

I. INTRODUÇÃO

A oxamniquine (6-hidroxi-metil-2-isopropilamino-metil-7-nitro-1,2,3,4-tetrahidroquinoleína), uma droga usada com bastante eficiência no tratamento da esquistossomose, foi descrita inicialmente em 1969, por RICHARDS & FOSTER. Ela é preparada a partir do composto UK-3883 por hidroxilação micro-biológica na presença do fungo *Aspergillus sclerotiorum*. Caracteriza-se por possuir considerável atividade esquistossomocida e baixa toxicidade em animais de laboratório. Quando administrada em camundongos, coelhos, cães e macacos por via oral ou intramuscular, a oxamniquine não produziu efeitos colaterais graves ou toxicidade (FOSTER, 1973). Em camundongos, a administração oral de 750 mg/kg/dia da droga durante 30 dias consecutivos provocou aparecimento de ligeiras alterações morfológicas no fígado (mas nenhuma alteração nos níveis de transaminase glutâmico oxalacética e transaminase glutâmico pirúvica) e um decréscimo na frequência de leucócitos e hemácias (FOSTER, 1973).

No homem tem sido relatado que a administração da droga através da injeção intramuscular causa dois efeitos colaterais constantes. Primeiro, uma dor intensa, endurecimento, calor e rubor no local da injeção (COUTINHO *et al.*, 1973; FOSTER, 1973). O segundo efeito colateral é febre leve e moderada (37°C a 38,5°C), relatada para 22,9% dos pacientes com esquistossomose mansônica, submetidos ao tratamento com oxamniquine (COUTINHO *et al.*, 1973). A análise do hemograma nestes pacientes não mostrou nenhuma alteração das sé-

ries vermelha e branca. O estudo comparativo da radiografia do tórax não revelou alteração significativa no coração e nos pulmões (COUTINHO *et al.*, 1973). Tão pouco qualquer alteração no fígado foi observada, empregando-se para estudo biopsia hepática (SILVA *et al.*, 1973).

No entanto, alguns autores (COUTINHO *et al.*, 1973; KATZ *et al.*, 1973; PEDRO *et al.*, 1973) relataram certas alterações eletrocardiográficas em alguns de seus pacientes tratados com oxamniquine. Essas alterações parecem indicar, pelo menos nos pacientes referidos por KATZ e colaboradores (1973), anóxia do miocárdio e hipertensão pulmonar. A porcentagem dos pacientes com alterações nos eletrocardiogramas após tratamento com oxamniquine variou conforme o grupo estudado: 3% (PEDRO *et al.*, 1973), 3,7% (COUTINHO *et al.*, 1973) e 35,4% (KATZ *et al.*, 1973).

Estudos ao nível celular mostram que o uso da oxamniquine não acarreta aberrações cromossômicas *in vitro* (HOLDEN *et al.*, 1974) nem tão pouco em pacientes portadores de esquistossomose (MONSALVE *et al.*, 1976). Não se sabe, porém, se ela atua nos cromossomos, ao nível do DNA, alterando a sua conformação e a sua complexação com proteínas como acontece, por exemplo, em células tratadas com hycanthone (MELLO *et al.*, 1978).

O hycanthone é também uma droga utilizada para tratamentos clínicos da esquistossomose, introduzida anteriormente à oxamniquine, e com algumas contra-indicações. Ele induz anomalias cromossômicas em linfócitos humanos, medula óssea de ratos e em células vegetais (OBE, 1969; GREEN *et al.*,

1973; ROCHA & KATZ, 1973; SIEBER *et al.*, 1973). Também induz decréscimo nos índices mitóticos e bloqueios mitóticos (ROCHA & KATZ, 1973).

Em nível molecular, o hycanthone se intercala no interior da molécula de DNA alterando a sua conformação em dupla hélice e afetando a sua complexação com proteínas. Desta forma, surgem alterações nas propriedades de basofilia e birrefringência dos cromossomos tratados com solução de azul de toluidina a pH 4,0, o que foi verificado em células meristemáticas de *Allium cepa* (MELLO *et al.*, 1978).

Os padrões de basofilia e anisotropia nucleares de material animal ou vegetal tratado com solução de azul de toluidina se devem à ligação de moléculas de azul de toluidina com os grupos fosfatos disponíveis (não ligados a proteína) de DNA e RNA (LISON, 1960; MELLO & VIDAL, 1974). Quando as moléculas de azul de toluidina se ligam a fios de DNA puro, elas formam uma hélice em torno da dupla hélice do DNA. Uma vez que as moléculas de azul de toluidina se ligam a grupos fosfatos próximos os elétrons ressonantes das moléculas de corante interagem entre si. Assim, um fio de DNA puro com a grande maioria de seus grupos fosfatos ligados a moléculas de azul de toluidina irá apresentar uma basofilia metacromática (cor violeta escuro) caracterizada por uma curva espectral de absorção com um pico em $\lambda \approx 550$ nm. A birrefringência, por sua vez, apresenta-se com uma cor de interferência amarela-esverdeada brilhante. Já para o caso de moléculas de DNP, onde parte dos grupos fosfatos do DNA estão bloqueados por proteína, menos moléculas de azul de toluidina podem se ligar ao DNA.

Além disso, a distância entre as moléculas do corante é em geral maior do que no caso dos fios de DNA puro. A basofilia então irá se apresentar também metacromática, porém em cor violeta mais claro (liláz ou violeta-azulada) e o pico da respectiva curva espectral de absorção se deslocará para λ ao redor de 580 nm. A birrefringência mostra também uma cor amarela-esverdeada brilhante. Porém, se de algum modo a disponibilidade dos grupos fosfatos diminuir de forma que apenas algumas poucas moléculas de azul de toluidina possam se ligar a grupos fosfatos do DNA, não próximos entre si (ex.: núcleos de espermatozóide de gafanhoto em que a proteína complexada ao DNA é extremamente rica em resíduos de arginina) (MELLO & VIDAL, 1977) não ocorrerá a interação eletrônica entre as moléculas de azul de toluidina como acima mencionado, a basofilia se apresentará em cor esverdeada, o pico de absorção da curva espectral se deslocando, portanto, para $\lambda \approx 630$ nm. Neste caso, a birrefringência detectada será apenas a correspondente ao próprio DNA e terá uma cor branca pálida, diferindo daquela que é devida à orientação molecular do DNA, ela mesmo, mais a orientação dos polímeros de moléculas de azul de toluidina (MELLO & VIDAL, 1977). Não se pode esquecer a possibilidade de intercalação de moléculas de azul de toluidina entre as bases; mas nestas condições também não há interação entre os elétrons das moléculas de corante, e o pico de absorção seria observado acima de 630 nm (MIURA & OHBA, 1967).

Em células de *Allium cepa* tratadas com oxamiquine, no entanto, os padrões de basofilia nuclear, anisotropia nuclear, bem como os valores dos índices mitóticos permanecem inalterados (BECHARA & MELLO, 1979). No entanto, estes

dados não puderam ser extrapolados para células animais, uma vez que não se conhece se a oxamniquine necessita ser metabolizada no organismo para manifestar sua ação. Por esta razão, nos pareceu de interesse analisar os padrões de basofilia e anisotropia nucleares de hepatócitos, de células do músculo cardíaco e de linfócitos de camundongos tratados com oxamniquine, o que é um dos objetivos do presente trabalho. Os núcleos corados com solução de azul de toluidina a pH 4,0 foram analisados ao microespectrofotômetro e ao microscópio de polarização e os dados obtidos para os animais tratados foram comparados com os de animais controle.

Por outro lado, em face aos dados de alterações nos eletrocardiogramas de alguns seres humanos tratados com oxamniquine, conforme já mencionado acima, uma possibilidade poderia ser levantada de que alterações celulares e/ou nucleares pudessem também ocorrer em corações de animais tratados. Sabe-se que certas alterações metabólicas (exemplo, hipóxia por altitude) podem induzir hipertrofia cardíaca (STERE *et al.*, 1978). Por outro lado, muitas vezes a hipertrofia se reflete no tamanho nuclear e mesmo no conteúdo de DNA dos núcleos da musculatura cardíaca (SANDRITTER *et al.*, 1964; FISCHER *et al.*, 1970; ADLER, 1976).

Como indicação de que alterações desse tipo pudessem ser induzidas pela oxamniquine na musculatura cardíaca de animais tratados comparada à de animais controle, a constatação de uma modificação da frequência de tipos nucleares, classificados segundo tamanho e forma, sem dúvida seria de valor. Um levantamento deste tipo foi realizado também neste trabalho e constitui o segundo objetivo do mesmo.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Basofilia e anisotropia nucleares

Foram utilizados 10 camundongos machos com 3 meses de idade e peso igual a $35,5 \text{ g} \pm 1,3$ criados no laboratório.

0,31 ml de solução de Mansil xarope (da marca Pfizer) contendo 15,5 mg de oxamniquine (solução final $17,9 \times 10^{-2} \text{ M}$), foram administrados aos camundongos por via oral, pela técnica de entubação (portanto, 436 mg/Kg). A dose eficaz em camundongos é de 44 mg/Kg e letal, 1300 mg/Kg (FOSTER, 1973). Dois camundongos, considerados controle, receberam apenas água. Os camundongos foram sacrificados, por decapitação, após diversos tempos de administração da droga (12 hs, 24 hs, 48 hs, 7 dias). No momento da decapitação, colheu-se sangue dos animais, efetuando-se esfregaço do mesmo. Dos camundongos ainda, retiraram-se o fígado e o miocárdio. Usando-se fatias de fígado foram feitos decalques sobre lâminas. Fragmentos do músculo cardíaco foram utilizados para esmagamento. Dois animais experimentais foram sacrificados em cada tempo. Dois animais controle foram sacrificados concomitantemente aos animais experimentais mortos, contando-se 24 horas e 7 dias após administração da droga.

O sangue para os esfregaços foi colhido em um bēker contendo EDTA a 3% para evitar a coagulação. A seguir, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, uma gota dessa mistura

(sangue + EDTA) foi depositada em cada lâmina e feitos os esfregaços. As lâminas foram deixadas secar, depois mergulhadas em solução de etanol acético (3:1) por aproximadamente 2 minutos, a seguir em etanol a 70% (1 minuto) e então deixadas secar ao ar. De cada animal foram preparadas 5 lâminas de esfregaço de sangue.

Com relação aos decalques de fígado, estes foram obtidos encostando-se levemente a superfície plana de uma fatia de fígado às lâminas. Estas foram, então, mergulhadas em etanol acético (3:1) por 2 minutos, depois em etanol a 70% por 1 minuto e deixadas secar ao ar. De cada animal foram preparadas 5 lâminas com decalques.

Quanto ao miocárdio, seu *ápex* (GRANT, 1946) foi removido e fixado em etanol acético (3:1) por 5 a 10 minutos. Pequenos fragmentos do músculo cardíaco (1 mm, aproximadamente) foram, então, colocados sobre as lâminas, sobre as quais já havia sido depositada uma gota de ácido acético a 45%. Estes fragmentos foram a seguir dissociados com estiletes e esmagados, entre lâmina e lamínula. As lamínulas foram removidas, congelando-se os preparados em nitrogênio líquido. As lâminas foram, em seguida, mergulhadas em etanol a 70% por 1 minuto e deixadas secar ao ar. De cada camundongo foram preparadas 5 lâminas de esmagamento de miocárdio.

Todas as lâminas foram coradas com solução de azul de toluidina a pH 4,0 por 15 minutos (LISON, 1960), após as mesmas terem sido mergulhadas em água destilada por 5 minutos e tratadas por uma solução aquosa a 0,05% de RNase (Sigma)

por 90 minutos a 37°C. A seguir, foram lavadas com água destilada e postas para secar ao ar. Depois de bem secos os preparados, foram eles diafanizados em xilol por 15 minutos e montados em bálsamo do Canadá (VIDAL, 1972).

De todas as lâminas foram feitas observações visuais da basofilia e anisotropia nucleares. Para as medidas citofotométricas de absorbância foram escolhidas as lâminas correspondentes aos tempos de administração da droga de 12 horas e 7 dias e lâminas controle. Tais medidas foram efetuadas em citofotômetro Zeiss equipado com fotômetro 01 e fotomultiplicador EMI 6256. As condições operacionais de medida foram as seguintes: objetiva 63/0.9, optovar 2, diafragma de medida com diâmetro igual a 0,16 mm, diafragma de campo com diâmetro igual a 0,2 mm, $\lambda = 500$ a 625 nm e luz não polarizada. Com as medidas de absorbância foram determinadas curvas de basofilia a partir das quais se constatou o comprimento de onda do pico de absorção. Calculou-se também o valor dos índices metacromáticos (IM) a partir dos dados de absorbância (A) em $\lambda = 625$ nm e $\lambda = 555$ nm ($IM = A_{\lambda = 555 \text{ nm}} / A_{\lambda = 625 \text{ nm}}$). Para este cálculo foram utilizadas 5 medidas das absorbâncias em cada condição experimental. Os valores de IM foram depois comparados estatisticamente entre si.

Para os núcleos de células do músculo cardíaco foram feitas medidas de absorbância, em separado, para regiões de eucromatina mais compacta e para regiões de eucromatina mais frouxa. Neste caso, examinaram-se, também, preparados de camundongos após 30 dias de tratamento com a droga e de um animal controle com idade correspondente a esse tempo.

As observações de anisotropia foram feitas nos mesmos preparados, corados com solução de azul de toluidina, em fotomicroscópio Pol-Zeiss, utilizando-se objetiva Plan 40/0.65, optovar 1,25 e 1,6, compensador de Bräceköhler $\lambda/10$ e luz UV polarizada.

2. Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco

Foram utilizados 14 camundongos machos, criados no laboratório, com 3 meses de idade e peso igual a $35,5 \text{ g} \pm 1,3$.

Destes, 10 receberam a solução de Mansil xarope na mesma quantidade e da mesma maneira já descrita no tópico 1 e 4 constituíram o grupo controle. Trinta dias após a administração da droga os camundongos foram sacrificados por decapitação, simultaneamente aos camundongos do grupo controle.

O *ápex* (GRANT, 1946) do miocárdio destes animais foi fixado em etanol acético (3:1) por 5 a 10 minutos. Pequenos fragmentos do músculo cardíaco (1 mm, aproximadamente) foram, então, esmagados como descrito no tópico 1. Foram preparadas 3 lâminas com material de cada camundongo tratado e 4 lâminas de cada camundongo controle. Todos estes preparados foram submetidos à reação de Feulgen, em que a hidrólise ácida se processou em HCl 4N durante 1 hora e 5 minutos, à temperatura de 25° C. No preparo do reativo de Schiff foi utilizada fucsina básica da marca Carlo Erba. Após a reação, os preparados foram desidratados, diafanizados em xilol por 10 mi

nutos e montados em bálsamo do Canadá.

De todas as lâminas foram determinadas as frequências de 7 tipos nucleares classificados segundo tamanho e forma. Os campos de medida foram escolhidos ao acaso e as contagens efetuadas conforme exposto na Tabela I.

As contagens foram efetuadas em um microscópio binocular da Zeiss, utilizando-se para tal ocular 8x, optovar 2x e objetiva 40x.

TABELA I - Número de campos observados em lâminas de camundongo controle e tratado.

Material	Número de camundongos	Número de lâminas por camundongo	Número de campos observados por lâmina	Total
Controle	4	4*	20	80*
Tratado	10	3**	5**	150

* No caso de um dos camundongos foram computados os tipos nucleares em 3 lâminas, observando-se um total de 60 campos.

** No caso de um dos camundongos foram computados os tipos nucleares em apenas 2 lâminas, observando-se um total de 8 a 7 campos por lâmina.

