

MARA ALICE FERNANDES DE ABREU

CRESCIMENTO DO FÊMUR DURANTE A LACTAÇÃO, EM RATOS,  
CUJAS MÃES FORAM TRATADAS COM VITAMINA A NO 10º  
DIA DE GESTAÇÃO. ESTUDO MORFOLÓGICO E MORFOMÉTRICO.

Dissertação apresentada à Facul-  
dade de Medicina de Ribeirão Pre-  
to da U.S.P. para obtenção do tí-  
tulo de Mestre em Ciências (Mor-  
fologia-Biologia Celular).

ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> SÁLUA IUCIF

RIBEIRÃO PRETO

1 9 7 9

*Aos meus pais,*

*Alice e José,*

*que com sua confiança me  
encorajaram a prosseguir*

*Ao meu irmão*

*Márcio,*

*que com seu estímulo  
ajudou-me a vencer*

À você

*Rays,*

*em cujo apoio está toda*

*a minha segurança*

À Profa.Dra. SÁLUA IUCIF,

pela orientação e amizade

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof.Dr. Ruberval Armando Lopes, pelas sugestões e críticas que ajudaram a enriquecer este trabalho.

- À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, "Campus" de Jaboticabal, da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, pela oportunidade concedida.
- Ao Departamento de Morfologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, pela acolhida e cessão dos animais e equipamentos necessários.
- Ao Departamento de Ciências Morfológicas da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, pela utilização do aparelho Visopan.
- Aos colegas, José Renan Vieira da Costa e Valder Rodrigues de Melo, pela execução da documentação fotográfica.
- Ao Sr. Geraldo Lorival da Silva, pela atenção que sempre me concedeu e pelo tratamento cuidadoso dispensado aos animais.
- Ao Sr. Antonio de Campos, pelo auxílio na execução do material histológico.
- À Sra. Edith H. Werneck, pelo excelente trabalho de datilografia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Superior (CAPES) projeto PICD, que subvencionou a fase inicial deste projeto.

A todos que colaboraram na realização deste trabalho.

## Í N D I C E

1. <u>INTRODUÇÃO</u> .....	1
2. <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	
2.1. Material .....	3
2.2. Técnica de Dissecção, Pesagem e Mensuração ..	5
2.3. Técnica Histológica .....	6
2.4. Técnica Morfométrica Para Avaliação das Zonas Cartilaginosas e de Ossificação .....	6
2.5. Técnica Estatística .....	8
3. <u>RESULTADOS</u>	
3.1. Aspecto Morfológico .....	9
3.1.1. Estudo dos Pesos Corporal e do Fêmur.	9
3.1.2. Estudo do Comprimento do Fêmur .....	11
3.2. Resultados Histológicos .....	12
3.2.1. Zona de Cartilagem em Repouso .....	12
3.2.2. Zona de Cartilagem Seriada .....	17
3.2.3. Zona de Cartilagem Hipertrófica .....	18
3.2.4. Zona de Ossificação .....	22
3.3. Resultados Morfométricos .....	25
3.3.1. Zona de Cartilagem em Repouso .....	25
3.3.2. Zona de Cartilagem Seriada .....	29
3.3.3. Zona de Cartilagem Hipertrófica .....	33
3.3.4. Zona de Ossificação .....	37
3.3.5. Relação Citoplasma-Nuclear .....	40
4. <u>DISCUSSÃO</u> .....	47
5. <u>SUMÁRIO E CONCLUSÕES</u> .....	54
6. <u>SUMMARY AND CONCLUSIONS</u> .....	58
7. <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> .....	62

\* \* \* \*

## 1. INTRODUÇÃO

O interesse pelo estudo do crescimento do fêmur de ratos recém-nascidos, cujas mães receberam vitamina A no 10º dia de gestação, foi despertado por dois motivos:

1. não se encontrou, na literatura, trabalhos que tratassem do crescimento do fêmur durante o período da lactação.

Desta maneira, os pesquisadores perderam a informação de um dos períodos mais significativos do desenvolvimento do rato, isto é, o que se estende do nascimento até o 15º dia de vida pós-natal.

2. Em trabalhos sobre ossos, os autores se preocuparam somente com os efeitos da administração de doses elevadas de vitamina A, em animais adultos ou durante a vida fetal.

Em vários trabalhos, dados contraditórios foram observados quanto ao efeito da hipervitaminose A. Alguns autores descrevem antecipação dos processos condrogenéticos e osteogénéticos (WOLBACH, 1947; MELLANBY, 1947; MOORE & WANG, 1945; MADDOCK, WOLBACH & MADDOCK, 1949; outros relatam ace-



leração desses processos (BAUME, CONNE & KÖRNER, 1970) e, finalmente outros verificaram parada do crescimento e reabsorção óssea em ratos e cobaias ( HERBST, PAVCEK, ELVEHJEM, 1944; MELLANBY, 1944; MOORE & WANG, 1945).

Com base nestes elementos, propôs-se o presente trabalho, onde se procurou estudar o crescimento do fêmur durante a lactação, em ratos, cujas mães foram tratadas com vitamina A no 10º dia de gestação. Os efeitos desse tratamento sobre o disco epifisário distal do fêmur de ratos, durante o período da lactação, foram avaliados através de técnicas morfométricas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material

Para o estudo dos efeitos da vitamina A em ratos recém-nascidos, foram utilizadas ratas adultas (*Rattus norvegicus*, variedade Wistar), com peso corporal em torno de 200 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. Após o acasalamento foram obtidos esfregaços vaginais os quais eram corados pela técnica de Shorr, com a finalidade de verificar a presença de espermatozoides. Quando tal fato acontecia, considerava-se este como o 1º dia de gravidez.

Tendo em vista a grande variação das dosagens de vitamina A preconizada na literatura, procurou-se estabelecer, em experiência preliminar, uma dose de vitamina A que, administrada no 10º dia de gravidez, não provocasse malformações na ninhada.

A dosagem estabelecida, que não foi letal e não provocou malformações nos ratos recém-nascidos, foi de 0,20 ml

de AROVIT<sup>®</sup> contendo 30 000 UI de vitamina.

Uma vez determinada a dosagem padrão, foram utilizadas 20 ratas grávidas divididas em 2 grupos:

GRUPO I (Ratas Injetadas) - 10 ratas que no 10º dia de gravidez receberam uma única injeção intraperitoneal, de 0,20 ml de AROVIT<sup>®</sup> contendo 30 000 UI de vitamina A.

GRUPO II (Ratas Controles) - 10 ratas que no 10º dia de gravidez receberam uma única injeção intraperitoneal, de 0,20 ml de solução de NaCl a 0,85%.

As ratas de ambos os grupos estudados receberam ração comercial e água *ad libitum* e para cada uma delas foi mantida uma ninhada de 8 filhotes.

Para as pesagens corporal e do fêmur, bem como para as medidas do fêmur, foram utilizados 160 ratos recém-nascidos, divididos em dois grupos:

GRUPO I (tratado) - 80 ratos recém-nascidos de ambos os sexos, cujas mães receberam uma única dose de 0,20 ml de AROVIT<sup>®</sup>, no 10º dia de gravidez. Es

---

<sup>®</sup> - Palmitato de vitamina A, em solução coloidal hidromiscível (Produtos Roche)

ses animais para facilidade de expressão foram denominados tratados.

GRUPO II (controle) - 80 ratos recém-nascidos de ambos os sexos, cujas mães receberam uma única dose de solução salina de 0,20 ml, no 10º dia de gravidez. Esses animais foram denominados controles.

## 2.2. Técnica de Dissecção, Pesagem e Mensuração

Os animais de ambos os grupos estudados foram pesados e sacrificados aos 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19 e 22 dias de vida pós-natal, por inalação de éter anestésico, e logo em seguida imersos em solução de Alfac (álcool 80%, 85 ml; formaldeído, 10 ml e ácido acético, 5 ml).

Após a fixação durante 48 horas, procedeu-se à dissecção do fêmur do lado esquerdo com o auxílio de uma lupa (1,2x) e em seguida à pesagem em balança de torção com sensibilidade de 1 miligrama. Para cada idade de cada grupo estudado foram calculadas as médias do peso corporal e do fêmur e estas, projetadas no gráfico.

Para a medida do comprimento do fêmur esquerdo, utilizou-se um paquímetro com precisão de 0,1 mm tomando como pontos de reparo o trocanter maior e o côndilo lateral. Após as medidas feitas em 10 animais de cada idade, em cada grupo experimental, foram calculadas as médias para cada um desses grupos.

### 2.3. Técnica Histológica

Para o estudo histológico utilizou-se o fêmur do lado esquerdo, em número de 5 por idade e grupo experimental, num total de 80 fêmures. Os ossos foram imersos em solução de Alfac por mais 24 horas, descalcificados numa solução em partes iguais de ácido fórmico a 12,5% e citrato de sódio a 20% e, a seguir, desidratados por uma série crescente de alcoois, diafanizados e incluídos em parafina. Os cortes seria dos com 7 micrômetros de espessura foram corados pela técnica do hemalúmen e eosina e pela tricrômica de Masson para observação ao microscópio.

### 2.4. Técnica Morfométrica Para Avaliação das Zonas Cartilaginosas e de Ossificação

O método empregado para avaliação percentual das estruturas dos tecidos cartilaginoso e ósseo do fêmur de ratos de ambos os grupos estudados, durante o período da lactação, foi uma variante da técnica de CHALKLEY (1943).

Neste experimento, os cortes histológicos centrais foram projetados no "ecran" de um Visopan (Reichert) com aumento final de 500x. Sobre a imagem projetada adaptava-se uma grade de 81 pontos, determinados pela intersecção de 9 linhas perpendiculares e dispostos em papel vegetal, distantes 0,5 cm um do outro perfazendo uma área de 4 cm x 4 cm

( $4 \times 10^6 \mu\text{m}$ ). Em lugar dos 600 pontos indicados pelo método de CHALKLEY (1943) procedia-se à contagem, na área central do disco epifisário, de 1296 pontos coincidentes no núcleo, condroplasto e matriz, para cada uma das áreas cartilaginosas correspondentes às zonas em repouso, seriada e hipertrófica da epífise distal do fêmur; para o tecido ósseo foram contados 405 pontos coincidentes com as trabéculas da zona mais central da diáfise do fêmur esquerdo (Fig. 1).

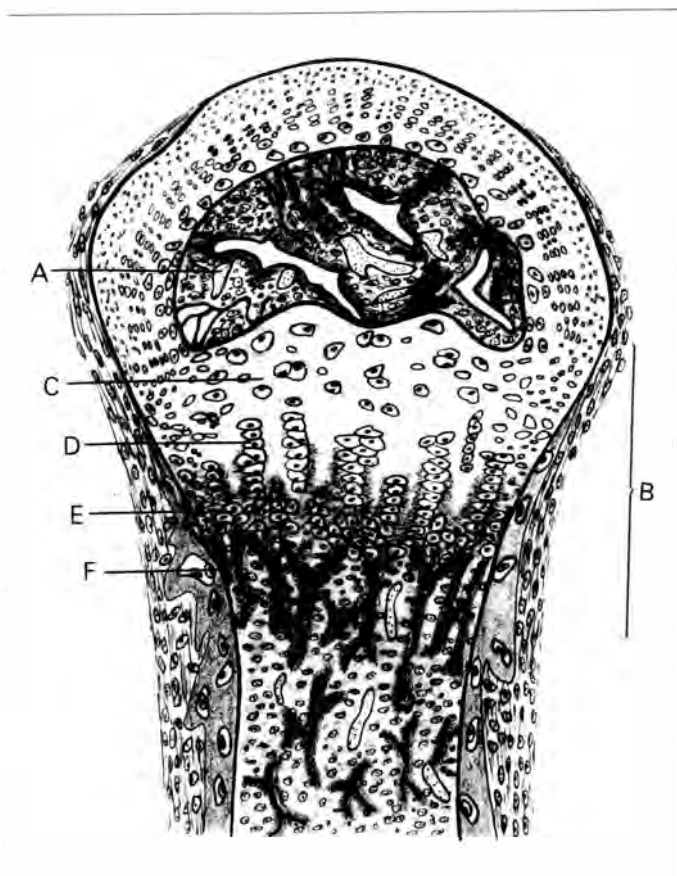


FIGURA 1 - Esquema do osso fêmur do rato estudado mostrando: A) centro de ossificação; B) disco epifisário; C) zona de cartilagem em repouso; D) zona de cartilagem seriada; E) zona de cartilagem hipertrófica; F) trabéculas do lado diafisário do disco epifisário.

Tanto para as zonas cartilaginosas como para a zona de ossificação, os valores numéricos das estruturas estudadas (núcleo, condroplasto e matriz) obtidos de 5 animais para cada idade, em ambos os grupos experimentais, foram transformados em valores percentuais. Estes dados, que indicam a percentagem da área de cada estrutura, sofreram uma transformação angular (LISON, 1961; SNEDECOR, 1972) através de  $\text{ARC SEN } \sqrt{\frac{P}{100}}$  e foram submetidos à análise de variância.

Para avaliação da relação citoplasma-nuclear, o procedimento foi o seguinte: calculou-se a média dos valores do citoplasma para 5 animais de uma mesma idade, em cada grupo experimental. Fez-se o mesmo quanto aos valores do núcleo. Em seguida, estabeleceu-se a relação citoplasma-nuclear para cada idade e cada grupo experimental. Os valores obtidos foram transformados em logaritmos e projetados no gráfico.

## 2.5. Técnica Estatística

Para comparação entre os valores obtidos das estruturas da cartilagem (núcleo, condroplasto e matriz) e do osso (trabéculas) nos dois grupos experimentais com 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19 e 22 dias de vida pós-natal, empregou-se a análise de variância. Foi tomado como nível de significância o valor de 1%.

Para as comparações entre os valores do comprimento do fêmur, para cada idade e tratamento, utilizou-se o teste *t* de Student (LISON, 1958) para diferença de média.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Aspecto Morfológico

Os ratos tratados não apresentaram malformações, nem alterações de peso e tamanho corporal, quando comparados aos ratos controles. Observou-se também um comportamento normal do animal tratado quanto à postura, movimentos corporais, alimentação e desenvolvimento, durante todo o período da lactação.

##### 3.1.1. Estudo dos Pesos Corporal e do Fêmur

A Figura 2 mostra a projeção das médias do peso corporal e do peso do fêmur do animal controle e do animal tratado, em função dos dias de vida pós-natal. O exame desta figura mostra uma modificação da inclinação dos pontos correspondentes aos pesos corporal e do fêmur em torno do 10º dia de vida pós-natal. Além deste fato, que caracteriza a existência de um ponto crítico durante o desenvolvimento do ani-



mal, outro chama a atenção por se tratar de um comportamento semelhante na distribuição dos dados tanto no que se refere ao peso corporal como ao peso do fêmur, em ambos os grupos experimentais.

Tais resultados vieram confirmar a estimativa de que a dose de vitamina A utilizada neste experimento não era letal, nem teratogênica, permitindo aos animais tratados, um desenvolvimento semelhante ao dos ratos normais.

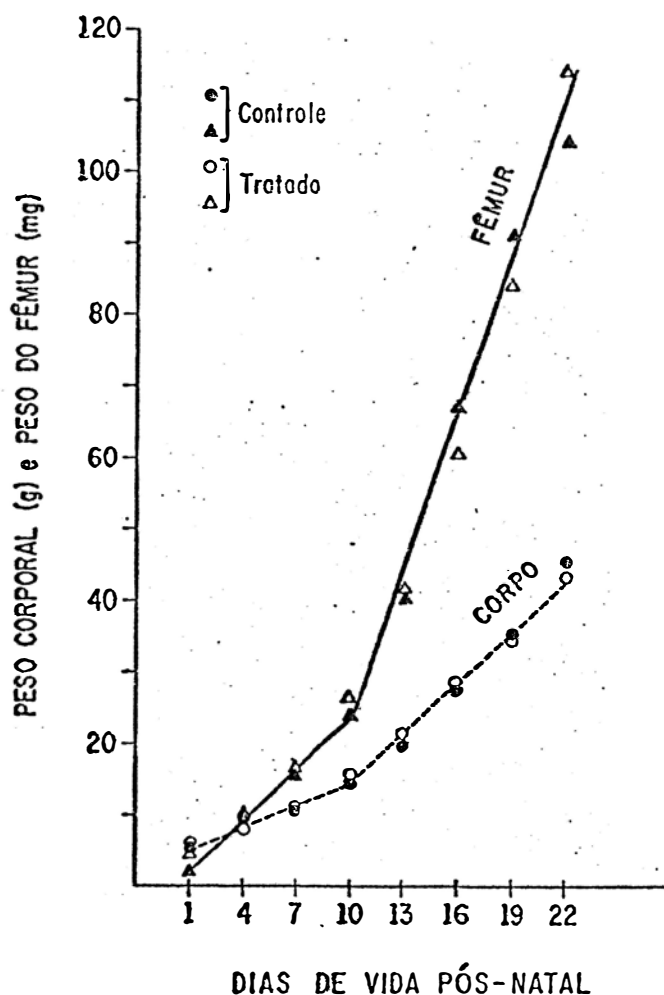


FIGURA 2 - Projeção das médias dos pesos corporais dos animais controle (●) e tratado (○) e das médias dos pesos do fêmur dos animais controle (▲) e tratado (△) em função dos dias de vida pós-natal.