III. RESULTADOS

1. Basofilia e anisotropia nucleares

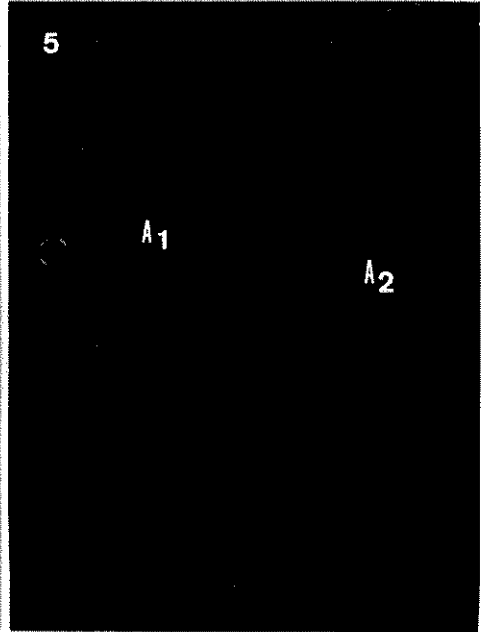
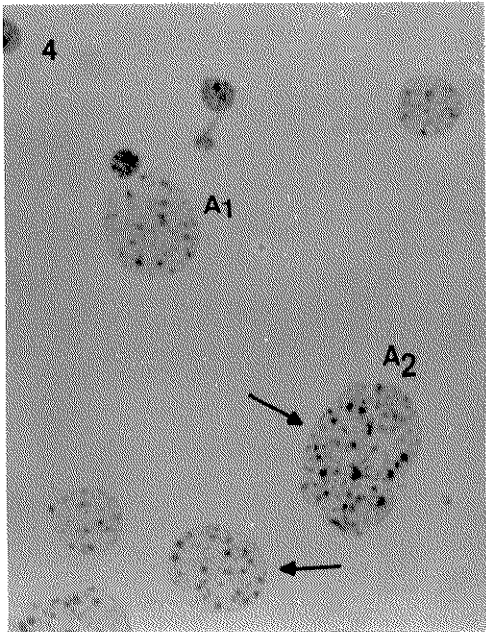
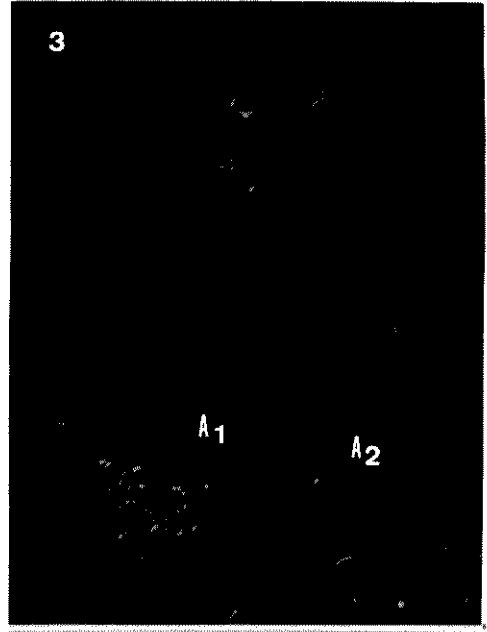
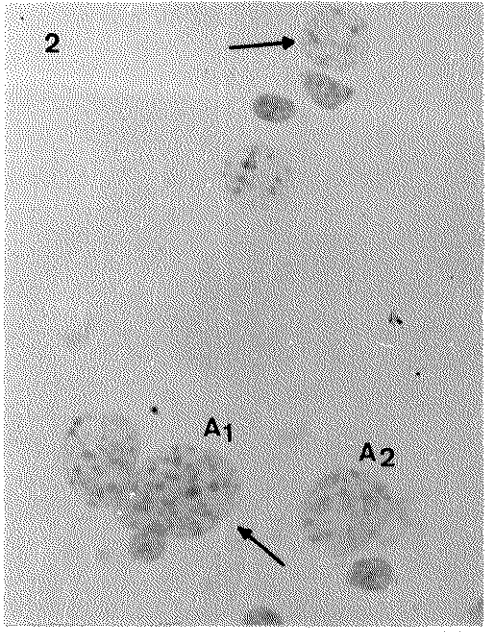
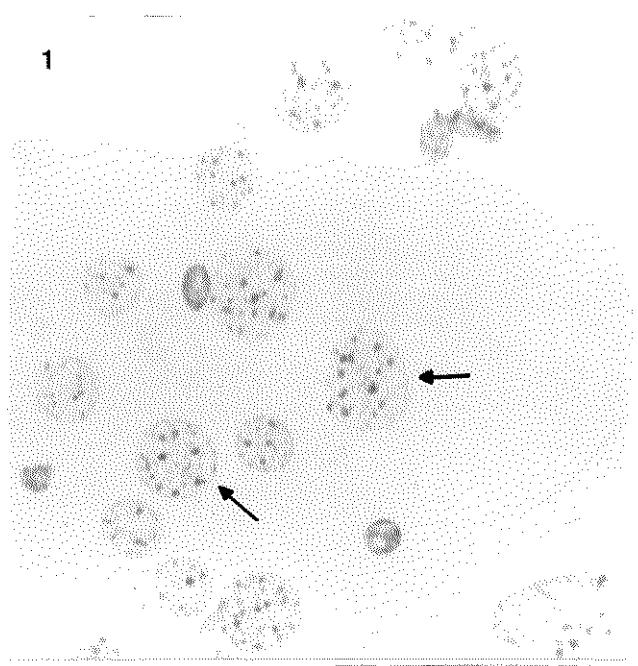
Os aspectos da basofilia e da anisotropia de núcleos de hepatócitos de camundongos tratados com RNase e corados com solução de azul de toluidina são mostrados nas Figuras 1 a 9. Tanto em termos de basofilia como de anisotropia não foram encontradas diferenças em aspecto visual quando se compararam os núcleos de hepatócitos de animais controle (Figuras 1 a 3) com os provenientes de animais tratados com oxamiquine (Figuras 4 a 9). De modo geral a birrefringência dos núcleos apresentou-se fraca e de difícil documentação (Figuras 3, 5, 7, 9).

Partindo-se da observação de que os aspectos visuais de basofilia são idênticos para as várias condições experimentais utilizadas neste trabalho, foram determinadas curvas espectrais de absorção apenas para os animais controle e para aqueles cujo tempo de administração da droga havia sido de 12 horas e 7 dias. Quando se compararam as curvas de absorção dos núcleos de hepatócitos nessas condições experimentais, não foram encontradas diferenças quanto ao λ do pico de absorção (Tabela II : $\lambda = 580 \text{ nm}$).

As curvas de absorção neste caso foram sempre determinadas em áreas nucleares de cromatina mais frouxa, não abrangendo cromocentros e afastando-se, portanto, a possibilidade de ocorrerem erros distribucionais. Os cromo-

FIGURAS 1 a 5 - Núcleos de hepatócitos de camundongos corados com solução de azul de toluidina a pH 4,0 após tratamento com RNase. As figs. 1, 2 e 3 mostram os núcleos de animais controle e as figs. 4 e 5 os de animais sacrificados 12 horas após administração de oxamniquine. As setas nas figs. 1, 2 e 4 indicam tipos de núcleos utilizados para as medidas citofotométricas. As figs. 3 e 5 são imagens de birrefringência das figs. 2 e 4, respectivamente. A letra A nas figs. 2 e 3 indica o mesmo núcleo em duas diferentes situações de observação. Idem para as figs. 4 e 5.

X 672.



FIGURAS 6 a 9 - Núcleos de hepatócitos de comundongos corados com solução de azul de toluidina a pH 4,0 após tratamento com RNase. As figs. 6 e 7 mostram os núcleos de animais sacrificados 12 horas após administração de oxamniquine. As figs. 8 e 9 mostram os núcleos de animais sacrificados 7 dias após administração da droga. As setas nas figs. 6 e 8 indicam tipos de núcleos usados para as medidas citofotométricas. As figs. 7 e 9 são imagens de birrefringência das figs. 6 e 8, respectivamente. A letra E nas figs. 6 e 7 indica o mesmo núcleo em duas diferentes situações de observação. Idem para as figs. 8 e 9. X 672.

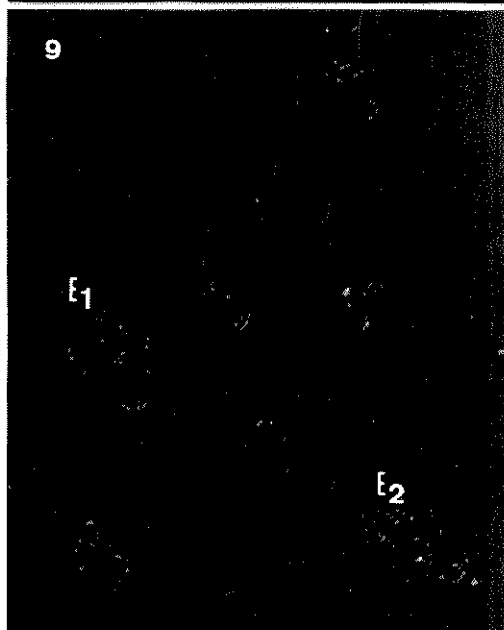
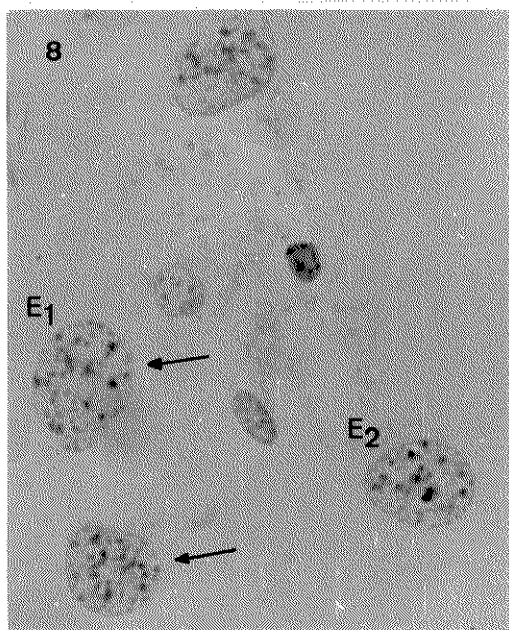
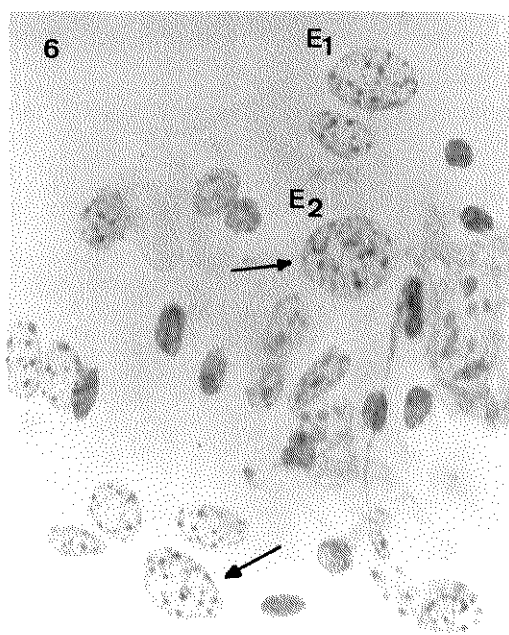


TABELA II - Picos de absorção e índices metacromáticos obtidos das curvas espectrais de núcleos de hepatócitos de camundongo corados com solução de azul de toluidina a pH 4,0 após tratamento com RNase.

Condições experimentais	λ do pico de absorção (nm)	Índices metacromáticos ($\bar{X} \pm S$) (n = 5)
Controle*	580	1,348 $\pm$ 0,229
12 hs após administração de oxamniquine	580	1,291 $\pm$ 0,071
7 dias após administração de oxamniquine	580	1,154 $\pm$ 0,105

* Animais sacrificados simultaneamente àqueles que haviam recebido a droga 24 horas antes.

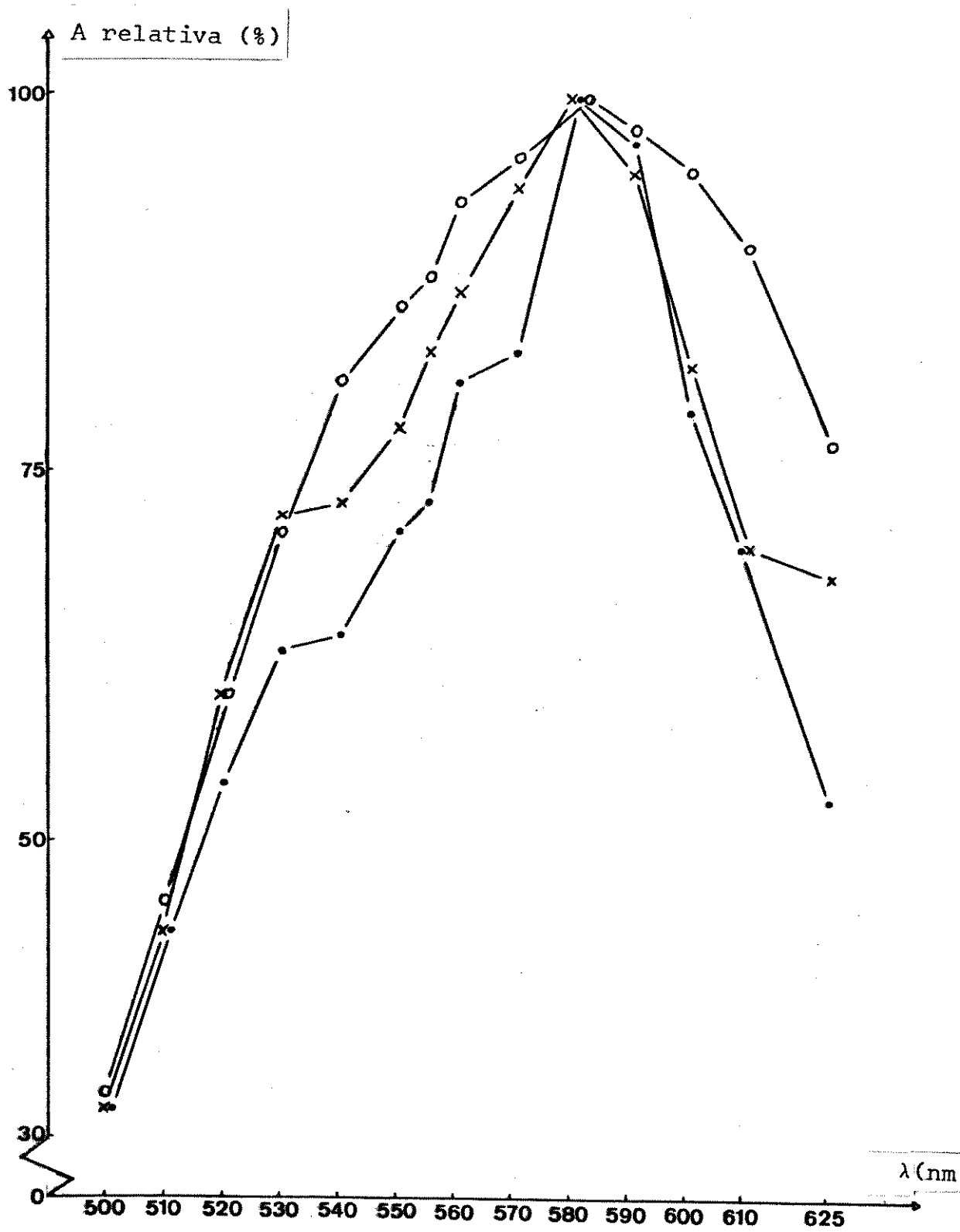
centros não puderam ter medidas efetuadas unicamente sobre sua área, pois esta é reduzida demais para tal. De preferência foram escolhidos para medida núcleos como os apontados na Fig. 1 (provavelmente 8n), com áreas ideais para medida citofotométrica. Exemplos das curvas espectrais são encontrados no Gráfico I. As curvas deste gráfico foram construídas com o objetivo único de se mostrar o λ do máximo de absorção. Também na Tabela II acham-se relatados os valores dos índices metacromáticos nas diversas condições já mencionadas. Esses índices foram comparados entre si (teste t e análise de variância),

GRÁFICO I - Curvas espectrais de absorção de núcleos de hepa
tócitos corados com solução de azul de toluidina
a pH 4,0 após tratamento com RNase.

- - controle*
- x - 12 horas após administração de oxamniquine
- o - 7 dias após administração de oxamniquine

* Animais sacrificados simultaneamente àqueles que haviam recebi
do a droga 24 horas antes.

A = absorbância



quando ficou determinado que diferenças entre cada par de médias não são estatisticamente significantes ($P_{0,01}$) (Tabelas III e IV).

TABELA III - Teste t calculado para as médias dos índices metacromáticos de núcleos de hepatócitos de camundongo (referentes à Tabela II).

Condições experimentais	t	G.L.
Controle X 12 hs. após administração da droga	$0,543 < t_{0,05} = 2,306$	8
Controle X 7 dias após administração da droga	$1,796 < t_{0,05} = 2,306$	8
12 hs X 7 dias após administração da droga	$t_{0,05} = 2,306 < 2,491 < t_{0,01} = 3,355$	8

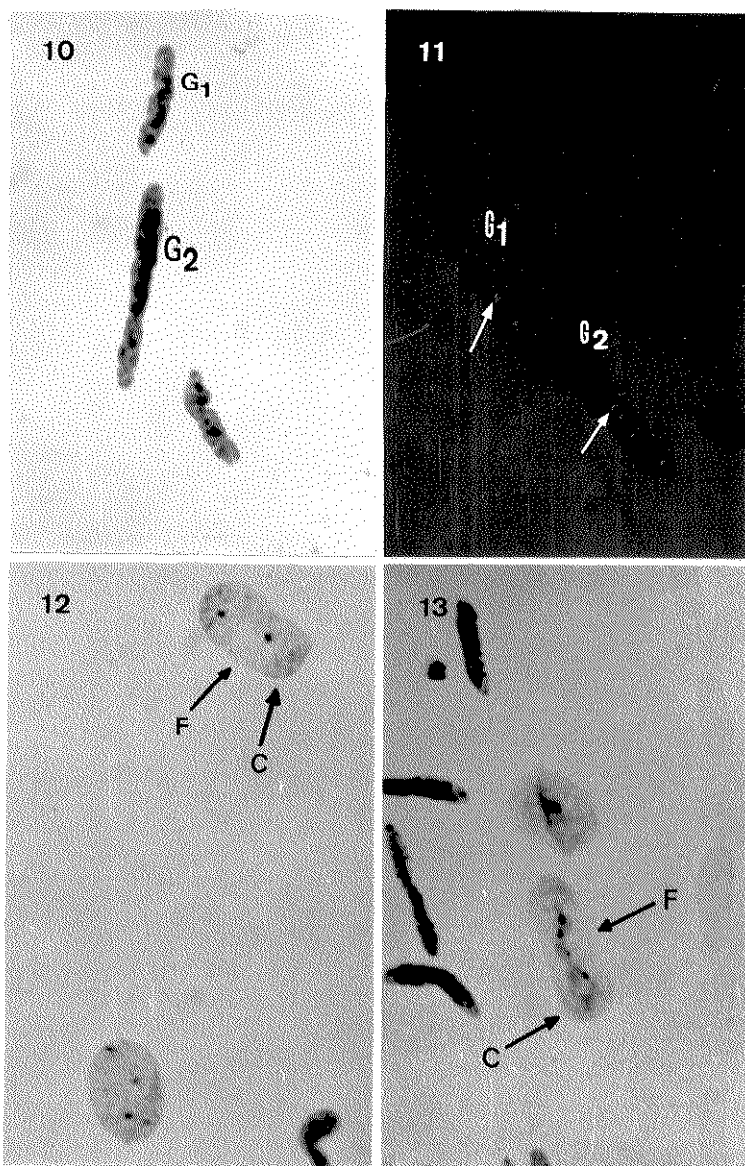
TABELA IV - Análise de variância calculada para os índices metacromáticos de núcleos de hepatócitos de camundongo (referentes à Tabela II).