### 3.1.2. Estudo do Comprimento do Fêmur

Na Tabela 1 estão relacionados os valores médios das medidas do comprimento do fêmur de 10 animais para cada grupo etário de ambos os grupos experimentais. Os valores de "t" e a probabilidade para a comparação entre cada idade em ambos os grupos experimentais também são apresentados. Por esta análise, ficou evidente que a diferença entre o comprimento do fêmur dos animais tratados e controles foi estatisticamente significativa até o 10º dia de vida pós-natal. Com base nestes achados, pode-se admitir a hipótese de que o animal tratado apresentou maior crescimento do fêmur em relação ao do animal controle, nos 10 primeiros dias de vida pós-natal; a partir de então a taxa de crescimento de ambos se equivale.

TABELA 1 - Médias dos valores do comprimento do fêmur (mm) dos animais controle e tratado, para cada grupo etário. Valores de t. Probabilidade.

Dias de vida Pós-natal	Controle	Tratado	Valor t	Probabilidade
1	6,25	6,79	2,45	5%
4	7,61	8,26	3,42	1%
7	9,06	9,66	2,73	5%
10	10,64	11,13	2,23	5%
13	12,18	12,77	1,90	NS
16	14,04	14,45	1,00	NS
19	15,65	16,15	1,22	NS
22	17,55	17,79	0,83	NS

Valor crítico de t a 5% = 2,10

## 3.2. Resultados Histológicos

### 3.2.1. Zona de Cartilagem em Repouso

A zona de cartilagem em repouso do rato controle, nos primeiros dias de vida pós-natal, apresenta condrócitos pequenos, os quais aumentam gradativamente com o desenvolvimento do animal e estão regularmente espalhados na matriz intercelular abundante (Fig. 3A e C).

No 10º dia de vida pós-natal, nota-se na porção central da epífise, matriz mais abundante e condrócitos mais espalhados e hiperplasiados (Fig. 4C).

No 13º dia de vida pós-natal, observa-se o aparecimento do centro de ossificação (Fig. 5A).

Nos 16º, 19º e 22º dias de vida pós-natal, o aspecto histológico da zona de cartilagem em repouso apresenta um maior número de células e maior quantidade de matriz (Fig. 5C).

Para o animal tratado (Fig. 3B e D), nos primeiros dias de vida pós-natal, a zona de cartilagem em repouso mostra um maior número de células e matriz menos abundante, quando comparada à do animal controle (Fig. 3A e C).

No 7º dia de vida pós-natal (Fig. 4B), observa-se a presença de condrócitos hiperplasiados na porção central da epífise, o que não ocorre no animal controle (Fig. 4A); esta hiperplasia acarreta a calcificação da substância intercelular que os envolve, fragmentando-a e constituindo cavidades

que com a penetração de vasos, caracterizam o centro de ossificação.

No animal com 10 dias de idade, na porção central da epífise, aparece então o centro de ossificação (Fig. 4D) e é evidente o maior número de células e uma menor quantidade de matriz, quando comparado ao do controle (Fig. 4C).

A partir do 10º dia de vida pós-natal até o final da lactação, o aspecto histológico da zona de cartilagem em repouso, do animal tratado, difere quanto ao número de células e à quantidade de matriz (Fig. 5B e D) em relação ao do animal controle (Fig. 5A e C). Quanto ao centro de ossificação (Fig. 5B e D), nota-se maior desenvolvimento e deposição de matriz óssea sobre os remanescentes da cartilagem calcificada, em relação ao do animal controle (Fig. 5A e C).

O fato da zona de cartilagem em repouso não participar do crescimento do osso e sim, promover a fixação do disco epifisário (HAM, 1967), um maior número de células e quantidade menor de matriz observada para o animal tratado, sugere para estes animais que a zona de cartilagem em repouso antecipa o processo da fixação do disco ao osso da epífise (10º dia), em relação à do animal controle (13º dia).

FIGURA 3 - Cortes da extremidade distal do fêmur de ratos com 1 dia de vida pós-natal, controle (A) e tratado (B); com 4 dias de vida pós-natal, controle (C) e tratado (D). Para o animal tratado, evidencia-se maior número de condrócitos e matriz menos abundante na zona de cartilagem em repouso do disco epifisiário. H.E. Aumento 200x.

ZR - zona de cartilagem em repouso

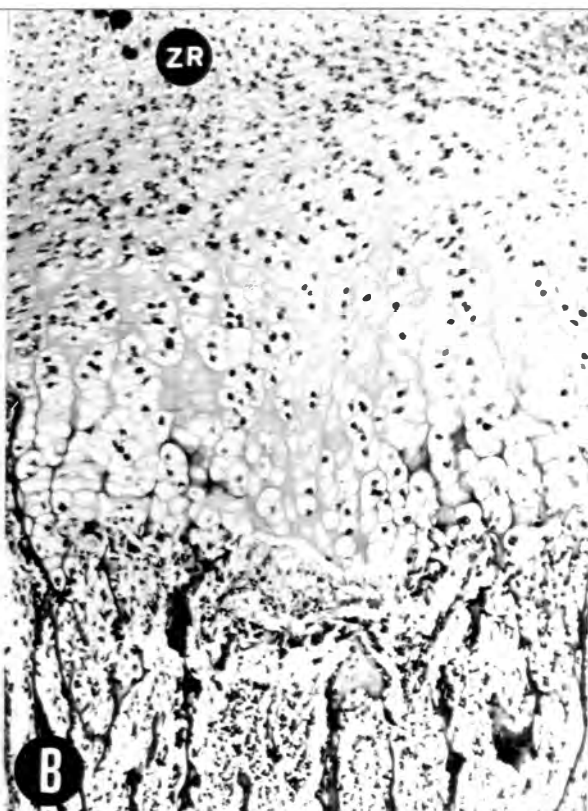


FIGURA 4 - Cortes da extremidade distal do fêmur de ratos com 7 dias de vida pós-natal, controle (A) e tratado (B); com 10 dias de vida pós-natal, controle (C) e tratado (D). Evidenciam-se, na zona de cartilagem em repouso do disco epifisário do animal tratado, com 7 dias de vida pós-natal, condrôcitos hiperplasiados

Observa-se também o aparecimento do centro de ossificação secundário para o animal tratado, com 10 dias de vida pós-natal. H.E. Aumento 64x.

- ZR zona de cartilagem em repouso
- CO centro de ossificação.