FV	G.L.	SQ	QM	F
Entre	2	0,101	0,050	$1,923 < F_{0,05} = 4,10$
Dentro	12	0,307	0,026	
Total	14	0,408	0,029	

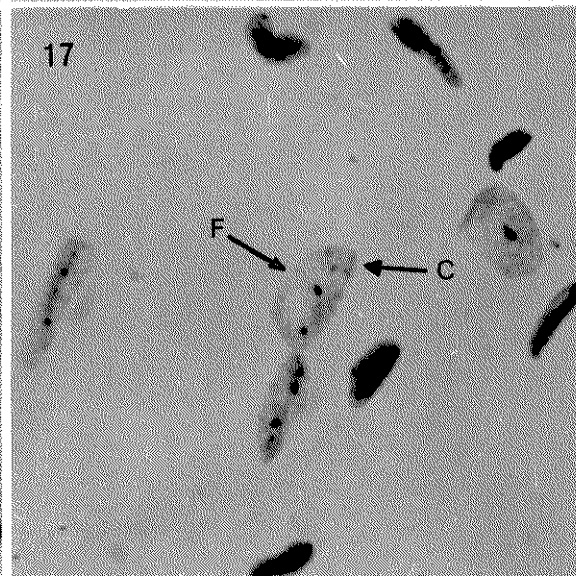
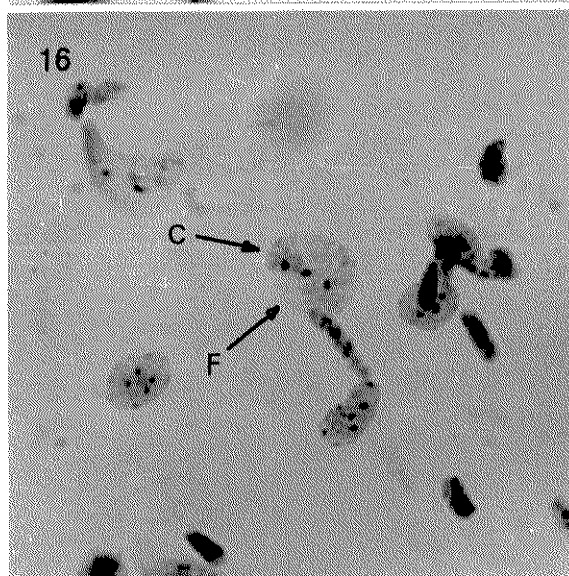
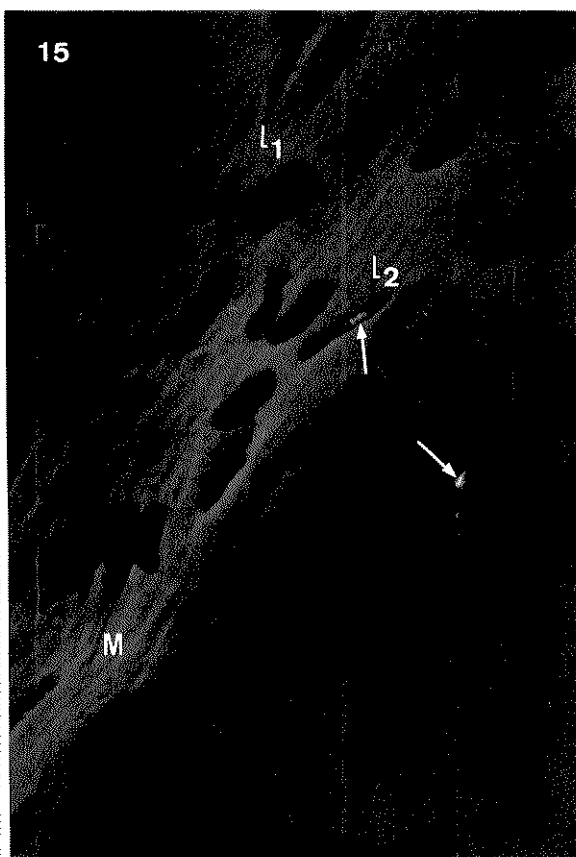
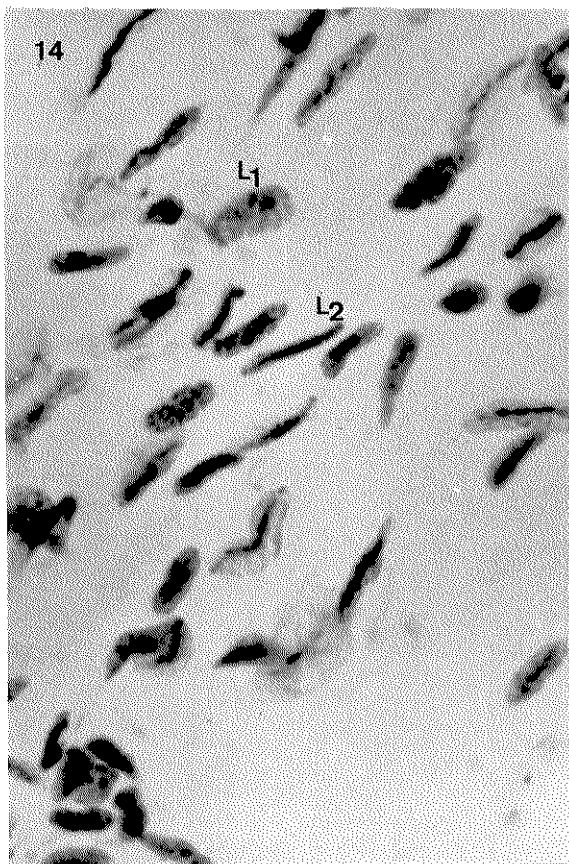
Com relação aos núcleos de células do músculo cardíaco observou-se também que as características visuais, em termos de basofilia e anisotropia, desse material corado com solução de azul de toluidina após digestão enzimática com RNase, não sofrem alterações após tratamento pela oxamniquine (Figs. 10 a 19). A birrefringência dos núcleos deste material foi muito mais difícil de ser documentada do que a dos núcleos de hepatócitos, por causa de seu brilho muito fraco, mesmo com o uso de luz ultravioleta (Figs. 11, 15 e 19). Curvas espectrais de absorção foram determinadas também para estes núcleos, à semelhança do efetuado para núcleos de hepatócitos. Determinaram-se medidas de absorbância em dois tipos de regiões eucromáticas de núcleos, como os das Figs. 12, 13, 16 e 17. Essas regiões diferiam em compactação da cromatina e algumas vezes apresentaram ligeiras diferenças quanto ao λ do pico de absorção (Tabela V, Gráficos II e III) e grandes diferenças quanto aos valores dos índices metacromáticos (Tabela V). Estas últimas são definitivamente comprovadas com teste estatístico (teste t) (Tabela VI).

As pequenas diferenças quanto ao λ do pico de absorção não são significantes, pois são menores que 20 nm (MELLO & VIDAL, 1973). Para um mesmo tipo de região nuclear analisado em preparados de animais controle e animais tratados com oxamniquine, contudo, não aparecem diferenças significantes quanto ao índice metacromático (Tabela VII e VIII) e posição ocupada pelo pico de absorção (Tabela V). Utilizaram-se também animais controle com a mesma idade daqueles que foram sacrificados após 30 dias da administração da oxamniquine para

FIGURAS 10 a 13 - Núcleos de células do músculo cardíaco de camundongos controle corados com solução de azul de toluidina a pH 4,0 após tratamento com RNase. A fig. 11 é imagem de birrefringência da fig. 10. As setas na fig. 11 indicam a birrefringência (muito fraca) da cromatina. A letra G nas figs. 10 e 11 indica o mesmo núcleo em duas diferentes situações de observação. Nas figs. 12 e 13 a letra F mostra uma área de eucromatina mais frouxa e a letra C uma área de eucromatina mais compactada, onde se efetuaram as medidas citofotométricas. X 860.



FIGURAS 14 a 17 - Núcleos de células do músculo cardíaco de camundongos corados com solução de azul de toluidina a pH 4,0 após tratamento com RNase. As figs. 14, 15 e 16 mostram os núcleos de animais sacrificados 12 horas após administração de oxamniquine. A fig. 17 mostra os núcleos de animais sacrificados 48 horas após administração da droga. A fig. 15 é imagem de birrefringência da fig. 14. As setas na fig. 15 indicam a birrefringência nuclear e a letra M na mesma figura indica a birrefringência da miosina. A letra L nas figs. 14 e 15 indica o mesmo núcleo em duas diferentes situações de observação. Nas figs. 16 e 17 a letra F mostra uma área de eucromatina mais frouxa e a letra C mostra uma área de eucromatina mais compactada, onde se efetuaram as medidas citofotométricas. Figs. 14, 15 e 17, X 860; a fig. 16, X 672.



FIGURAS 18 e 19 - Núcleos de células do músculo cardíaco de camundongos corados com solução de azul de toluidina a pH 4,0 após tratamento com RNase. As figuras mostram núcleos de animais sacrificados 7 dias após administração de oxamniquine. A fig. 19 é imagem de birrefringência da fig. 18. As setas na fig. 19 indicam a fraca birrefringência nuclear. A letra P nas duas figuras indica os mesmos núcleos em duas diferentes situações de observação. X.860.

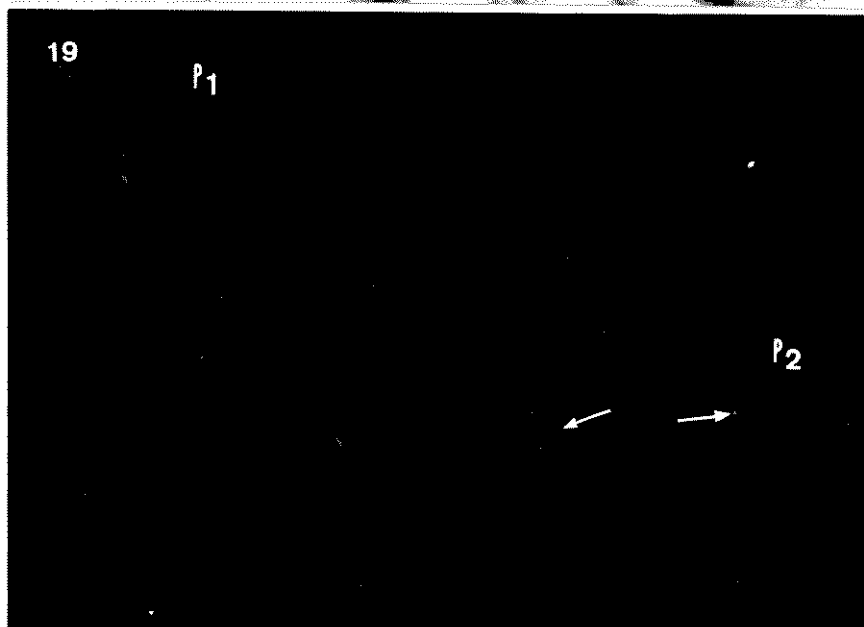
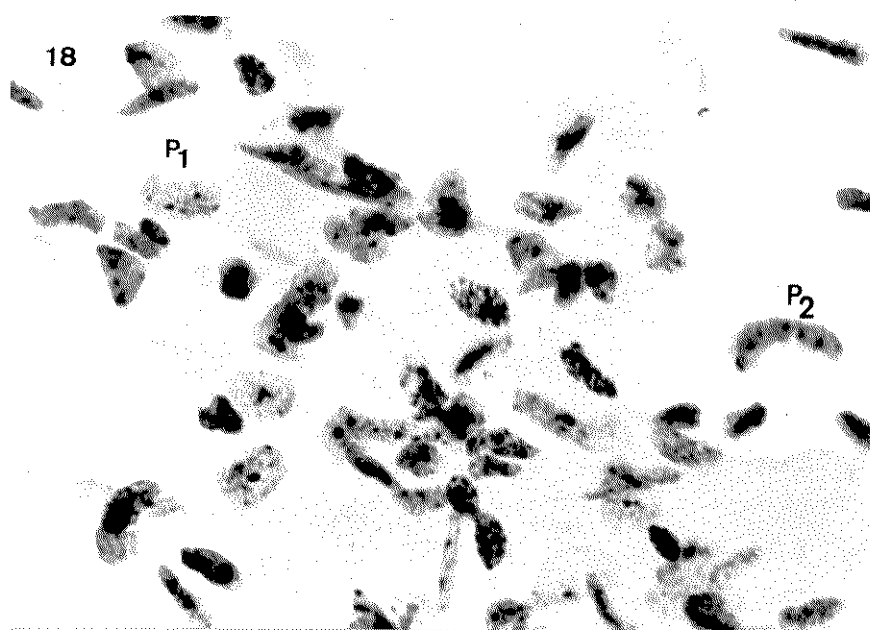


TABELA V - Picos de absorção e índices metacromáticos obtidos das curvas espectrais de núcleos de células do músculo cardíaco de camundongo corados com solução de azul de toluidi na a pH 4,0 após tratamento com RNase.

Condições experimentais	Regiões eucromáticas	λ do pico de absorção (nm)	Índices metacromáticos ($\bar{X} \pm S$) (n = 5)
Controle (24 hs)*	mais frouxa	590	0,863 $\pm$ 0,071
	mais compacta	580 - 590	1,177 $\pm$ 0,089
Controle (30 dias)*	mais frouxa	590	0,876 $\pm$ 0,11
	mais compacta	580	1,154 $\pm$ 0,105
12 hs após administração de oxamniquine	mais frouxa	590	0,851 $\pm$ 0,1
	mais compacta	590	1,146 $\pm$ 0,105
7 dias após administração de oxamniquine	mais frouxa	580 - 590	0,805 $\pm$ 0,095
	mais compacta	580	1,144 $\pm$ 0,089
30 dias após administração de oxamniquine	mais frouxa	590	0,771 $\pm$ 0,141
	mais compacta	590	1,177 $\pm$ 0,063

* Animais sacrificados simultaneamente àqueles que haviam recebido a droga 24 hs ou 30 dias antes.

GRÁFICO II - Curvas espectrais de absorção de regiões de eucromatina mais frouxa de núcleos de células do músculo cardíaco corados com solução de azul de toluidina a pH 4,0 após tratamento com RNase.

- - Controle (24 hs)*
- ◉ - Controle (30 dias)*
- x - 12 horas após administração de oxamniquine
- o - 7 dias após administração de oxamniquine
- * - 30 dias após administração de oxamniquine

* Animais sacrificados simultaneamente àqueles que haviam recebido a droga 24 hs ou 30 dias antes.