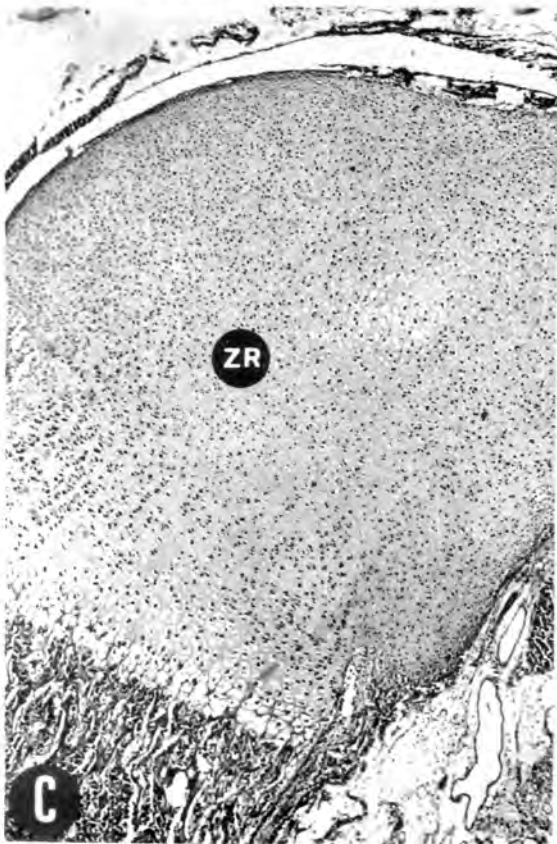
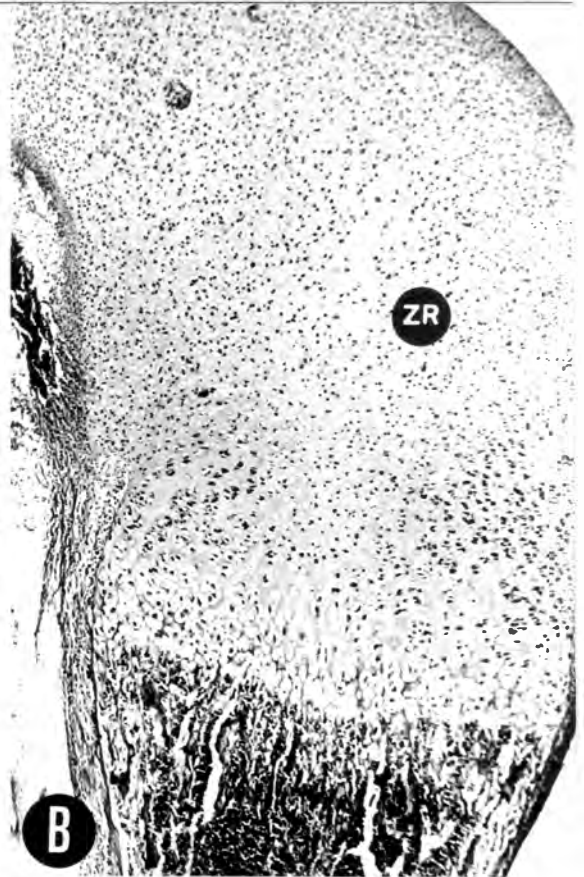
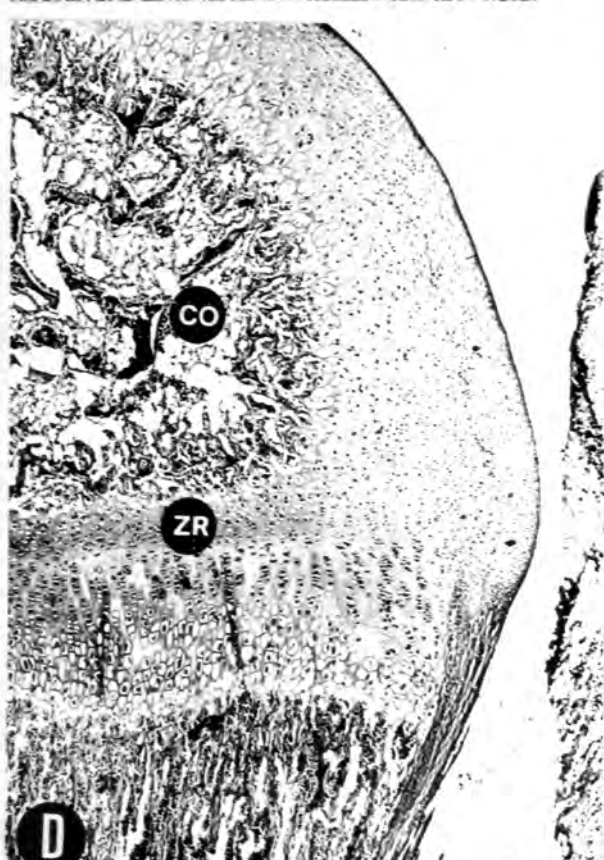
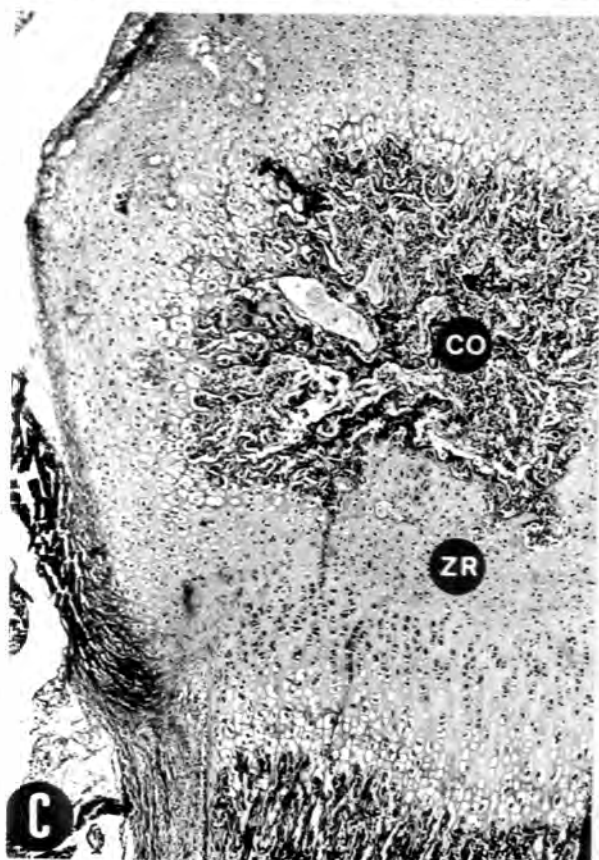
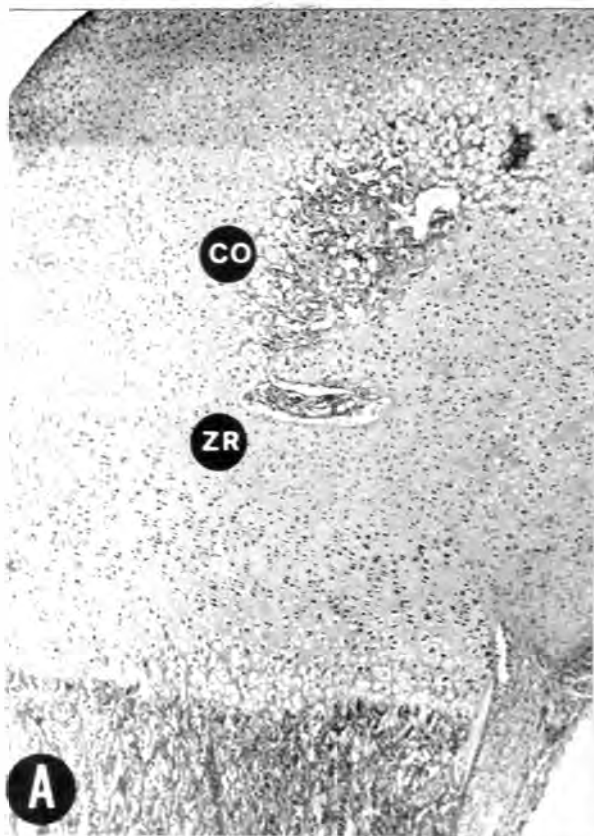




FIGURA 5 - Cortes da extremidade distal do fêmur de ratos com 13 dias de vida pós-natal, controle (A) e tratado (B); com 16 dias de vida pós-natal, controle (C) e tratado (D). Evidencia-se o centro de ossificação mais desenvolvido, maior número de condrócitos e matriz menos abundante, na zona de cartilagem em repouso do disco epifisário do animal tratado, quando comparado ao do controle. H.E. Aumento 64x.

ZR - zona de cartilagem em repouso  
CO - centro de ossificação



### 3.2.2. Zona de Cartilagem Seriada

A zona de cartilagem seriada do animal controle, nos primeiros 10 dias de vida pós-natal, apresenta condrôcitos jovens, geralmente delgados e com a forma de uma cunha. Estas células dispõem-se em colunas no sentido longitudinal do osso, separadas pela matriz cartilaginosa (Fig. 6A e C).

A partir do 10º dia de vida pós-natal, os condrôcitos apresentam-se com as características já referidas; observa-se porém, aumento do número de células com conseqüente aumento na altura das colunas de condrôcitos. Deste fato decorre um aumento de espessura da zona de cartilagem seriada de acordo com a idade (Fig. 7A e C).

Para o animal tratado, nos primeiros 10 dias de vida pós-natal, observa-se maior quantidade de células e matriz abundante (Fig. 6B e D) quando comparado ao animal controle (Fig. 6A e C).

A partir do 10º dia de vida pós-natal até o final do período estudado, o aspecto histológico da zona de cartilagem seriada do animal tratado (Fig. 7B e D) aproxima-se ao do animal controle (Fig. 7A e C) quanto à quantidade de célula e matriz e à disposição das colunas celulares.

Estes achados histológicos sugerem para o animal tratado, uma maior atividade mitótica da zona seriada, durante os 10 primeiros dias de vida pós-natal, em relação ao animal controle.