A = absorbância

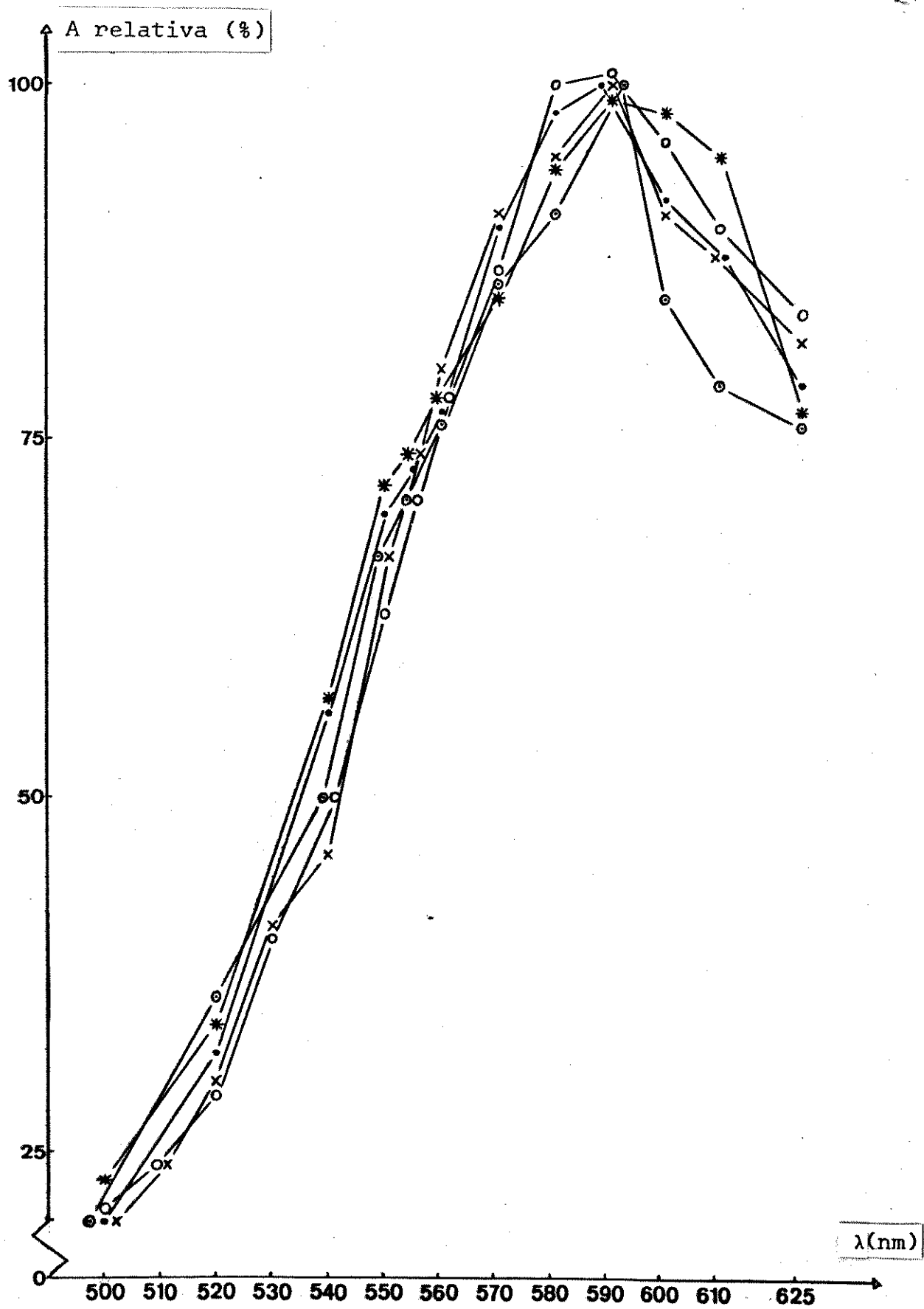
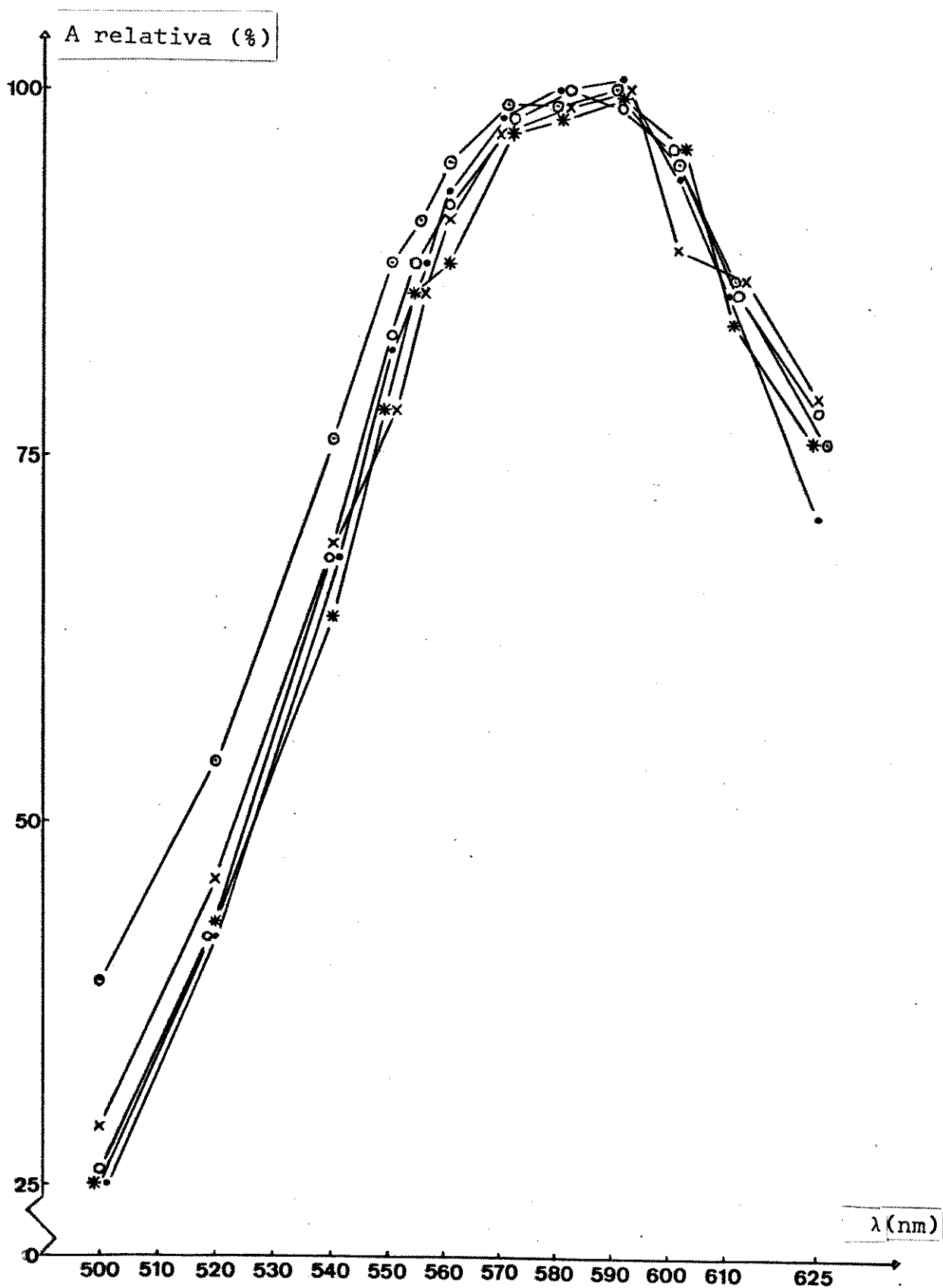


GRÁFICO III - Curvas espectrais de absorção de regiões de eucromatina mais compactada de núcleos de células do músculo cardíaco corados com solução de azul de toluidina a pH 4,0 após tratamento de RNase.

- - Controle (24 hs)*
- - Controle (30 dias)*
- x - 12 horas após administração de oxamniquine
- - 7 dias após administração de oxamniquine
- * - 30 dias após administração de oxamniquine

* Animais sacrificados simultaneamente àqueles que haviam recebido a droga 24 hs ou 30 dias antes.

A = absorbância



se afastar a possibilidade de que eventuais alterações decorrentes do envelhecimento dos animais fossem tomadas como alterações devidas à ação da droga.

TABELA VI - Teste t calculado para as médias dos índices metacromáticos de núcleos de células do músculo cardíaco de camundongo (áreas frouxas X áreas compactas) (referentes à Tabela V).

Condições experimentais	t	G.L.
Controle (24 hs)*	$5,709 > t_{0,01} = 3,355$	8
Controle (30 dias)*	$4,413 > t_{0,01} = 3,355$	8
12 hs após administração de oxamniquine	$4,682 > t_{0,01} = 3,355$	8
7 dias após administração de oxamniquine	$5,381 > t_{0,01} = 3,355$	8
30 dias após administração de oxamniquine	$5,718 > t_{0,01} = 3,355$	8

* Animais sacrificados simultaneamente àqueles que haviam recebido a droga 24 hs ou 30 dias antes.

A basofilia e anisotropia de núcleos de linfócitos de camundongos tratados com RNase e a seguir corados com

TABELA VII - Análise de variância calculada para os índices metacromáticos de núcleos de células do músculo cardíaco de camundongo (áreas de cromatina mais frouxa) (referentes à Tabela V).

FV	G.L.	SQ	QM	F
Entre	4	0,038	0,01	$0,909 < F_{0,01} = 4,43$
Dentro	20	0,226	0,011	
Total	24	0,264	0,011	

TABELA VIII - Análise de variância calculada para os índices metacromáticos de núcleos de células do músculo cardíaco de camundongo (áreas de cromatina mais compacta) (referentes à Tabela V).

FV	G.L.	SQ	QM	F
Entre	4	0,005	0,001	$0,125 < F_{0,01} = 4,43$
Dentro	20	0,168	0,008	
Total	24	0,173	0,007	

solução de azul de toluidina são mostrados nas Figs. 20 a 26.

No que se refere à basofilia, os núcleos de linfócitos de animais controle (Fig. 20) não diferiam visualmente dos núcleos de animais que receberam a droga (Figs. 22, 24 e 25).

Quanto à anisotropia, também não se observaram diferenças nas características visuais de birrefringência entre os mesmos núcleos (Figs. 21, 23 e 26).

Quanto às curvas de absorção determinou-se que o seu pico de absorção praticamente não se modifica nos linfócitos de camundongos tratados com oxamniquine, considerando-se não significativa uma diferença de 10 nm (MELLO & VIDAL, 1973) (Tabela IX; Gráfico IV).

TABELA IX - Picos de absorção e índices metacromáticos obtidos das curvas espectrais de núcleos de linfócitos de camundongo corados com solução de azul de toluidina a pH 4,0 após tratamento com RNase.

Condições experimentais	λ do pico de absorção (nm)	Índices metacromáticos ($\bar{X} \pm S$) (n = 5)
Controle (24 hs)*	590	$1,221 \pm 0,118$
12 hs após administração de oxamniquine	580	$1,261 \pm 0,089$
7 dias após administração de oxamniquine	580	$1,410 \pm 0,155$

* Animais sacrificados simultaneamente àqueles que haviam recebido a droga 24 hs antes.

FIGURAS 20 a 26 - Núcleos de linfócitos de camundongos corados com solução de azul de toluidina a pH 4,0 após tratamento com RNase. As figs. 20 e 21 mostram núcleos de animais controle. As figs. 22 e 23 mostram núcleos de animais sacrificados 24 horas após administração de oxamniquine. A fig. 24, um núcleo de animal sacrificado 48 horas após administração da droga e as figs. 25 e 26, 7 dias após administração da mesma. A fig. 21 é imagem de birrefringência da fig. 20. A letra R nas figs. 20 e 21 indica os mesmos núcleos em duas diferentes situações de observação. A fig. 23 é imagem de birrefringência da fig. 22. A letra S nas figs. 22 e 23 indica os mesmos núcleos em duas diferentes situações de observação. A fig. 26 é imagem de birrefringência da fig. 25. A letra T nas figs. 25 e 26 indica os mesmos núcleos em duas diferentes situações de observação. X 860.

20



21



22



23

S

24



25



26



GRÁFICO IV - Curvas espectrais de absorção de núcleos de linfócitos corados com solução de azul de toluidina a pH 4,0 após tratamento com RNase.

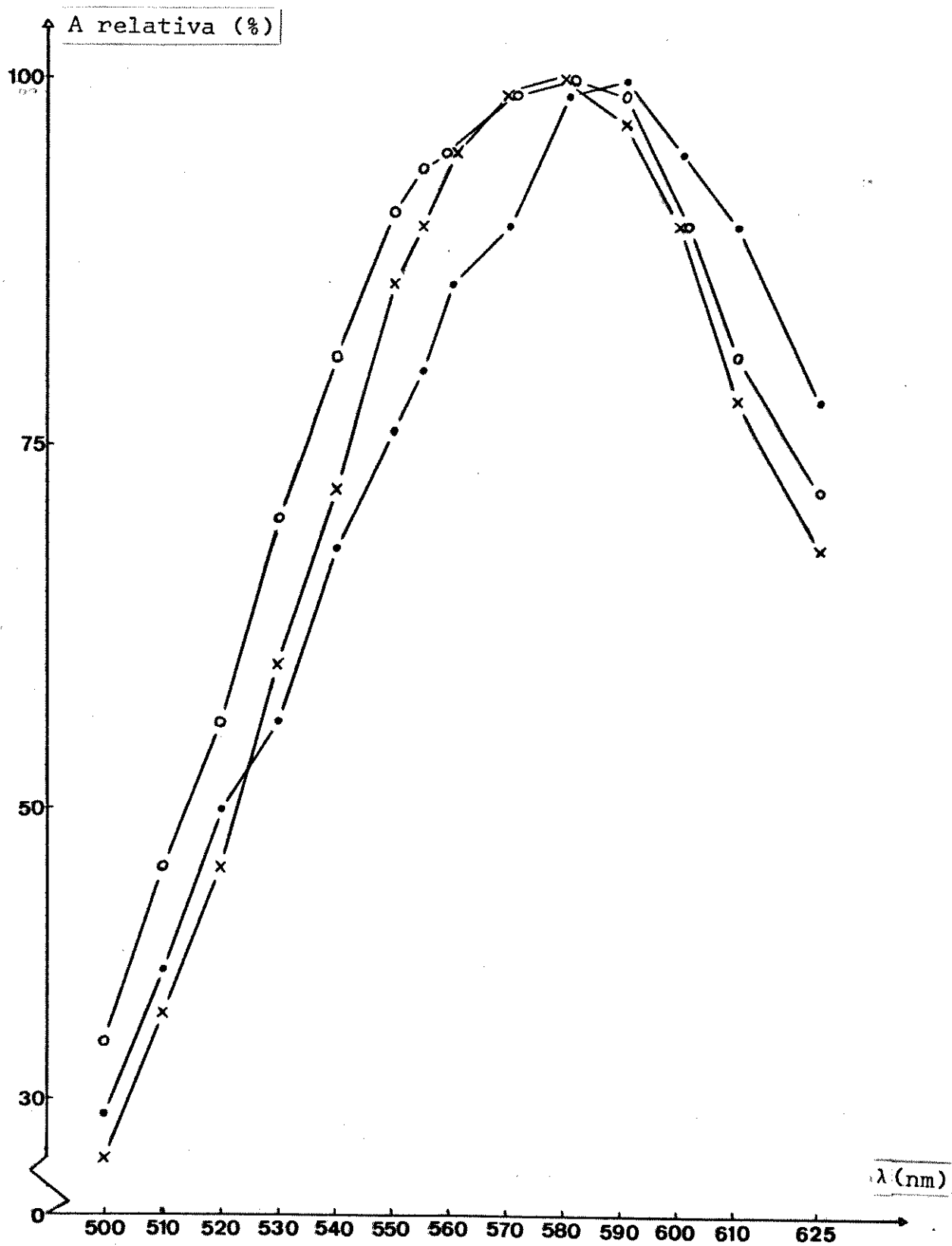
• - Controle *

x - 12 horas após administração de oxamniquine

o - 7 dias após administração de oxamniquine

* Animais sacrificados simultaneamente àqueles que haviam recebido a droga 24 hs antes.

A = absorbância



Os índices metacromáticos nas condições analisadas não diferem estatisticamente (Tabelas X e XI)..

TABELA X - Teste t calculado para as médias dos índices metacromáticos de núcleos de linfócitos de camundongo (referentes à Tabela IX).

Condições experimentais	t	G.L.
Controle (24 hs)* X 12 hs	$0,563 < t_{0,05} = 2,306$	8
Controle (24 hs)* X 7 dias	$2,124 < t_{0,05} = 2,306$	8
12 hs X 7 dias	$1,774 < t_{0,05} = 2,306$	8

* Animais sacrificados simultaneamente àqueles que haviam recebido a droga 24 hs antes.

TABELA XI - Análise de variância calculada para os índices metacromáticos de núcleos de linfócitos de camundongo (referentes à Tabela IX).

FV	G.L.	SQ	QM	F
Entre	2	0,1	0,05	$3,125 < F_{0,05} = 4,10$
Dentro	12	0,186	0,016	
Total	14	0,286	0,020	

2. Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco

Os tipos nucleares encontrados em células do músculo cardíaco foram classificados segundo área e forma em 7 categorias, conforme deduzido da Tabela XII e das Figuras 27 a 34.

As frequências desses tipos nucleares e o número total de núcleos contados por campo nas lâminas controle e experimentais estão descritos nas Tabelas XIII a LVI.

À partir das frequências absolutas obtidas para cada lâmina foram calculadas as frequências percentuais relativas por dois métodos (Tabelas LVII a LXX). Para a estimação das frequências percentuais* dos tipos nucleares, para cada camundongo, foi utilizado o estimador da razão (COCHRAN, 1977), pois sua variância é menor que a da média das frequências (Tabelas LVII a LXXI).

Para cada tipo nuclear, as frequências percentuais* dos camundongos controle foram comparados estatisticamente com os de camundongos tratados utilizando-se o teste da posição de Wilcoxon (SIEGEL, 1956). Este teste é apropriado para comparações de amostras cujos valores não apresentam uma distribuição normal. Ele consiste em se trabalhar com as disposições dos valores colocados em ordem crescente.

Como exemplo mostramos a sequência de etapas utilizadas para esse teste no caso do tipo nuclear VII. Os números abaixo correspondem aos valores das frequências percentuais

TABELA XII - Características dos tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongos.

Núcleos	Tipos nucleares						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
reas							
nº 1	33,98	37,15	125,41	104,18	182,81	250,95	192,01
nº 2	32,97	68,20	115,30	116,09	144,75	416,71	286,96
nº 3	30,36	61,36	96,71	73,57	146,92	200,96	284,58
nº 4	43,93	43,93	139,29	69,64	200,96	329,26	199,45
nº 5	31,74	32,34	108,20	128,21	180,42	599,71	146,92
nº 6	16,33	43,21	126,23	119,16	176,62	268,09	142,65
nº 7	26,78	32,97	239,86	81,04	197,95	312,74	1455,52
nº 8	30,96	30,18	217,35	66,44	288,19	425,44	820,01
nº 9	30,18	56,46	135,96	56,46	142,65	440,2	916,03
nº 10	31,37	24,96	75,08	64,43	169,18	217,35	723,55
$\bar{x} \pm s$	30,86 $\pm$ 6,79	43,08 $\pm$ 14,50	137,94 $\pm$ 51,68	87,92 $\pm$ 26,35	183,04 $\pm$ 42,48	346,14 $\pm$ 124,11	208,76 $\pm$ 63,92 978,78 $\pm$ 327,4
C.V. (%)	22,00	33,66	37,47	29,97	23,21	35,86	33,45
A.V.	16,33	24,96	75,08	56,46	142,65	200,96	142,65
morfologia nuclear	elipsóide oblato	elipsóide prolato	elipsóide oblato	elipsóide prolato	elipsóide prolato superf. irregular	elipsóide prolato superf. irregular	elipsóide prolato
ção média aproxima dos diâmetros ior pelo menor	1,8	3,8	2	5,6	3,8	9,8	14,0 19,5

V. = Coeficiente de variação A.V. = Amplitude de variação

FIGURAS 27 a 34 - Núcleos de células do músculo cardíaco de camundongos sacrificados 30 dias após administração de oxamniquine e submetidos à reação de Feulgen. As figuras mostram os diversos tipos nucleares classificados segundo tamanho e forma, conforme os dados da tabela XII. Fig. 27, núcleo tipo I; fig. 28, núcleo tipo II; fig. 29, núcleo tipo III; fig. 30, núcleo tipo IV; fig. 31, núcleo tipo V; fig. 32, núcleo tipo VI; figs. 33 e 34, núcleos tipo VII. As figs. 27 a 33, X 1693; fig. 34, X 1355.