### 3.2.3. Zona de Cartilagem Hipertrófica

Para o animal controle, a zona de cartilagem hipertrófica apresenta, nos 10 primeiros dias de vida pós-natal, condrócitos dispostos em colunas irregulares, sendo que os mais próximos da zona de cartilagem seriada apresentam-se de volume menor e os próximos à zona de cartilagem de erosão, mais volumosos e com pouca substância intercelular (Fig. 6A e C).

Após o 10º dia de vida pós-natal, os condrócitos dispõem-se ordenadamente formando colunas distantes umas das outras em decorrência do aumento da substância intercelular (Fig. 7A e C).

Para o rato tratado, durante todo o período estudado, a zona de cartilagem hipertrófica apresenta menor número de células e matriz aumentada (Figs. 6B e D; 7B e D), quando comparada à do animal controle (Figs. 6A e C; 7A e C). Esta zona de cartilagem é a de maturação: nela as células se hipertrofiam, elaboram a fosfatase que calcifica a substância intercelular. Tal substância aprisiona as células causando-lhes a morte e o desaparecimento. Assim, com a desintegração do tecido cartilaginoso inicia-se a formação do osso (HAM, 1967).

As observações histológicas, obtidas deste experimento, revelam que o menor número de células presentes na zona de cartilagem hipertrófica pode indicar um estágio de ma-

turação mais avançado e conseguinte antecipação do processo de ossificação para o animal tratado, em relação ao do controle.

FIGURA 6 - Cortes da extremidade distal do fêmur de rato com 1 dia de vida pós-natal, controle (A) e tratado (B); com 10 dias de vida pós-natal, controle (C) e tratado (D). Para o animal tratado, evidenciam-se condrócitos mais volumosos e matriz menos abundante na zona de cartilagem seriada do disco epifisário. Para a zona de cartilagem hipertrófica, observa-se menor número de células e matriz mais abundante para o animal tratado em relação ao controle. H.E. Aumento 200x.

ZS - zona de cartilagem seriada

ZH - zona de cartilagem hipertrófica.

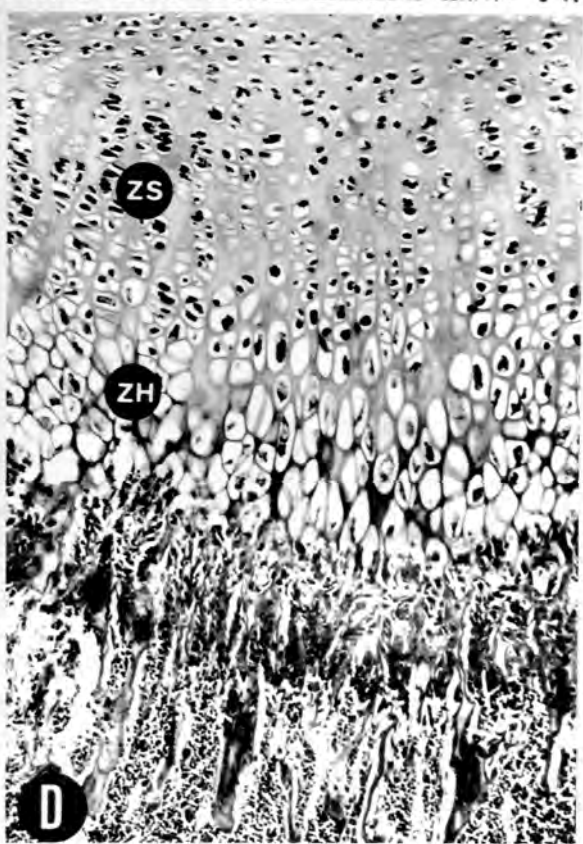
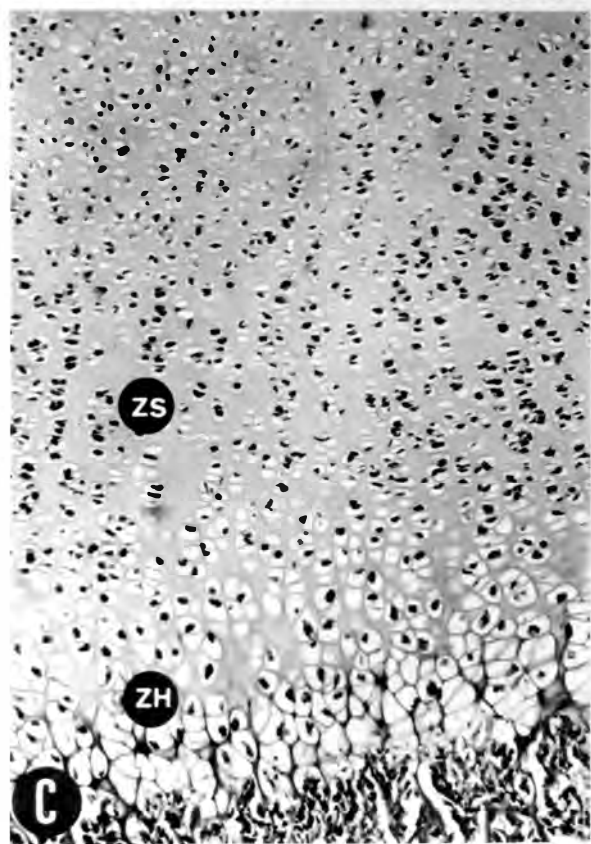
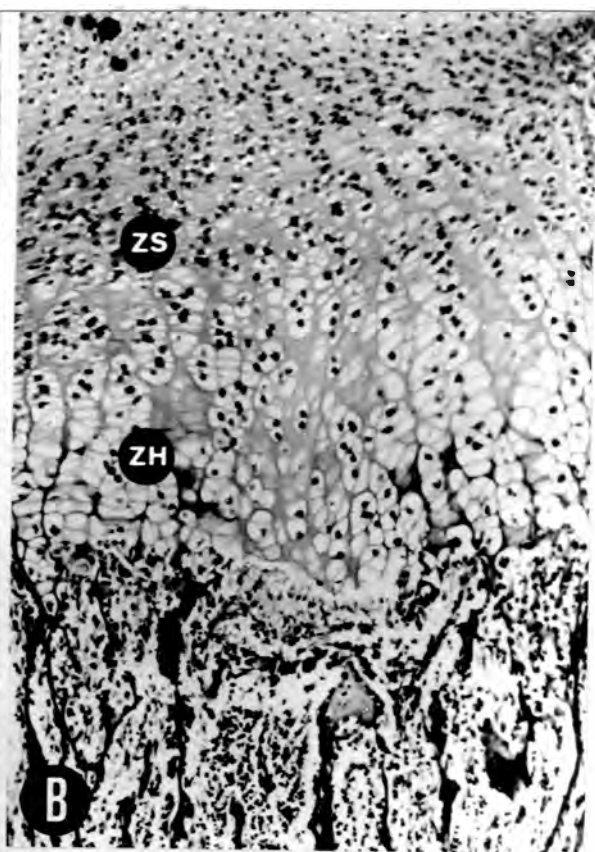
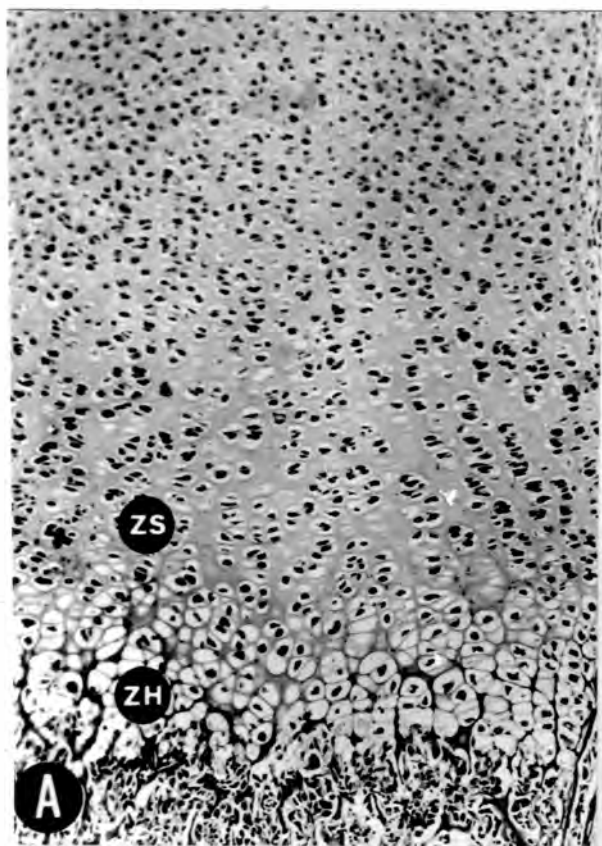
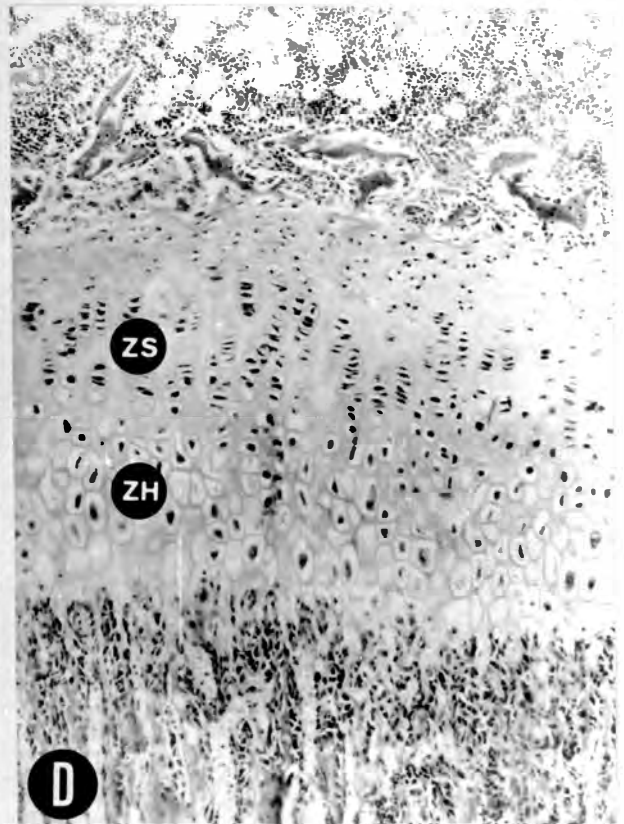
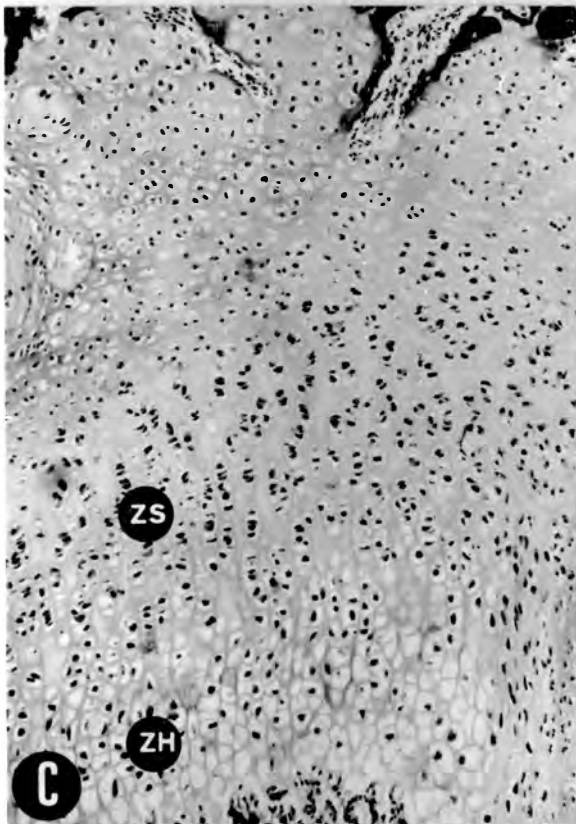
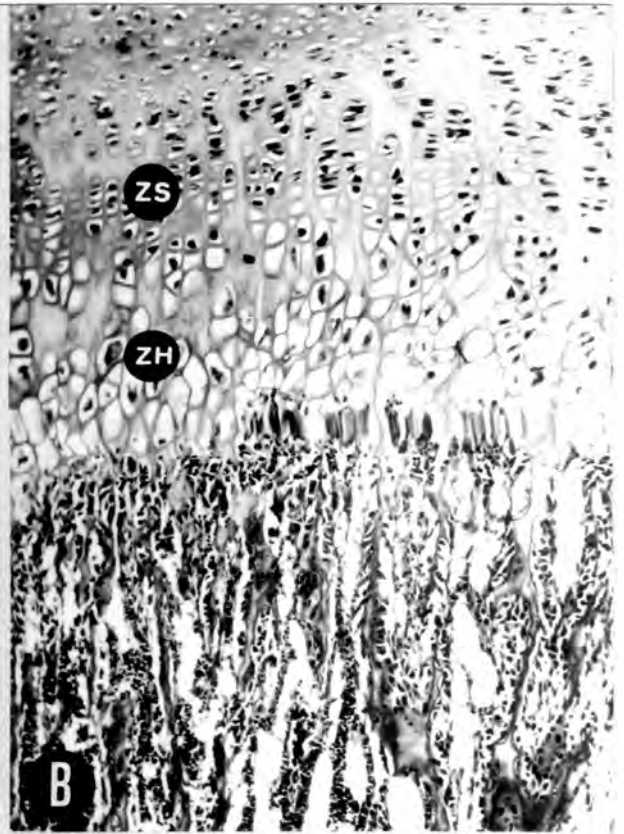
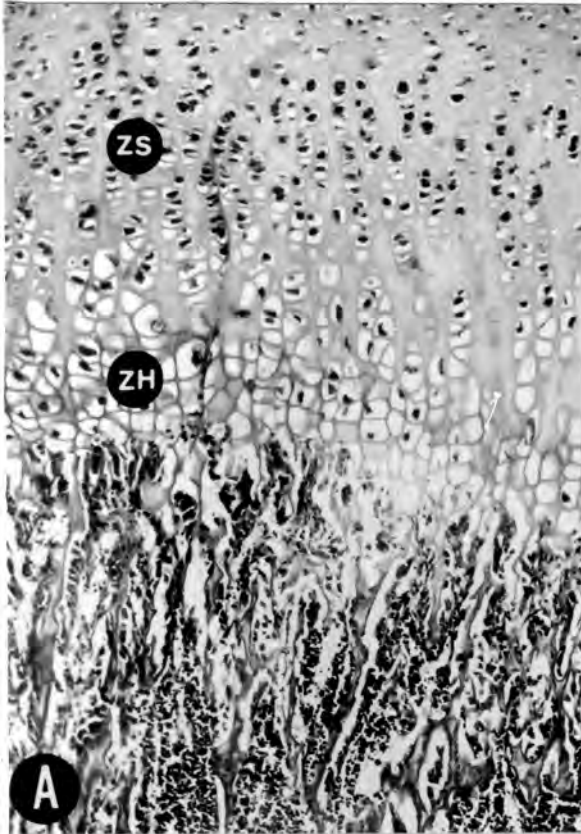


FIGURA 7 - Cortes da extremidade distal do fêmur de ratos com 16 dias de vida pós-natal, controle (A) e tratado (B); com 22 dias de vida pós-natal, controle (C) e tratado (D). Para o animal tratado, evidencia-se, na zona de cartilagem seriada do disco epifisário, uma melhor disposição das colunas de condrócitos e na zona hipertrófica, menor número de células com matriz intercelular aumentada. H.E. Aumento 200x.

ZS - zona de cartilagem seriada  
ZH - zona de cartilagem hipertrófica.





#### 3.2.4. Zona de Ossificação

Para o rato controle, o aspecto histológico da zona trabecular mostra nos primeiros 10 dias de vida pós-natal, do lado diafisário do disco epifisário, condroplasto destituídos de células; a substância fundamental envoltória aparece calcificada e, logo abaixo, encontram-se trabéculas ósseas de espessura variável dispostas longitudinalmente (Fig. 8A e C).

Após o 10º dia de vida pós-natal até o final da lactação, observa-se maior número de trabéculas, apresentando-se estas mais espessas e com a substância fundamental envolvendo osteócitos (Fig. 9A e C).

Para o rato tratado (Figs 8B e D; 9B e D), observam-se, desde as primeiras idades estudadas até o final da lactação, trabéculas ósseas em maior número e de maior espessura que as do rato controle (Figs 8A e C; 9A e C). Na região próxima à zona de cartilagem hipertrófica, observam-se condroplastos acelulares em menor quantidade, quando comparados aos do rato controle, sugerindo desta maneira, uma antecipação da ossificação.

FIGURA 8 - Cortes de metáfise distal do fêmur de ratos com 1 dia de vida pós-natal, controle (A) e tratado (B); com 7 dias de vida pós-natal, controle (C) e tratado (D). Evidenciam-se, para o animal tratado, trabéculas mais espessas e em maior número. H.E. Aumento 200x (A e B). Aumento 400x (C e D).