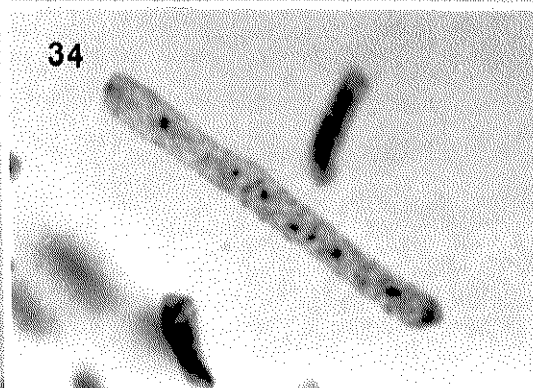
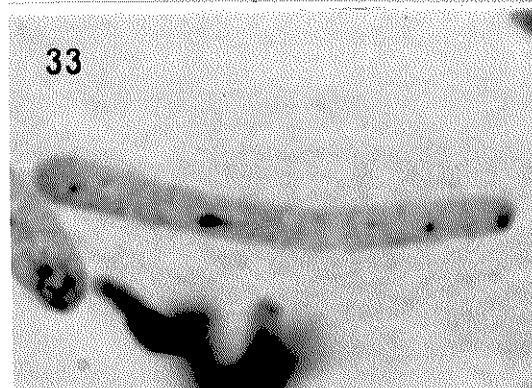
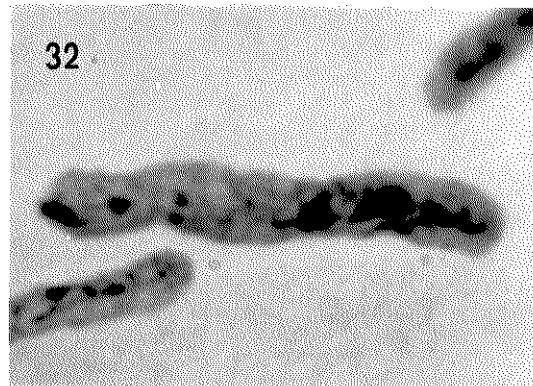
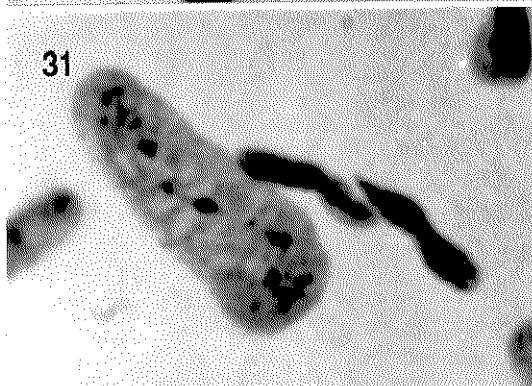
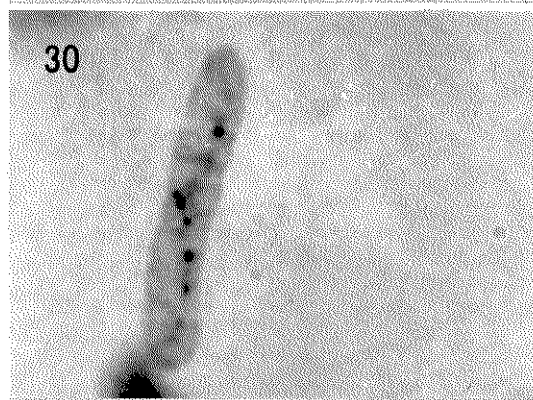
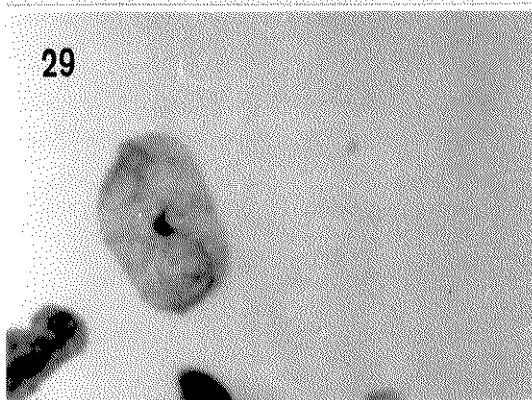
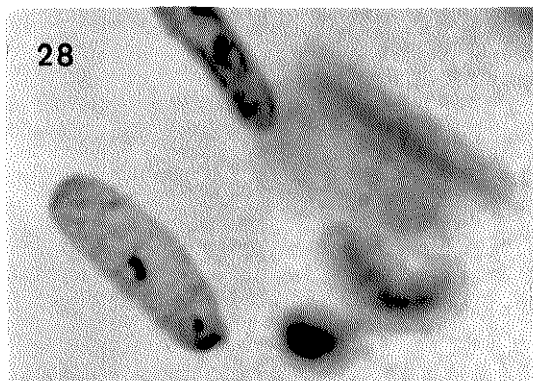
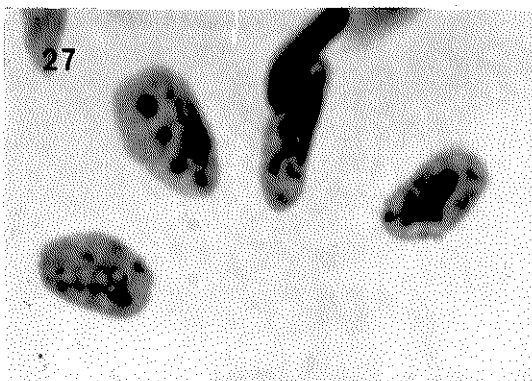


TABELA XIII - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo controle (A) contados na lâmina 1.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
1.1	3	0	2	4	5	1	0	15
1.2	6	6	6	2	5	0	0	25
1.3	5	2	4	4	3	0	0	18
1.4	3	4	5	1	2	0	0	15
1.5	5	4	5	2	1	1	2	20
1.6	5	2	6	10	10	0	1	34
1.7	5	3	4	2	12	0	1	27
1.8	4	4	4	4	11	1	1	29
1.9	2	3	5	4	8	1	0	23
1.10	7	4	2	6	10	0	1	30
1.11	2	3	1	2	8	1	3	20
1.12	6	8	1	1	10	0	0	26
1.13	0	2	2	4	14	0	1	23
1.14	3	4	0	0	7	0	0	14
1.15	1	2	1	0	6	1	0	11
1.16	5	2	3	3	4	0	0	17
1.17	1	1	0	1	9	0	1	13
1.18	3	4	6	3	4	0	0	20
1.19	5	3	1	0	3	2	0	14
1.20	2	5	0	2	8	1	0	18
TOTAL	73	66	58	55	140	9	11	412

TABELA XIV - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo controle (A) contados na lâmina 2.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
2.1	1	3	3	5	15	0	0	27
2.2	4	4	3	2	16	0	0	29
2.3	4	5	2	6	3	0	0	20
2.4	4	8	10	5	5	0	0	32
2.5	7	9	6	4	5	0	0	31
2.6	3	3	6	1	4	0	0	17
2.7	4	1	5	0	1	0	0	11
2.8	2	1	6	3	7	0	0	19
2.9	4	6	3	3	7	0	0	23
2.10	1	3	2	5	11	0	0	22
2.11	3	1	8	2	0	0	0	14
2.12	2	1	7	4	5	0	0	19
2.13	3	4	8	2	0	0	0	17
2.14	2	8	10	2	2	0	0	24
2.15	3	5	8	6	4	0	0	26
2.16	3	5	7	4	1	0	0	20
2.17	3	6	12	3	0	0	0	24
2.18	3	0	9	6	1	0	1	20
2.19	2	3	3	8	7	0	0	23
2.20	5	2	5	5	10	0	0	27
TOTAL	63	78	123	76	104	0	1	445

TABELA XV - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo controle (A) contados na lâmina 3.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
3.1	0	0	9	5	7	0	0	21
3.2	1	1	9	10	3	1	0	25
3.3	5	5	9	2	2	0	0	23
3.4	3	0	10	8	6	0	0	27
3.5	3	4	5	7	3	0	0	22
3.6	0	1	7	4	2	0	0	14
3.7	1	2	6	9	4	0	0	22
3.8	0	3	5	10	3	0	0	21
3.9	3	2	1	6	3	0	0	15
3.10	1	4	10	3	6	0	1	25
3.11	1	1	6	3	6	0	0	17
3.12	1	1	1	3	12	0	0	18
3.13	5	6	12	6	7	0	0	36
3.14	5	3	2	8	12	0	0	30
3.15	1	0	4	10	4	0	0	19
3.16	3	1	2	3	1	0	2	12
3.17	2	3	3	11	5	0	0	24
3.18	4	1	1	3	8	1	0	18
3.19	3	2	4	4	8	0	0	21
3.20	5	4	2	4	11	0	0	26
TOTAL	47	44	108	119	113	2	3	436

TABELA XVI - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo controle (A) contados na lâmina 4.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
4.1	5	2	2	6	7	0	1	23
4.2	2	5	2	1	16	0	0	26
4.3	2	2	7	0	4	0	0	15
4.4	2	4	2	2	8	0	0	18
4.5	1	0	3	1	6	0	0	11
4.6	4	4	5	5	8	0	0	26
4.7	3	1	4	3	5	1	0	17
4.8	2	3	1	1	11	1	2	21
4.9	3	4	5	2	6	0	0	20
4.10	1	3	10	1	4	0	0	19
4.11	4	3	11	5	6	0	1	30
4.12	2	1	9	6	7	0	0	25
4.13	4	2	2	3	6	1	0	18
4.14	3	4	6	4	5	0	1	23
4.15	5	5	1	7	6	0	1	25
4.16	2	8	2	5	6	1	0	24
4.17	4	3	0	4	6	0	3	20
4.18	6	6	9	1	6	1	0	29
4.19	10	4	5	2	10	0	0	31
4.20	1	1	0	5	15	0	1	23
TOTAL	66	65	86	64	148	5	10	444

TABELA XVII - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo controle (B) contados na lâmina 1.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
1.1	3	1	10	7	5	0	1	27
1.2	0	0	2	5	11	1	0	19
1.3	2	1	0	3	11	1	0	18
1.4	1	1	0	3	15	1	1	22
1.5	1	0	4	8	11	0	1	25
1.6	1	0	3	2	6	0	0	12
1.7	2	1	3	6	8	0	0	20
1.8	4	2	0	6	17	0	0	29
1.9	0	2	2	3	9	0	1	17
1.10	1	1	0	4	5	0	1	12
1.11	3	0	4	5	7	0	2	21
1.12	1	4	2	2	6	0	0	15
1.13	0	0	7	5	4	1	2	19
1.14	0	2	7	1	7	0	0	17
1.15	1	0	6	1	13	0	0	21
1.16	1	2	6	5	12	0	0	26
1.17	0	1	3	6	7	1	2	20
1.18	1	2	1	2	12	1	0	19
1.19	0	2	0	1	8	0	0	11
1.20	0	1	2	5	6	0	1	15
TOTAL	22	23	62	80	180	6	12	385

TABELA XVIII - Frequência de tipos nucleares de células do
músculo cardíaco de camundongo controle (B) con-
tados na lâmina 2.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
2.1	1	3	2	5	5	0	2	18
2.2	2	0	2	5	0	0	2	11
2.3	0	1	5	4	5	0	0	15
2.4	2	0	6	3	5	0	0	16
2.5	0	0	5	2	6	1	1	15
2.6	1	1	2	1	3	0	2	10
2.7	0	2	1	4	7	1	1	16
2.8	1	1	3	2	4	0	2	13
2.9	5	1	1	2	5	0	0	14
2.10	0	3	6	4	3	0	0	16
2.11	1	1	2	6	3	1	1	15
2.12	0	1	1	6	2	2	0	12
2.13	1	1	3	6	10	1	0	22
2.14	3	0	3	6	3	0	0	15
2.15	2	3	3	7	8	3	0	26
2.16	1	1	3	3	1	0	0	9
2.17	3	2	4	8	8	0	0	25
2.18	1	3	6	4	4	0	1	19
2.19	1	2	3	10	3	0	1	20
2.20	5	2	3	6	1	0	2	19
TOTAL	30	28	64	94	86	9	15	326

TABELA XIX - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo controle (B) contados na lâmina 3.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
3.1	4	6	16	5	2	0	0	33
3.2	4	1	10	1	3	0	1	20
3.3	5	7	6	1	7	0	0	26
3.4	6	7	3	0	9	0	0	25
3.5	3	2	4	0	8	0	0	17
3.6	2	2	6	2	7	0	0	19
3.7	2	1	2	1	4	0	0	10
3.8	6	5	2	4	4	1	1	23
3.9	1	2	1	4	10	0	1	19
3.10	1	3	2	5	6	0	0	17
3.11	1	0	3	2	12	0	0	18
3.12	6	4	2	4	9	0	0	25
3.13	1	3	3	3	7	0	0	17
3.14	3	3	2	2	8	0	0	18
3.15	1	3	2	4	7	0	0	17
3.16	3	1	7	4	9	0	0	24
3.17	1	2	3	10	10	1	0	27
3.18	3	3	3	3	11	0	0	23
3.19	4	6	2	10	10	1	2	35
3.20	2	4	4	6	11	0	1	28
TOTAL	59	65	83	71	154	3	6	441

TABELA XX - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo controle (B) contados na lâmina 4.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
4.1	3	4	5	8	11	0	0	31
4.2	4	3	7	1	6	0	0	21
4.3	7	3	6	5	5	0	0	26
4.4	3	9	8	5	6	0	0	31
4.5	2	5	5	3	3	1	0	19
4.6	3	3	2	11	11	1	2	33
4.7	0	2	2	7	4	2	0	17
4.8	2	2	0	6	9	0	0	19
4.9	3	5	5	2	3	3	0	21
4.10	2	1	8	5	5	0	1	22
4.11	1	3	2	4	4	1	1	16
4.12	2	5	2	14	5	0	0	28
4.13	3	4	4	9	1	0	0	21
4.14	3	3	5	9	4	0	0	24
4.15	1	6	7	12	1	0	0	27
4.16	2	4	7	11	3	0	1	28
4.17	3	3	5	9	2	0	0	22
4.18	0	2	4	6	4	0	1	17
4.19	2	6	1	1	4	0	0	14
4.20	2	3	10	3	0	0	0	18
TOTAL	48	76	95	131	91	8	6	455

TABELA XXI - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo controle (C) contados na lâmina 1.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
1.1	23	20	10	5	3	0	1	62
1.2	3	5	5	1	0	0	0	14
1.3	16	10	7	5	1	1	2	42
1.4	12	9	7	3	1	1	0	33
1.5	11	13	6	2	2	0	1	35
1.6	12	8	13	3	2	0	0	38
1.7	2	5	10	1	0	0	0	18
1.8	6	11	5	4	1	0	1	28
1.9	4	4	2	1	0	0	0	11
1.10	5	8	3	0	0	1	0	17
1.11	5	4	8	2	0	0	0	19
1.12	4	6	6	1	1	0	0	18
1.13	5	13	12	6	2	0	0	38
1.14	10	4	9	5	0	0	2	30
1.15	9	8	3	3	0	0	0	23
1.16	7	8	8	1	0	0	0	24
1.17	24	10	8	5	2	1	0	50
1.18	6	10	9	1	0	0	0	26
1.19	9	11	12	9	2	2	0	45
1.20	7	7	13	5	1	0	1	34
TOTAL	180	174	156	63	18	6	8	605

TABELA XXII - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo controle (C) contados na lâmina 2.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
2.1	9	9	10	2	0	0	1	31
2.2	15	13	11	2	0	0	0	41
2.3	16	12	8	3	0	1	0	40
2.4	13	15	6	3	2	0	0	39
2.5	3	16	13	1	0	0	0	33
2.6	7	16	11	5	2	0	1	42
2.7	15	20	18	0	0	0	0	53
2.8	13	3	6	3	0	0	0	25
2.9	9	15	6	2	1	0	0	33
2.10	5	7	6	4	1	0	2	25
2.11	11	10	5	4	1	0	1	32
2.12	4	11	5	3	0	0	0	23
2.13	5	4	2	0	0	0	0	11
2.14	7	5	3	4	0	0	0	19
2.15	7	8	6	3	2	0	0	26
2.16	6	8	5	2	0	0	0	21
2.17	7	17	5	1	1	0	0	31
2.18	5	7	3	0	1	0	1	17
2.19	4	5	2	1	2	1	0	15
2.20	6	11	9	2	1	0	0	29
TOTAL	167	212	140	45	14	2	6	586

TABELA XXIII - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo controle (C) contados na lâmina 3.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
3.1	4	5	4	1	2	0	1	17
3.2	3	6	0	2	1	0	0	12
3.3	14	13	2	1	0	0	0	30
3.4	12	9	4	4	1	0	1	31
3.5	5	4	8	4	1	0	1	23
3.6	2	2	7	0	0	0	0	11
3.7	1	2	3	2	1	0	0	9
3.8	3	8	6	1	0	0	0	18
3.9	7	4	2	1	1	0	0	15
3.10	3	2	7	0	1	0	0	13
3.11	1	3	4	1	1	0	0	10
3.12	1	0	4	2	1	0	0	8
3.13	1	0	1	1	1	0	0	4
3.14	2	3	6	2	2	0	0	15
3.15	2	6	1	1	2	0	1	13
3.16	4	4	3	1	1	0	0	13
3.17	5	9	5	0	1	0	1	21
3.18	5	2	4	2	0	0	1	14
3.19	1	2	11	2	4	0	0	20
3.20	8	9	12	6	1	0	0	36
TOTAL	84	93	94	34	22	0	6	333

TABELA XXIV - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo controle (D) contados na lâmina 1.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
1.1	6	2	5	6	1	1	0	21
1.2	3	4	4	0	1	0	0	12
1.3	7	4	9	1	1	0	0	22
1.4	4	2	10	0	3	1	1	21
1.5	12	11	7	1	1	2	2	36
1.6	5	7	4	2	7	0	0	25
1.7	7	8	9	4	1	0	2	31
1.8	4	7	7	2	2	0	0	22
1.9	2	3	2	3	0	0	0	10
1.10	2	4	5	1	0	1	0	13
1.11	12	4	8	2	1	0	1	28
1.12	8	6	13	3	0	0	2	32
1.13	6	5	6	1	1	0	0	19
1.14	9	5	8	0	4	2	0	28
1.15	2	5	4	2	4	1	0	18
1.16	13	6	8	0	3	0	0	30
1.17	5	2	4	4	0	0	2	17
1.18	11	5	7	1	3	1	3	31
1.19	5	3	2	1	4	0	2	17
1.20	2	7	2	0	2	0	0	13
TOTAL	125	100	124	34	39	9	15	446