ZO - zona de ossificação

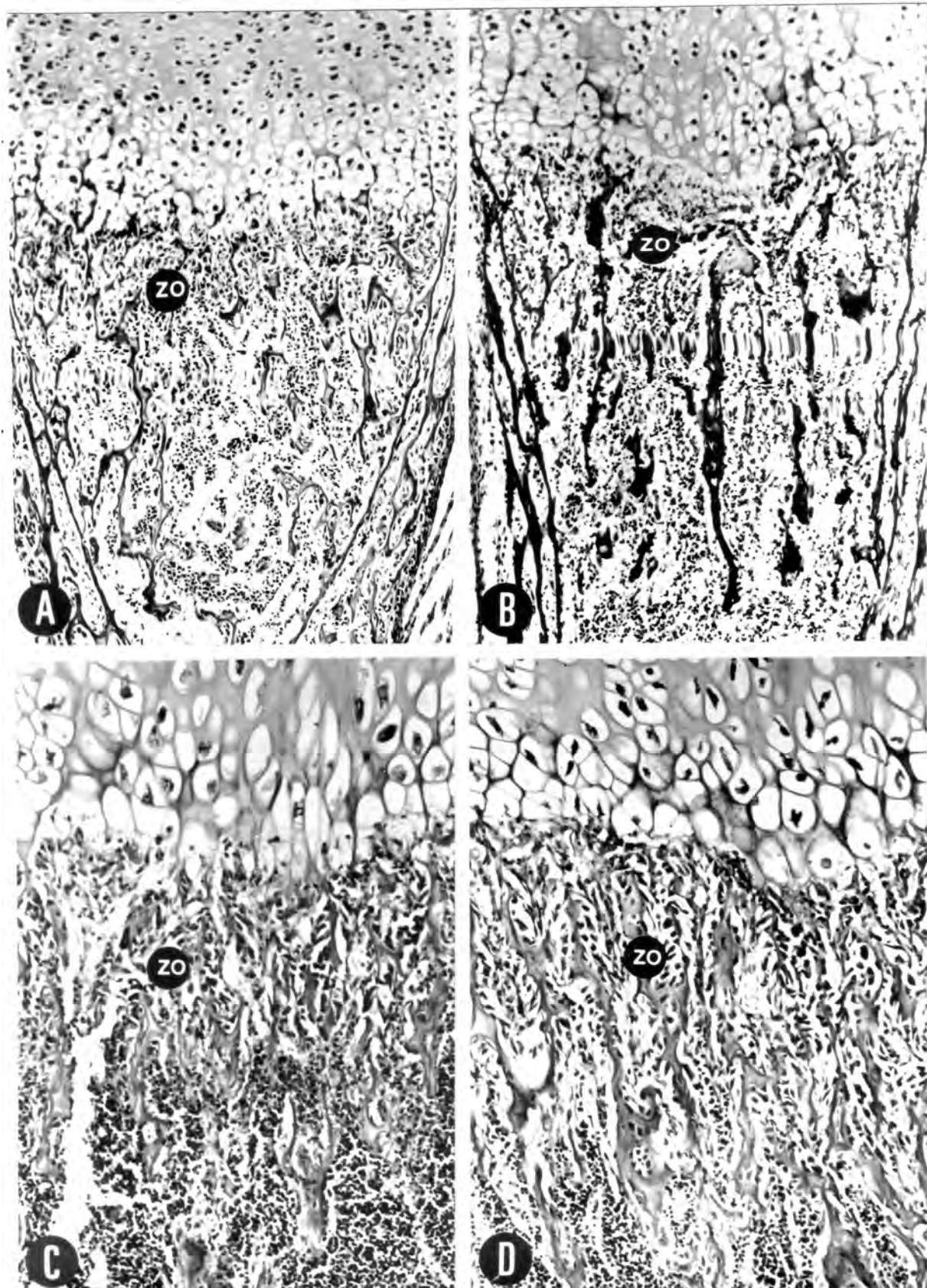
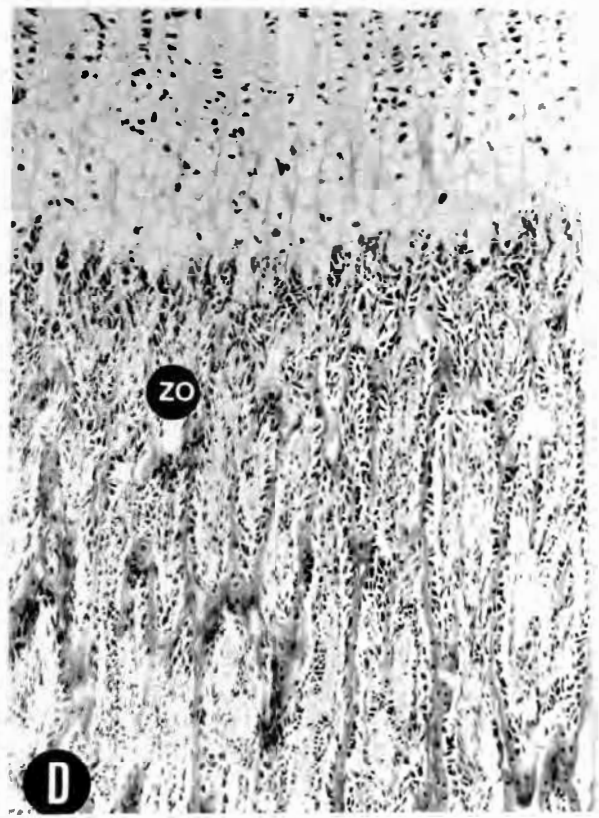


FIGURA 9 - Cortes da metáfise distal do fêmur de ratos com 13 dias de vida pós-natal, controle (A) e tratado (B); com 19 dias de vida pós-natal, controle (C) e tratado (D). Evidenciam-se, para o animal tratado, trabéculas mais espessas e em maior número. H.E. aumento 200x.

ZO - zona de ossificação



### 3.3. Resultados Morfométricos

Com o objetivo de quantificar alterações das áreas da célula e da matriz durante o período da lactação, os resultados morfométricos do presente trabalho baseiam-se:

- no estudo quantitativo das zonas de cartilagem em repouso, seriada e hipertrófica, e da zona de ossificação;
- no estudo da relação citoplasma-nuclear, para as zonas de cartilagem em repouso, seriada e hipertrófica.

#### 3.3.1. Zona de Cartilagem em Repouso

Na Tabela 2 estão expressos os valores médios correspondentes às áreas celulares e da matriz, após transformações angulares, da zona de cartilagem em repouso, do disco epifisário do fêmur, obtidos de 5 animais para cada idade e tratamento.

TABELA 2 - Médias dos valores angulares correspondentes às áreas celulares e da matriz da zona de cartilagem em repouso do fêmur dos ratos controle e tratado, para cada grupo etário.

ZONA DE CARTILAGEM EM REPOUSO				
Dias de vida pós-natal	CÉLULA		MATRIZ	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	32,65	40,05	57,35	49,37
4	31,37	37,82	58,63	52,18
7	30,33	37,35	59,67	52,65
10	33,09	39,00	56,91	51,00
13	32,58	40,11	57,42	49,89
16	35,30	38,12	54,70	51,88
19	35,30	38,94	54,70	51,06
22	35,43	38,23	54,57	51,77

As médias dos valores angulares correspondentes à área celular (núcleo + condroplasto) da zona de cartilagem em repouso dos ratos controle e tratado, para cada grupo etário, estão representadas graficamente na Figura 10. Esta figura revela que o animal tratado apresenta, em relação ao animal controle, um aumento da área celular em torno de 8,99%.