TABELA XXV - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo controle (D) contados na lâmina 2.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
2.1	4	1	6	1	0	0	0	12
2.2	7	3	4	4	0	1	2	21
2.3	4	1	3	5	0	0	3	16
2.4	3	5	7	5	0	1	1	22
2.5	4	4	6	3	1	0	1	19
2.6	4	4	4	6	2	0	0	20
2.7	2	2	4	4	0	0	0	12
2.8	2	0	12	3	1	0	0	18
2.9	5	0	4	2	1	0	0	12
2.10	4	3	3	1	0	0	0	11
2.11	3	3	2	2	0	0	0	10
2.12	2	3	7	2	2	1	0	17
2.13	4	4	2	5	1	0	1	17
2.14	5	3	3	3	0	0	0	14
2.15	8	7	4	2	0	1	0	22
2.16	5	2	3	1	0	0	0	11
2.17	2	2	0	4	1	1	0	10
2.18	1	1	4	2	0	0	0	8
2.19	3	2	4	3	0	0	1	13
2.20	9	3	2	0	2	0	1	17
TOTAL	81	53	84	58	11	5	10	302

TABELA XXVI - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo controle (D) contados na lâmina 3.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
3.1	6	2	4	1	1	0	0	14
3.2	6	3	7	4	0	0	0	20
3.3	8	7	17	1	1	0	0	34
3.4	4	4	6	7	3	0	0	24
3.5	8	2	1	0	0	0	0	11
3.6	3	3	6	7	1	1	0	21
3.7	10	6	7	2	1	0	0	26
3.8	11	8	9	2	2	1	0	33
3.9	8	6	6	6	0	2	0	28
3.10	8	8	11	7	0	1	0	35
3.11	5	6	6	3	1	1	1	23
3.12	6	9	4	3	0	0	0	22
3.13	4	0	2	1	4	0	0	11
3.14	4	2	1	1	0	0	0	8
3.15	3	3	5	1	0	0	0	12
3.16	2	4	10	2	0	0	0	18
3.17	2	3	7	0	1	0	0	13
3.18	4	9	7	3	4	0	0	27
3.19	6	7	13	4	4	1	0	35
3.20	6	3	3	2	0	0	0	14
TOTAL	114	95	132	57	23	7	1	429

TABELA XXVII - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo controle (D) contados na lâmina 4.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
4.1	8	6	6	2	1	0	1	24
4.2	1	2	6	1	0	0	0	10
4.3	3	1	7	4	5	0	0	20
4.4	6	4	5	3	0	0	0	18
4.5	3	2	2	2	2	0	0	11
4.6	8	7	1	4	0	1	0	21
4.7	1	0	6	3	1	0	0	11
4.8	7	11	7	2	2	0	1	30
4.9	5	7	8	4	0	1	0	25
4.10	4	4	3	3	5	1	0	20
4.11	7	4	7	3	3	0	0	24
4.12	7	5	10	5	7	2	4	40
4.13	8	9	3	1	3	0	3	27
4.14	3	5	5	2	4	0	0	19
4.15	8	6	8	1	4	0	2	29
4.16	2	8	4	0	1	1	0	16
4.17	7	7	7	1	0	1	0	23
4.18	5	4	3	5	1	0	0	18
4.19	5	5	6	2	0	0	1	19
4.20	9	5	6	1	4	0	1	26
TOTAL	107	102	110	49	43	7	13	431

TABELA XXVIII - Frequência de tipos nucleares de células do
músculo cardíaco de camundongo tratado (E) con-
tados na lâmina 1.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
1.1	0	0	1	3	9	0	0	13
1.2	2	0	3	2	4	0	0	11
1.3	3	1	4	8	7	0	3	26
1.4	0	0	5	3	6	1	1	16
1.5	2	4	4	7	10	1	0	28
TOTAL	7	5	17	23	36	2	4	94

TABELA XXIX - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (E) contados na lâmina 2.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
2.1	2	1	4	5	3	1	1	17
2.2	2	2	2	3	6	0	0	15
2.3	0	0	3	4	7	0	0	14
2.4	0	1	1	3	5	0	2	12
2.5	2	0	3	1	4	0	0	10
TOTAL	6	4	13	16	25	1	3	68

TABELA XXX - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (E) contados na lâmina 3.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
3.1	0	0	0	6	7	2	0	15
3.2	0	0	1	0	6	4	0	11
3.3	0	0	1	4	7	0	0	12
3.4	0	0	1	2	6	0	0	9
3.5	2	2	0	2	5	0	0	11
TOTAL	2	2	3	14	31	6	0	58

TABELA XXXI - Frequência de tipos nucleares de células de músculo cardíaco de camundongo tratado (F) contados na lâmina 1.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
1.1	0	1	2	3	7	1	0	14
1.2	0	0	1	5	7	3	0	16
1.3	0	0	1	4	7	0	0	12
1.4	2	2	1	3	4	0	1	13
1.5	0	0	1	4	8	0	0	13
TOTAL	2	3	6	19	33	4	1	68

TABELA XXXII - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (F) contados na lâmina 2.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
2.1	1	0	0	2	7	0	0	10
2.2	0	0	1	6	7	1	0	15
2.3	2	0	2	8	3	0	0	15
2.4	0	4	6	0	1	2	0	13
2.5	2	0	2	4	2	0	0	10
TOTAL	5	4	11	20	20	3	0	63

TABELA XXXIII - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (F) contados na lâmina 3.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
3.1	2	2	3	10	5	0	0	22
3.2	2	2	3	5	8	0	0	20
3.3	4	3	1	2	4	0	1	15
3.4	2	0	2	3	4	0	0	11
3.5	0	0	2	5	10	1	0	18
TOTAL	10	7	11	25	31	1	1	86

TABELA XXXIV - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (G) contados na lâmina 1.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
1.1	4	10	3	0	0	0	0	17
1.2	4	2	6	1	4	0	0	17
1.3	1	2	7	5	4	0	0	19
1.4	0	0	11	9	5	0	0	25
1.5	1	2	7	2	5	0	0	17
TOTAL	10	16	34	17	18	0	0	95

TABELA XXXV - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (G) contados na lâmina 2.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
2.1	0	0	2	0	18	0	1	21
2.2	0	0	2	1	6	1	0	10
2.3	0	2	6	0	2	0	0	10
2.4	2	1	3	2	5	0	0	13
2.5	1	0	5	1	3	2	0	12
TOTAL	3	3	18	4	34	3	1	66

TABELA XXXVI - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (G) contados na lâmina 3.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
3.1	7	3	12	4	6	0	0	32
3.2	5	1	6	0	2	1	0	15
3.3	2	1	10	0	8	0	0	21
3.4	1	1	7	3	6	0	0	18
3.5	1	0	4	4	5	1	2	17
TOTAL	16	6	39	11	27	2	2	103

TABELA XXXVII - Frequência de tipos nucleares de células do
músculo cardíaco de camundongo tratado (H) con-
tados na lâmina 1.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
1.1	1	1	5	1	6	2	0	16
1.2	1	2	3	5	5	0	2	18
1.3	2	3	3	4	7	0	0	19
1.4	0	0	3	9	6	1	0	19
1.5	2	1	2	1	11	1	1	19
TOTAL	6	7	16	20	35	4	3	91

TABELA XXXVIII - Frequência de tipos nucleares de células do
músculo cardíaco de camundongo tratado (H)
contados na lâmina 2.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
2.1	2	1	5	5	2	0	1	16
2.2	3	0	7	3	1	0	0	14
2.3	4	3	11	1	0	0	0	19
2.4	3	0	4	3	7	1	1	19
2.5	1	2	5	3	9	0	1	21
TOTAL	13	6	32	15	19	1	3	89

TABELA XXXIX - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (H) contados na lâmina 3.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
3.1	7	5	5	7	10	0	1	35
3.2	3	1	1	6	6	0	1	18
3.3	0	0	0	5	9	1	0	15
3.4	1	1	6	5	6	0	1	20
3.5	3	2	5	8	7	1	0	26
TOTAL	14	9	17	31	38	2	3	114

TABELA XL - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (I) contados na lâmina 1.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
1.1	1	1	2	0	12	1	0	17
1.2	3	2	5	4	6	0	0	20
1.3	1	0	2	4	5	0	0	12
1.4	1	1	1	3	8	0	0	14
1.5	1	3	3	1	4	0	0	12
TOTAL	7	7	13	12	35	1	0	75

TABELA XLI - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (I) contados na lâmina 2.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
2.1	0	2	5	2	6	0	0	15
2.2	6	3	1	5	7	0	0	22
2.3	3	1	4	0	13	0	0	21
2.4	1	0	1	6	8	0	0	16
2.5	0	2	1	0	8	1	0	12
TOTAL	10	8	12	13	42	1	0	86

TABELA XLII - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (I) contados na lâmina 3.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
3.1	0	0	2	4	17	0	0	23
3.2	2	0	4	2	14	0	0	22
3.3	2	2	8	3	9	0	0	24
3.4	2	3	9	6	6	0	0	26
3.5	3	0	6	8	4	0	3	24
TOTAL	9	5	29	23	50	0	3	119

TABELA XLIII - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (J) contados na lâmina 1.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
1.1	1	0	5	3	8	0	1	18
1.2	1	1	4	5	7	0	1	19
1.3	2	1	3	4	7	0	3	20
1.4	0	0	7	0	6	0	0	13
1.5	5	1	0	2	9	0	0	17
TOTAL	9	3	19	14	37	0	5	87

TABELA XLIV - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (J) contados na lâmina 2.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
2.1	3	1	4	5	12	1	0	26
2.2	3	1	2	3	9	1	0	19
2.3	4	2	5	3	7	0	1	22
2.4	1	0	2	4	12	1	1	21
2.5	2	1	6	2	4	0	0	15
TOTAL	13	5	19	17	44	3	2	103

TABELA XLV - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (J) contados na lâmina 3.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	VI	V	VI	VII	
3.1	1	2	2	5	6	1	1	18
3.2	1	1	7	2	3	0	0	14
3.3	0	1	1	7	8	0	2	19
3.4	0	0	2	5	10	1	1	19
3.5	0	0	5	3	7	0	0	15
TOTAL	2	4	17	22	34	2	4	85

TABELA XLVI - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (L) contados na lâmina 1.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
1.1	2	3	1	1	8	3	1	19
1.2	1	2	1	4	18	1	1	28
1.3	2	0	0	7	10	1	2	22
1.4	3	2	0	3	11	0	0	19
1.5	4	2	2	3	6	0	0	17
1.6	4	1	3	1	10	0	1	20
1.7	1	1	1	0	8	1	0	12
1.8	2	0	1	3	9	2	0	17
TOTAL	19	11	9	22	80	8	5	154

TABELA XLVII - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (L) contados na lâmina 2.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
2.1	0	0	3	2	8	0	1	14
2.2	1	1	3	2	12	0	0	19
2.3	2	2	1	2	6	2	0	15
2.4	1	1	3	1	4	0	1	11
2.5	0	0	8	1	5	0	0	14
2.6	1	1	0	2	9	2	1	16
2.7	1	2	3	1	5	0	0	12
TOTAL	6	7	21	11	49	4	3	101

TABELA XLVIII - Frequência de tipos nucleares de células do
músculo cardíaco de camundongo tratado (M)
contados na lâmina 1.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
1.1	1	1	0	2	4	0	0	8
1.2	1	2	2	3	0	0	0	8
1.3	2	2	4	4	3	0	1	16
1.4	1	1	1	6	5	0	0	14
1.5	1	0	2	4	8	0	0	15
TOTAL	6	6	9	19	20	0	1	61

TABELA XLIX - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (M) contados na lâmina 2.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
2.1	1	3	8	0	0	0	0	12
2.2	3	2	6	2	3	0	0	16
2.3	2	0	3	2	4	0	0	11
2.4	1	1	0	2	12	0	0	16
2.5	0	0	2	12	6	0	1	21
TOTAL	7	6	19	18	25	0	1	76

TABELA L - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (M) contados na lâmina 3.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
3.1	0	2	4	7	7	0	0	20
3.2	0	0	9	5	12	1	0	27
3.3	0	1	5	0	10	0	0	16
3.4	0	2	2	2	9	0	0	15
3.5	0	0	4	2	13	0	0	19
TOTAL	0	5	24	16	51	1	0	97

TABELA LI - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (N) contados na lâmina 1.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
1.1	0	0	6	3	9	0	0	18
1.2	0	1	3	6	6	0	0	16
1.3	0	1	6	3	15	0	1	26
1.4	5	2	8	1	1	0	0	17
1.5	1	1	4	0	8	0	0	14
TOTAL	6	5	27	13	39	0	1	91

TABELA LII - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de comundongo tratado (N) contados na lâmina 2.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
2.1	1	0	5	3	17	1	0	27
2.2	3	1	3	6	6	0	2	21
2.3	2	2	5	4	1	0	2	16
2.4	3	1	5	4	8	0	0	21
2.5	1	0	4	6	7	0	0	18
TOTAL	10	4	22	23	39	1	4	103

TABELA LIIII - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (N) contados na lâmina 3.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
3.1	0	0	7	1	12	0	0	20
3.2	1	0	9	2	10	0	0	22
3.3	2	0	6	3	11	0	0	22
3.4	1	1	2	6	8	1	0	19
3.5	1	0	2	0	10	1	0	14
TOTAL	5	1	26	12	51	2	0	97

TABELA LIV - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (O) contados na lâmina 1.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
1.1	1	0	6	2	6	0	1	16
1.2	1	0	3	6	6	1	0	17
1.3	1	0	1	9	9	1	0	21
1.4	0	0	7	2	10	1	0	20
1.5	1	1	6	2	9	0	0	19
TOTAL	4	1	23	21	40	3	1	93

TABELA LV - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (O) contados na lâmina 2.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
2.1	1	1	13	5	7	1	0	28
2.2	3	3	5	17	8	0	0	36
2.3	2	2	8	4	12	0	0	28
2.4	1	0	2	4	8	0	0	15
2.5	0	0	7	1	12	0	1	21
TOTAL	7	6	35	31	47	1	1	128

TABELA LVI - Frequência de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (O) contados na lâmina 3.

Campo	Tipos nucleares (frequência)							Nº total de núcleos por campo
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
3.1	0	0	2	2	12	0	1	17
3.2	0	0	3	3	12	0	0	18
3.3	1	0	2	3	17	1	0	24
3.4	0	2	1	2	16	0	0	21
3.5	1	1	3	2	8	1	1	17
TOTAL	2	3	11	12	65	2	2	97

TABELA LVII - Frequências absolutas e percentuais relativas (entre parênteses) de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo controle (A) contados nas lâminas 1 a 4.

Lâmina	Nº de campos varridos	I	II	III	IV	V	VI	VII	Nº total de nú- cleos contados por lâmina
1	20	73 (17,72)	66 (16,02)	58 (14,08)	55 (13,35)	140 (33,98)	9 (2,18)	11 (2,67)	412
2	20	63 (14,16)	78 (17,53)	123 (27,64)	76 (17,08)	104 (23,37)	0	1 (0,22)	445
3	20	47 (10,78)	44 (10,09)	108 (24,77)	119 (27,29)	113 (25,92)	2 (0,46)	3 (0,69)	436
4	20	66 (14,86)	65 (14,64)	86 (19,37)	64 (14,41)	148 (33,33)	5 (1,13)	10 (2,25)	444
Total		249	253	375	314	505	16	25	1737
($\bar{X} \pm S$) (percentuais)		14,38 ⁺ -2,85	14,57 ⁺ -3,21	21,46 ⁺ -6,00	18,03 ⁺ -6,37	29,15 ⁺ -5,31	0,94 ⁺ -0,95	1,46 ⁺ -1,19	
frequências percentuais*		14,34 ⁺ -1,40	14,57 ⁺ -1,62	21,59 ⁺ -2,95	18,08 ⁺ -3,17	29,07 ⁺ -2,66	0,92 ⁺ -0,46	1,44 ⁺ -0,59	

TABELA LVIII - Frequências absolutas e percentuais relativas (entre parênteses) de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo controle (B) contados nas lâminas 1 a 4.

Lâmina	Nº de campos varridos	Tipos nucleares por lâmina (frequência)					Nº total de nú- cleos contados por lâmina	
		I	II	III	IV	V	VI	VII
1	20	22 (5,71)	23 (5,97)	62 (16,10)	80 (20,78)	180 (46,75)	6 (1,56)	12 (3,12)
2	20	30 (9,20)	28 (8,59)	64 (19,63)	94 (28,83)	86 (26,38)	9 (2,76)	15 (4,60)
3	20	59 (13,38)	65 (14,74)	83 (18,82)	71 (16,10)	154 (34,92)	3 (0,68)	6 (1,36)
4	20	48 (10,55)	76 (16,70)	95 (20,88)	131 (28,79)	91 (20,00)	8 (1,76)	6 (1,32)
Total		159	192	304	376	511	26	39
($\bar{X} \pm S$) (percentuais)		9,71 ⁺ -3,18	11,50 ⁺ -5,05	18,86 ⁺ -2,02	23,63 ⁺ -6,28	32,01 ⁺ -11,57	1,69 ⁺ -0,85	2,60 ⁺ -1,58
frequências percentuais*		9,89 ⁺ -1,62	11,95 ⁺ -2,56	18,92 ⁺ -1,02	23,40 ⁺ -3,26	31,80 ⁺ -5,88	1,62 ⁺ -0,40	2,43 ⁺ -0,74

TABELA LIX - Frequências absolutas e percentuais relativas (entre parênteses) de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo controle (C) contados nas lâminas 1 a 3.

Lâmina	Nº de campos varridos	Tipos nucleares por lâmina (frequência)					Nº total de nú cleos contados por lâmina	
		I	II	III	IV	V	VI	VII
1	20	180 (29,75)	174 (28,76)	156 (25,78)	63 (10,41)	18 (2,98)	6 (0,99)	8 (1,32)
2	20	167 (28,50)	212 (36,18)	140 (23,89)	45 (7,68)	14 (2,39)	2 (0,34)	6 (1,02)
3	20	84 (25,22)	93 (27,93)	94 (28,23)	34 (10,21)	22 (6,61)	0	6 (1,80)
Total		431	479	390	142	54	8	20
($\bar{X} \pm S$) (percentuais)		27,82 $\pm$ 2,34	30,96 $\pm$ 4,54	25,97 $\pm$ 2,18	9,43 $\pm$ 1,52	3,99 $\pm$ 2,28	0,44 $\pm$ 0,41	1,38 $\pm$ 0,32
frequências pereo- tuais*		28,28 $\pm$ 1,09	31,43 $\pm$ 2,75	25,59 $\pm$ 1,07	9,32 $\pm$ 0,97	3,54 $\pm$ 1,02	0,52 $\pm$ 0,28	1,31 $\pm$ 0,19

TABELA LX - Frequências absolutas e percentuais relativas (entre parênteses) de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo controle (D) contados nas lâminas 1 a 4.

Lâmina	Nº de campos varridos	Tipos nucleares por lâmina (frequência)							Nº total de nú- cleos contados por lâmina
		I	II	III	IV	V	VI	VII	
1	20	125(28,03)	100(22,42)	124(27,80)	34(7,62)	39(8,74)	9(2,02)	15(3,36)	446
2	20	81(26,82)	53(17,55)	84(27,82)	58(19,20)	11(3,64)	5(1,66)	10(3,31)	302
3	20	114(26,57)	95(22,14)	132(30,77)	57(13,29)	23(5,36)	7(1,63)	1(0,23)	429
4	20	107(24,83)	102(23,67)	110(25,52)	49(11,37)	43(9,98)	7(1,62)	13(3,02)	431
Total		427	350	450	198	116	28	39	1608
($\bar{X} \pm s$) (percentuais)		26,56 [±] 1,32	21,44 [±] 2,68	27,98 [±] 2,15	12,87 [±] 4,83	6,93 [±] 2,94	1,73 [±] 0,20	2,48 [±] 1,51	
frequências percen- tuais*		26,55 [±] 0,72	21,77 [±] 1,11	27,99 [±] 1,15	12,31 [±] 2,16	7,21 [±] 1,38	1,74 [±] 0,10	2,43 [±] 0,79	

TABELA LXI - Frequências absolutas e percentuais relativas (entre parênteses) de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (E) contados nas lâminas 1 a 3.

Lâmina	Nº de campos varridos	I	II	III	IV	V	VI	VII	Nº total de nú- cleos contados por lâmina
1	5	7 (7,45)	5 (5,32)	17 (18,08)	23 (24,47)	36 (38,30)	2 (2,13)	4 (4,26)	94
2	5	6 (8,82)	4 (5,88)	13 (19,12)	16 (23,53)	25 (36,76)	1 (1,47)	3 (4,41)	68
3	5	2 (3,45)	2 (3,45)	3 (5,17)	14 (24,14)	31 (53,45)	6 (10,34)	0	58
Total		15	11	33	53	92	9	7	220
($\bar{X} \pm S$) (percentuais)		6,57 ⁺ -2,79	4,88 ⁺ -1,27	14,12 ⁺ -7,77	24,05 ⁺ -0,47	42,84 ⁺ -9,22	4,65 ⁺ -4,94	2,89 ⁺ -2,50	
frequências percen- tuais*		6,82 ⁺ -1,37	5,00 ⁺ -0,62	15,00 ⁺ -3,89	24,09 ⁺ -0,29	41,82 ⁺ -4,60	4,09 ⁺ -2,47	3,18 ⁺ -1,26	

TABELA LXII - Frequências absolutas e percentuais relativas (entre parênteses) de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (F) contados nas lâminas 1 a 3.

Lâmina	Nº de campos varridos	Tipos nucleares por lâmina (frequência)							Nº total de núcleos contados por lâmina
		I	II	III	IV	V	VI	VII	
1	5	2 (2,94)	3 (4,41)	6 (8,82)	19 (27,94)	33 (48,53)	4 (5,88)	1 (1,47)	68
2	5	5 (7,94)	4 (6,35)	11 (17,46)	20 (31,75)	20 (31,75)	3 (4,76)	0	63
3	5	10 (11,63)	7 (8,14)	11 (12,79)	25 (29,07)	31 (36,05)	1 (1,16)	1 (1,16)	86
Total	17	17	14	28	64	84	8	2	217
($\bar{X} \pm S$) (percentuais)	7,50 $\pm$ 4,36	6,30 $\pm$ 1,87	13,02 $\pm$ 4,32	29,59 $\pm$ 1,96	38,78 $\pm$ 8,72	3,93 $\pm$ 2,47	0,88 $\pm$ 0,78		
frequências percentuais*	7,83 $\pm$ 2,63	6,45 $\pm$ 1,13	12,90 $\pm$ 2,25	29,49 $\pm$ 1,02	38,71 $\pm$ 4,69	3,69 $\pm$ 1,54	0,92 $\pm$ 0,41		

TABELA LXIII - Frequências absolutas e percentuais relativas (entre parênteses) de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (G) contados nas lâminas 1 a 3.

Lâmina	Nº de campos varridos	Tipos nucleares por lâmina (frequência)							Nº total de nú- cleos contados por lâmina
		I	II	III	IV	V	VI	VII	
1	5	10 (10,53)	16 (16,84)	34 (35,79)	17 (17,90)	18 (18,95)	0	0	95
2	5	3 (4,54)	3 (4,54)	18 (27,27)	4 (6,06)	34 (51,52)	3 (4,54)	1 (1,52)	66
3	5	16 (15,53)	6 (5,82)	39 (37,86)	11 (10,68)	27 (26,21)	2 (1,94)	2 (1,94)	103
Total		29	25	91	32	79	5	3	264
($\bar{X} \pm S$) (percentuais)		10,20 ⁺ -5,50	9,07 ⁺ -6,76	33,64 ⁺ -5,61	11,55 ⁺ -5,97	32,23 ⁺ -17,1	2,16 ⁺ -2,28	1,15 ⁺ -1,02	
frequências percentuais*		10,98 ⁺ -2,94	9,47 ⁺ -3,25	34,47 ⁺ -2,80	12,12 ⁺ -3,22	29,92 ⁺ -8,38	1,89 ⁺ -1,16	1,14 ⁺ -0,64	

TABELA LXIV - Frequências absolutas e percentuais relativas (entre parênteses) de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (H) contados nas lâminas 1 a 3.

Lâmina	Nº de campos varridos	Tipos nucleares por lâmina (frequência)							Nº total de nú- cleos contados por lâmina
		I	II	III	IV	V	VI	VII	
1	5	6 (6,59)	7 (7,69)	16 (17,58)	20 (21,98)	35 (38,46)	4 (4,40)	3 (3,30)	91
2	5	13 (14,61)	6 (6,74)	32 (35,96)	15 (16,85)	19 (21,35)	1 (1,12)	3 (3,37)	89
3	5	14 (12,28)	9 (7,90)	17 (14,91)	31 (27,19)	38 (33,33)	2 (1,75)	3 (2,63)	114
Total		33	22	65	66	92	7	9	294
($\bar{X} \pm S$) (percentuais)		11,16 ⁺ _{-4,13}	7,44 ⁺ _{-0,62}	22,82 ⁺ _{-11,46}	22,01 ⁺ _{-5,17}	31,05 ⁺ _{-8,78}	2,42 ⁺ _{-1,74}	3,10 ⁺ _{-0,41}	
frequências percen- tuais*		11,22 ⁺ _{-2,21}	7,48 ⁺ _{-0,35}	22,11 ⁺ _{-6,40}	22,45 ⁺ _{-3,07}	31,29 ⁺ _{-4,68}	2,38 ⁺ _{-0,94}	3,06 ⁺ _{-0,25}	

TABELA LXV - Frequências absolutas e percentuais relativas (entre parênteses) de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (I) contados nas lâminas 1 a 3.

Lâmina	Nº de campos varridos	Tipos nucleares por lâmina (frequência)							Nº total de núcleos contados por lâmina
		I	II	III	IV	V	VI	VII	
1	5	7 (9,33)	7 (9,33)	13 (17,33)	12 (16,00)	35 (46,67)	1 (1,33)	0	75
2	5	10 (11,63)	8 (9,30)	12 (13,95)	13 (15,12)	42 (48,84)	1 (1,16)	0	86
3	5	9 (7,56)	5 (4,20)	29 (24,37)	23 (19,33)	50 (42,02)	0	3 (2,52)	119
Total		26	20	54	48	127	2	3	280
$(\bar{x} \pm s)$ (percentuais)		9,51 ⁺ -2,04	7,61 ⁺ -2,95	18,55 ⁺ -5,32	16,82 ⁺ -2,22	45,84 ⁺ -3,48	0,83 ⁺ -0,72	0,84 ⁺ -1,45	
frequências percentuais*		9,29 ⁺ -1,26	7,14 ⁺ -1,88	19,29 ⁺ -3,38	17,14 ⁺ -1,42	45,36 ⁺ -2,22	0,71 ⁺ -0,46	1,07 ⁺ -0,92	

TABELA LXVI - Frequências absolutas e percentuais relativas (entre parênteses) de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (J) contados nas lâminas 1 a 3.

Lâmina	Nº de campos varridos	I	II	III	IV	V	VI	VII	Nº total de nú- cleos contados por lâmina
1	5	9 (10,34)	3 (3,45)	19 (21,84)	14 (16,09)	37 (42,53)	0	5 (5,75)	87
2	5	13 (12,62)	5 (4,85)	19 (18,45)	17 (16,50)	44 (42,72)	3 (2,91)	2 (1,94)	103
3	5	2 (2,35)	4 (4,71)	17 (20,00)	22 (25,88)	34 (40,00)	2 (2,35)	4 (4,71)	85
Total		24	12	55	53	115	5	11	275
$(\bar{X} \pm S)$ (percentuais)		8,44 [±] 5,39	4,34 [±] 0,77	20,10 [±] 1,70	19,49 [±] 5,54	41,75 [±] 1,52	1,75 [±] 1,54	4,13 [±] 1,97	
frequências percentuais*		8,73 [±] 3,07	4,36 [±] 0,44	20,00 [±] 1,01	19,27 [±] 3,06	41,82 [±] 0,85	1,82 [±] 0,89	4,00 [±] 1,19	

TABELA LXVII - Frequências absolutas e percentuais relativas (entre parênteses) de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (L) contados nas lâminas 1 e 2

Lâmina	Nº de campos varridos	Tipos nucleares por lâmina (frequência)							Nº total de nú cleos contados por lâmina
		I	II	III	IV	V	VI	VII	
1	8	16 (12,34)	11 (7,14)	9 (5,84)	22 (14,29)	80 (51,95)	8 (5,20)	5 (3,25)	154
2	7	6 (5,94)	7 (6,93)	21 (20,79)	11 (10,89)	49 (48,52)	4 (3,96)	3 (2,97)	101
Total		25	18	30	33	129	12	8	255
($\bar{x} \pm s$) (percentuais)		9,14 [±] 4,53	7,04 [±] 0,14	13,32 [±] 10,57	12,59 [±] 2,40	50,24 [±] 2,42	4,58 [±] 0,87	3,11 [±] 0,20	
frequências percen- tuais*		8,63 [±] 2,13	7,06 [±] 0,10	11,76 [±] 7,15	12,94 [±] 1,62	50,59 [±] 1,64	4,71 [±] 0,59	3,14 [±] 0,13	

TABELA LXVIII -Frequências absolutas e percentuais relativas (entre parênteses) de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (M) contados nas lâminas 1 a 3.

Lâmina	Nº de campos varridos	Tipos nucleares por lâmina (frequência)							Nº total de nú- cleos contados por lâmina
		I	II	III	IV	V	VI	VII	
1	5	6 (9,84)	6 (9,84)	9 (14,75)	19 (31,15)	20 (32,79)	0	1 (1,64)	61
2	5	7 (9,21)	6 (7,90)	19 (25,00)	18 (23,68)	25 (32,90)	0	1 (1,32)	76
3	5	0	5 (5,16)	24 (24,74)	16 (16,50)	51 (52,58)	1 (1,03)	0	97
Total		13	17	52	53	96	1	2	234
($\bar{x} \pm s$) (percentuais)		6,35 $\pm$ 5,51	7,63 $\pm$ 2,35	21,50 $\pm$ 5,84	23,78 $\pm$ 7,32	39,42 $\pm$ 11,39	0,34 $\pm$ 0,6	0,99 $\pm$ 0,87	
frequências percen- tuais*		5,56 $\pm$ 3,45	7,26 $\pm$ 1,37	22,22 $\pm$ 2,92	22,65 $\pm$ 4,16	41,03 $\pm$ 7,20	0,43 $\pm$ 0,38	0,85 $\pm$ 0,53	

TABELA LXIX - Frequências absolutas e percentuais relativas (entre parênteses) de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (N) contados nas lâminas 1 a 3.

Lâmina	Nº de campos varridos	Tipos nucleares por lâmina (frequência)							Nº total de nú- cleos contados por lâmina
		I	II	III	IV	V	VI	VII	
1	5	6 (6,59)	5 (5,49)	27 (29,67)	13 (14,29)	39 (42,86)	0	1 (1,10)	91
2	5	10 (9,71)	4 (3,88)	22 (21,36)	23 (22,33)	39 (37,86)	1 (0,97)	4 (3,88)	103
3	5	5 (5,16)	1 (1,03)	26 (26,80)	12 (12,37)	51 (52,58)	2 (2,06)	0	97
Total		21	10	75	48	129	3	5	291
($\bar{X} \pm s$) (percentuais)		7,15 $\pm$ 2,33	3,47 $\pm$ 2,26	25,94 $\pm$ 4,22	16,33 $\pm$ 5,28	44,43 $\pm$ 7,48	1,01 $\pm$ 1,03	1,66 $\pm$ 2,00	
frequências percen- tuais*		7,22 $\pm$ 1,39	3,44 $\pm$ 1,27	25,77 $\pm$ 2,46	16,49 $\pm$ 3,15	44,33 $\pm$ 4,42	1,03 $\pm$ 0,58	1,72 $\pm$ 1,20	

TABELA LXX - Frequências absolutas e percentuais relativas (entre parênteses) de tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongo tratado (O) contados nas lâminas 1 a 3.

Lâmina	Nº de campos varridos	Tipos nucleares por lâmina (frequência)							Nº total de nú- cleos contados por lâmina
		I	II	III	IV	V	VI	VII	
1	5	4 (4,30)	1 (1,08)	23 (24,73)	21 (22,58)	40 (43,01)	3 (3,23)	1 (1,08)	93
2	5	7 (5,47)	6 (4,69)	35 (27,34)	31 (24,22)	47 (36,72)	1 (0,78)	1 (0,78)	128
3	5	2 (2,06)	3 (3,09)	11 (11,34)	12 (12,37)	65 (67,01)	2 (2,06)	2 (2,06)	97
Total		13	10	69	64	152	6	4	318
$(\bar{x} \pm s)$ (percentuais)		3,94 [±] 1,73	2,95 [±] 1,81	21,14 [±] 8,58	19,72 [±] 6,42	48,91 [±] 15,98	2,02 [±] 1,22	1,31 [±] 0,67	
frequências percen- tuais*		4,09 [±] 1,02	3,14 [±] 1,06	21,70 [±] 4,89	20,13 [±] 3,64	47,80 [±] 9,18	1,89 [±] 0,73	1,26 [±] 0,39	

Indongos	Número de lâminas varridas	Total de campos	Tipos nucleares por camundongo							Número total de núcleos contados por camundongo
			I	II	III	IV	V	VI	VII	
controle)	4	80	14,34 ⁺ _{-1,40}	14,57 ⁺ _{-1,62}	21,59 ⁺ _{-2,95}	18,08 ⁺ _{-3,17}	29,07 ⁺ _{-2,66}	0,92 ⁺ _{-0,46}	1,44 ⁺ _{-0,59}	1737
controle)	4	80	9,89 ⁺ _{-1,62}	11,95 ⁺ _{-2,56}	18,92 ⁺ _{-1,02}	23,40 ⁺ _{-3,26}	31,80 ⁺ _{-5,88}	1,62 ⁺ _{-0,40}	2,43 ⁺ _{-0,74}	1607
controle)	3	60	28,28 ⁺ _{-1,09}	31,43 ⁺ _{-2,75}	25,59 ⁺ _{-1,07}	9,32 ⁺ _{-0,97}	3,54 ⁺ _{-1,02}	0,52 ⁺ _{-0,28}	1,31 ⁺ _{-0,19}	1524
controle)	4	80	26,55 ⁺ _{-0,72}	21,77 ⁺ _{-1,11}	27,99 ⁺ _{-1,15}	12,31 ⁺ _{-2,16}	7,21 ⁺ _{-1,38}	1,74 ⁺ _{-0,10}	2,43 ⁺ _{-0,79}	1608
tratado)	3	15	6,82 ⁺ _{-1,37}	5,00 ⁺ _{-0,62}	15,00 ⁺ _{-3,89}	24,09 ⁺ _{-0,29}	41,82 ⁺ _{-4,60}	4,09 ⁺ _{-2,47}	3,18 ⁺ _{-1,26}	220
tratado)	3	15	7,83 ⁺ _{-2,63}	6,45 ⁺ _{-1,13}	12,90 ⁺ _{-2,25}	29,49 ⁺ _{-1,02}	38,71 ⁺ _{-4,69}	3,69 ⁺ _{-1,54}	0,92 ⁺ _{-0,41}	217
tratado)	3	15	10,98 ⁺ _{-2,94}	9,47 ⁺ _{-3,25}	34,47 ⁺ _{-2,80}	12,12 ⁺ _{-3,22}	29,92 ⁺ _{-8,38}	1,89 ⁺ _{-1,16}	1,14 ⁺ _{-0,64}	264
tratado)	3	15	11,22 ⁺ _{-2,21}	7,48 ⁺ _{-0,35}	22,11 ⁺ _{-6,40}	22,45 ⁺ _{-3,07}	31,29 ⁺ _{-4,68}	2,38 ⁺ _{-0,94}	3,06 ⁺ _{-0,25}	294
tratado)	3	15	9,29 ⁺ _{-1,26}	7,14 ⁺ _{-1,88}	19,29 ⁺ _{-3,38}	17,14 ⁺ _{-1,42}	45,36 ⁺ _{-2,22}	0,71 ⁺ _{-0,46}	1,07 ⁺ _{-0,92}	280
tratado)	3	15	8,73 ⁺ _{-3,07}	4,36 ⁺ _{-0,44}	20,00 ⁺ _{-1,01}	19,27 ⁺ _{-3,06}	41,82 ⁺ _{-0,85}	1,82 ⁺ _{-0,89}	4,00 ⁺ _{-1,19}	275
tratado)	2	15	8,63 ⁺ _{-2,13}	7,07 ⁺ _{-0,10}	11,76 ⁺ _{-7,15}	12,94 ⁺ _{-1,62}	50,59 ⁺ _{-1,64}	4,71 ⁺ _{-0,59}	3,14 ⁺ _{-0,13}	255
tratado)	3	15	5,56 ⁺ _{-3,45}	7,26 ⁺ _{-1,37}	22,22 ⁺ _{-2,92}	22,65 ⁺ _{-4,16}	41,03 ⁺ _{-7,20}	0,43 ⁺ _{-0,38}	0,85 ⁺ _{-0,53}	234
tratado)	3	15	7,22 ⁺ _{-1,39}	3,44 ⁺ _{-1,27}	25,77 ⁺ _{-2,46}	16,49 ⁺ _{-3,15}	44,33 ⁺ _{-4,42}	1,03 ⁺ _{-0,58}	1,72 ⁺ _{-1,20}	291
tratado)	3	15	4,09 ⁺ _{-1,02}	3,14 ⁺ _{-1,06}	21,70 ⁺ _{-4,89}	20,13 ⁺ _{-3,64}	47,80 ⁺ _{-9,18}	1,89 ⁺ _{-0,73}	1,26 ⁺ _{-0,39}	318

tuais* de camundongos controle e tratados colocados em ordem crescente:

0,85	0,92	1,07	1,14	1,26	1,31	1,44
1,72	2,43	2,43	3,06	3,14	3,18	4,00

$$W_s^* = 6 + 7 + 9,5 = 22,5$$

W_s^* corresponde à soma dos postos médios das repetições dos valores obtidos para os camundongos controle. Os números em *itálico* representam os valores encontrados para camundongos controle.

TABELA LXXII - Valores de W_s^* encontrados para cada tipo nuclear de células do músculo cardíaco de camundongo.

Tipos nucleares	I	II	III	IV	V	VI	VII
W_s^*	48	50	35	23	12	19	22,5

Na Tabela LXXII encontram-se os valores de W_s^* correspondente a cada tipo nuclear. Estes valores foram comparados com os de uma tabela apropriada para o teste (WILCOXON *et al.*, 1970) onde temos para

12, 48 .0080

M = 4, N = 10:

13, 47 .0140

e onde M é o número de camundongos controle e N é o número de camundongos tratados. A probabilidade de que os valores de W_s^* sejam iguais ou menores que 12 ou iguais ou maiores que 48 é de 0,008 e a probabilidade de que sejam iguais ou menores que 13 ou iguais ou maiores que 47 é de 0,014. Como os valores da tabela são exatos e não contínuos, não há nela intervalos para o nível de significância 0,01, mas sim para 0,008 e 0,014. Se se quiser fazer o teste com mais rigor, usa-se o nível 0,008 e com menos rigor, o nível 0,014.

Para o nível de significância escolhido (0,008 ou 0,014), a ocorrência de W_s^* fora do intervalo correspondente implica na rejeição da hipótese de igualdade entre as frequências de tipos nucleares de animais controle e tratados. Ao contrário, a ocorrência de W_s^* dentro do intervalo de aceitação dado pela tabela implica na não rejeição da hipótese de igualdade.

Deste modo, se se considerar um nível de 0,01 de probabilidade de erro, tem-se que os valores de W_s^* para os tipos nucleares I e II foram superiores ao valor obtido na tabela do teste e para o tipo nuclear V foi inferior. Os demais tipos nucleares apresentaram valores de W_s^* dentro do intervalo de aceitação dado pela tabela.

Verifica-se, portanto, que ao nível de significância de 0,01 a frequência dos núcleos de células de camundon

gos tratados foi menor do que a frequência dos núcleos de células de camundongos controle, para os núcleos do tipo I e II. O contrário ocorreu para os núcleos do tipo V onde a frequência de núcleos de células de camundongos tratados apresentou-se maior do que a de camundongos controle. Para os demais tipos nucleares as frequências não mostraram diferenças significantes àquele nível de significância.

IV. DISCUSSÃO

1. Basofilia e anisotropia nucleares

Conforme constatado no presente trabalho, em células de animais tratados com oxamniquine, verificou-se que os padrões de basofilia e anisotropia nucleares após coloração com solução de azul de toluidina a pH 4,0 não são alterados quando comparados aos do controle. No presente trabalho as características de basofilia e anisotropia se referem à ligação do azul de toluidina com as moléculas de DNA, uma vez que o RNA foi removido enzimaticamente.

Tem sido verificado que em células tratadas com hycanthone e a seguir coradas com solução de azul de toluidina a pH 4,0 ocorrem alterações nos aspectos de basofilia (pico de absorção se move para $\lambda = 630$ nm) e, para certas concentrações da droga ocorrem sérias alterações da birrefringência (inclusive desaparecimento desse fenômeno) (MELLO *et al.*, 1978). Isto indica que houve diminuição de número de moléculas de azul de toluidina ligadas ao substrato corado e desorientação molecular do DNA. Tal se deve ao fato de que o hycanthone se intercala entre pares de bases adjacentes no DNA (WARING, 1970, 1971). Além disso, as moléculas de hycanthone se prendem a alguns dos grupos fosfatos do DNA (MELLO *et al.*, 1978). Portanto, o DNA assim tratado apresentaria alterações em sua conformação bem como na sua complexação com proteínas.

Com base nos resultados apresentados neste trabalho, referentes à oxamniquine, pode-se deduzir, portanto,

que suas moléculas não penetram no DNA nem alteram sua conformação molecular. Também demonstrou-se que as moléculas da oxamniquine não se ligam aos grupos fosfatos do DNA. Resultados semelhantes haviam sido por nós sugeridos para material vegetal (raízes de *Allium cepa*) (BECHARA & MELLO, 1979). No entanto, uma vez que se desconhecia a necessidade ou não de uma metabolização da droga no organismo animal, os dados para vegetais não podiam até agora ser extrapolados para animais, incluindo o homem.

2. Frequência de tipos nucleares em células do músculo cardíaco

Considerando-se que os núcleos dos tipos I e II são muito menores em tamanho que os do tipo V (Tabela XII; Figs. 27 a 34), uma diminuição da frequência dos primeiros e aumento de frequência do último pode significar que haja ocorrido transformação de alguns tipos nucleares em outros. Sabe-se que com o avanço da idade ou por causas patológicas, pode ocorrer um aumento de tamanho nuclear em células do músculo cardíaco de seres humanos, associado a um mecanismo de poliploidização (SANDRITTER *et al.*, 1964; FISCHER *et al.*, 1970; ADLER, 1976; STERE *et al.*, 1978).

STERE e colaboradores, em 1978, observaram um aumento na síntese de RNA e de proteínas em células de coração e consequente hipertrofia do mesmo, em ratos submetidos à hipóxia.

Em corações humanos hipertróficos tem sido relatado um aumento do número de núcleos poliplóides (SANDRITTER

et al., 1964). Estudos feitos em corações de crianças e de adultos mostraram que com o avanço da idade há um aumento no número de núcleos poliplóides. A análise do conteúdo de DNA, de proteínas histônicas e de não histônicas mostrou um aumento em sua quantidade, bem como um aumento de tamanho nuclear, em núcleos de células de corações de adultos quando comparados aos de crianças (FISCHER *et al.*, 1970; ADLER, 1976).

Talvez, no presente caso, por alguma influência da droga, tenha ocorrido aceleração do processo de poliploidização em alguns núcleos. A participação da oxamniquine nesse processo, possivelmente através de complexos mecanismos, mereceria atenção e estudos futuros.

V. CONCLUSÕES

1. Os dados de basofilia e anisotropia nucleares mostraram que não houve intercalação de moléculas de oxamniquine no interior da molécula de DNA, nem tão pouco alterações na conformação da mesma. Mostraram também não ocorrer ligações das moléculas da droga com os grupos fosfatos livres do DNA em núcleos de hepatócitos, de células do músculo cardíaco e de linfócitos de camundongos. A oxamniquine difere, portanto, do hycanthone em termos de atuação sobre o DNA.
2. Embora nos núcleos de células da musculatura cardíaca de camundongos tratados com oxamniquine a conformação do DNA e sua ligação com proteínas possivelmente não se afetem, ocorre alteração na frequência de alguns tipos nucleares, o que pode significar uma aceleração no processo de poliploidização com conseqüente transformação de alguns tipos nucleares em outros.

VI. RESUMO

Com o objetivo de se estudar a ação da oxamniquine, uma droga utilizada no tratamento da esquistossomose, na cromatina de núcleos de hepatócitos, de células do músculo cardíaco e de linfócitos de camundongos adultos jovens, foram estudados os padrões de basofilia e anisotropia nucleares dos mesmos. Os camundongos receberam a droga por via oral (436 mg/kg) e foram sacrificados, por decapitação, após diversos tempos de administração da mesma (12 hs, 24 hs, 48 hs, 7 dias). Alguns camundongos não receberam a droga e foram considerados como controle.

3962/BC/

Em decalques de fígado, esmagamentos do músculo cardíaco e esfregaços de sangue foi efetuada a análise dos padrões de basofilia e anisotropia nucleares após coloração com azul de toluidina a pH 4,0 no material resistente ao tratamento com RNase. Demonstrou-se que as moléculas de oxamniquine não penetram no interior da dupla hélice do DNA, não alteram sua conformação molecular, nem se ligam aos grupos fosfatos livres do DNA.

Por outro lado, estudando-se a frequência dos tipos nucleares de células do músculo cardíaco de camundongos adultos jovens após 30 dias de tratamento com a oxamniquine, constatou-se uma diminuição nas frequências dos tipos nucleares com tamanho menor e simultaneamente um aumento na frequência de um tipo nuclear com tamanho maior, no material tratado. Isto faz supor que a oxamniquine possa, talvez, induzir poliploidização em alguns tipos nucleares da musculatura cardíaca, possivelmente através de algum complexo mecanismo de ação.

VII. SUMMARY

With the aim of evaluating the effect of oxamniquine, a drug used in the clinical trials of schistosomiasis mansoni, the patterns of nuclear basophilia and anisotropy of the chromatin of hepatocytes, cardiac muscle and lymphocytes of young adult mice were studied. The mice received the drug orally in a single dose of 436 mg/kg and were bled at different intervals after administration of said drug (12 hrs, 24 hrs, 48 hrs, 7 days). Mice that did not receive the drug were used as the control group.

The analysis of the patterns of nuclear basophilia and anisotropy of the material stained with toluidine blue solution of pH 4,0 after treatment with RNase were carried out in imprints of liver, squashes of the cardiac muscle and blood smears. It was demonstrated that the oxamniquine molecules did not penetrate the interior of the DNA double helix, neither did they alter the molecular conformation of this nucleic acid. Furthermore, the oxamniquine molecules did not attach themselves to the free phosphate groups of the DNA.

On the other hand, the study of the frequency of nuclear types of cardiac muscle cells in young adult mice treated with oxamniquine, revealed a decrease in the frequency of nuclear types with a smaller size simultaneously to an increase in the frequency of nuclear types with a greater size. This leads to the supposition that the oxamniquine might induce polyploidization in some nuclear types of cardiac muscle, possibly through a complex mechanism.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- ADLER, C.P. 1976. DNA in growing hearts of children. Biochemical and cytophotometric investigations. *Beitr. Path.*, 158: 173-202.
- BECHARA, I.J. & MELLO, M.L.S. 1979. Estrutura cromossômica e ciclo celular após tratamentos com oxamniquine. IV Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia. Resumos dos trabalhos apresentados na sessão de painéis. Campinas. p. 119.
- COCHRAN, W.G. 1977. Estimation of a ratio. In: *Sampling Techniques*. 3 ed. New York, John Wiley & Sons. p. 30-34 (A Wiley Publication in applied statistics).
- COUTINHO, A., DOMINGUES, A.L.C. and BONFIM, J.R. 1973. Treatment of Manson's Schistosomiasis with oxamniquine. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 6: 15-34.
- FISCHER, B., SCHLIETER, G., ADLER, C.P. and SANDRITTER, W. 1970. Cytophotometric DNA, histone and non-histone protein determinations on human hearts. *Beitr. Path.*, 141: 238-260.
- FOSTER, R. 1973. The preclinical development of oxamniquine. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 6: 1-9.

- GRANT, J.C.B. 1946. *Atlas de Anatomia*. Rio de Janeiro, Editora Guanabara.
- GREEN, S., SAURO, F.M. and LEGATOR, M.S. 1973. Cytogenetic effects of hycanthone in the rat. *Mutat. Rev.*, 17:239-244.
- HOLDEN, H.E., RAY, V.A., WAHRENBURG, N.G. and FLORIO, J.R. 1974. A cytogenetic survey of schistosomicides. *Somatic Cell Genetics Conference*, Isla de Sto. Thomas, Virgin Islands, p. 10.
- KATZ, N., PELLEGRINO, J., GRINBAUM, E., CHAVES, A. and ZICKER, F. 1973. Further clinical trials with oxamniquine, a new antischistosomal agent. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 6:35-40.
- LISON, L. 1960. *Histochimie et Cytochimie Animales*. Paris, Gauthier - Villars.
- MELLO, M.L.S., RAYMUNDO, H.H. and PRETTI, M.C.M. 1978. Action of hycanthone methanesulfonate on chromatin basophilia and anisotropy in onion meristems. *Cytologia*, 43: 397-404.
- MELLO, M.L.S. and VIDAL, B.C. 1973. Anisotropic properties of toluidine blue-stained collagen. *Ann. Histochim.*, 18: 103-122.
- MELLO, M.L.S. and VIDAL, B.C. 1974. Optical properties of plant chromosomes during mitosis. *Cytologia*, 39:315-320.

- MELLO, M.L.S. and VIDAL, B.C. 1977. Changes in anisotropic properties and nuclear stainability during spermatogenesis in the Grasshopper, *Staurorhectus longicornis* Giglio-Toss. *Adv. Invert. Reprod.*, 1:75-83.
- MIURA, A. and OHBA, Y. 1967. Structure of nucleohistone. III. Interaction with toluidine blue. *Biochim. Biophys. Acta*, 145:436-445.
- MONSALVE, M.V., PESSOA, O.F., CAMPOS, A.M.G. and SETTE, H. 1976. A study of chromosomes of schistosomiasis patients under oxamniquine (UK 4271) treatment. *J. Toxicol. Envir. Health.* 1:1023-1026.
- OBE, G. 1969. Zur wirkung von Miracil auf menschliche Leukozyten - Chromosomen "in vitro". *Molec. gen. Genetics* 103-326.
- PEDRO, R.J., AMATO NETO, V., FREDDI, N.A., BERTAZZOLI, S. B. and DIAS, L.C.S. 1973. Treatment of schistosomiasis mansoni with oxamniquine by intramuscular route: preliminary data. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 6:63-66.
- RICHARDS, H.C. and FOSTER, R. 1969. A new series of 2-aminomethyltetrahydroquinoline derivative displaying schistosomicidal activity in rodents and primates. *Nature*, 222:581-582.
- ROCHA, L.R.S.C. and KATZ, N. 1973. Action of hycanthone on onion meristems. *Ciência e Cultura*, 25:348-350.

- SANDRITTER, W. and SCOMAZZONI, G. 1964. Deoxyribonucleic acid content (Feulgen photometry) and dry weight (Interference Microscopy) of normal and hypertrophic heart muscle fibres. *Nature*, 202:100-101.
- SIEBER, S.M., WHANG-PENG, J., JOHNS, D.G. and ADAMSON, R.H. 1973. Effects of hycanthone on rapidly proliferating cells. *Biochem. Pharmac.*, 22:1253-1262.
- SIEGEL, S. 1956. The Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test. In: *Nonparametrics statistics: for the behavioral sciences*. New York, MacGrow-Hill. Cap. 5. p.75-83, (MacGrow-Hill series in psychology).
- SILVA, L.C., SETTE Jr., H., CHAMONE, D.A.F., ALQUEZAR, A.S. and MONTEIRO, A.A. 1973. Oxamniquine (UK 4271) for the treatment of Manson's Schistosomiasis in a non endemic area. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 6:58-62.
- STERE, A.J., BRISTER, N.W. and ANTHONY, A. 1978. Cytophotometric analyses of myocardial RNA in rats exposed to altitude hypoxia. *J. Histochem. Cytochem.*, 26:459-467.
- VIDAL, B.C. 1972. Birefringence measurements on toluidine blue-stained chromosomes during mitosis. *Ann. Histochem.*, 17:145-150.
- WARING, M. 1970. Variation of the supercoils in closed circular DNA by binding of antibiotics and drugs: evidence

for molecular models involving intercalation. *J. Mol. Biol.*, 54:247-279.

WARING, M. 1971. Binding of drugs to supercoiled circular DNA: evidence for and against intercalation. *Progr. Mol. Subcell. Biol.*, 2:216-231.

WILCOXON, F., KATTI, S.K. and WILCOX, R.A. 1970. Critical values and probability levels for the Wilcoxon rank sum test and the Wilcoxon signed rank test. In: Harter, H. L. & Owen, D.B., eds. *Selected tables in mathematical statistics*. Chicago, Markham. V. 1 p. 171-259. (Markham series in statistics).