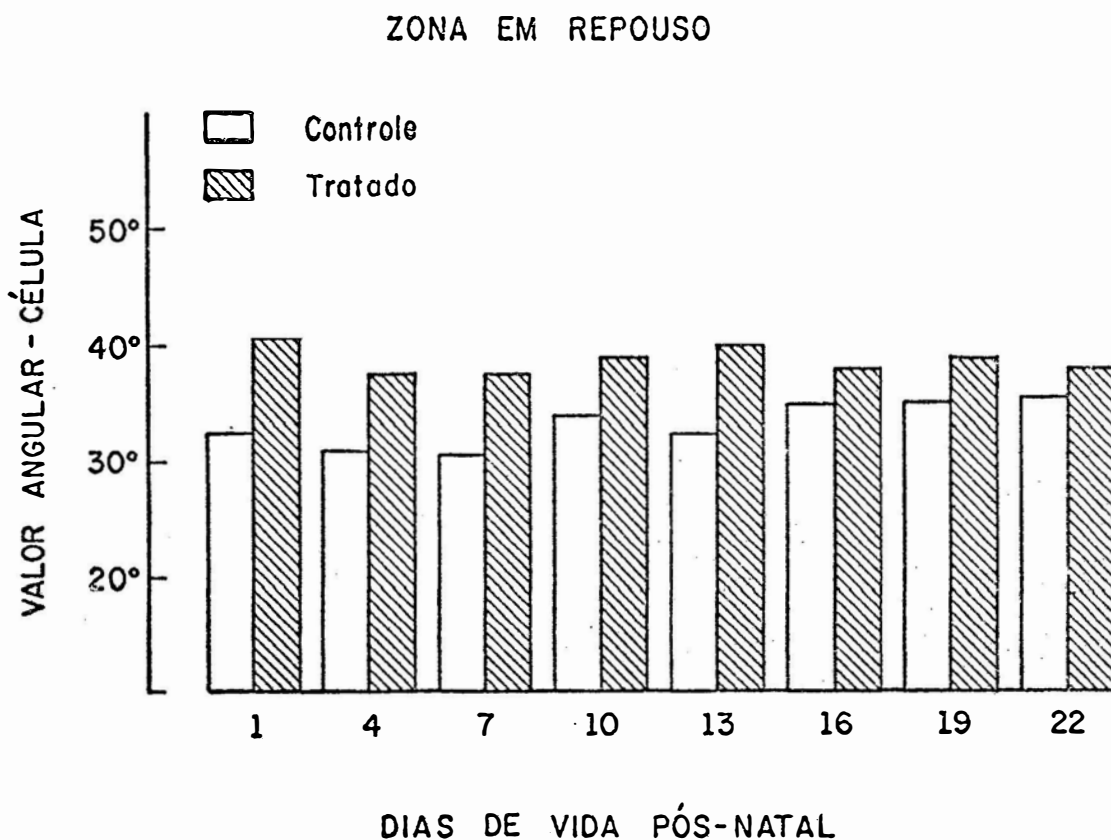


FIGURA 10 - Médias dos valores angulares correspondentes à área celular da zona de cartilagem em repouso do disco epifisário do fêmur dos ratos controle (□) e tratado (▨), para cada grupo etário.



As médias dos ângulos correspondentes à área de matriz cartilaginosa da zona em repouso dos ratos controle e tratado, de cada grupo etário, estão representados na Figura 11. O exame desta figura revela que durante todo o período da lactação ocorre uma diminuição (8,99%) da área da matriz da zona cartilaginosa em repouso do rato tratado, em relação à do rato controle.

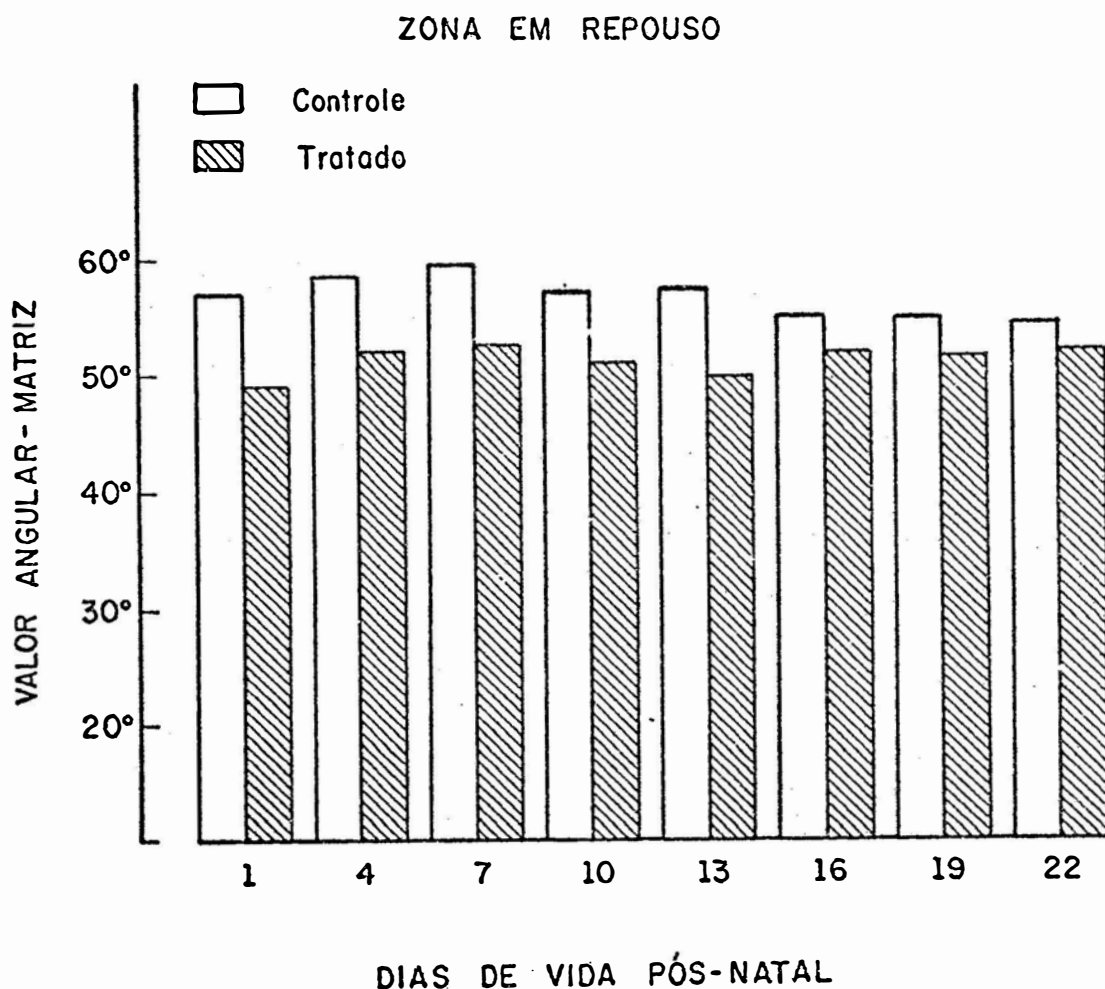


FIGURA 11 - Médias dos valores angulares correspondentes à área da matriz da zona de cartilagem em repouso do disco epifisário do fêmur dos ratos controle (□) e tratado (▨), para cada grupo etário.

A análise de variância (Tabela 3) mostra que existe diferença estatisticamente significativa entre os valores celulares da zona de cartilagem em repouso dos animais dos grupos tratado e controle; para a matriz cartilaginosa a análise de variância também revela que no animal tratado os valores desta são significativamente menores ( $P=0,01$ ) que no animal controle.

Do exposto, conclui-se que durante a lactação, para o animal tratado, esta vitamina provoca um aumento da área celular e uma diminuição da área da matriz cartilaginosa da zona de cartilagem em repouso em relação à do animal controle. Esses achados podem estar relacionados com a antecipação do desenvolvimento desta zona de cartilagem. Esse desenvolvimento precoce pode resultar na fixação do disco epifisário ao tecido ósseo do centro de ossificação secundário por esta zona de cartilagem.

TABELA 3 - Análise de variância dos valores angulares correspondentes às áreas da célula e da matriz da zona de cartilagem em repouso do fêmur dos animais controle e tratado. Valores de F.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valores de F
CÉLULA				
Entre grupos	118,65	1	118,650	50,084 *
Erro	33,16	14	2,369	
Total	151,81	15		
MATRIZ				
Entre grupos	121,83	1	121,830	48,713 *
Erro	35,02	14	2,501	
Total	156,85	15		

\* Significativo ao nível de 1%. Valor crítico de F ao nível de 1% = 8,86  
F 0,05 = 4,60

### 3.3.2. Zona de Cartilagem Seriada

Na Tabela 4 estão representados os valores médios das áreas das estruturas estudadas, obtidos, após transformação angular, de 5 animais para cada grupo etário da zona de cartilagem seriada do fêmur dos dois grupos experimentais.

TABELA 4 - Médias dos valores correspondentes às áreas celulares e da matriz da zona de cartilagem seriada do fêmur dos ratos controle e tratado, para cada grupo etário.

ZONA DE CARTILAGEM SERIADA				
Dias de vida pós-natal	CÉLULA		MATRIZ	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	39,17	45,40	50,83	44,60
4	37,11	43,74	52,89	46,26
7	36,93	40,86	53,07	49,08
10	38,76	43,91	51,18	46,09
13	40,57	43,17	49,43	46,83
16	37,47	41,78	52,53	48,22
19	41,55	45,29	48,45	44,71
22	39,64	43,28	50,36	46,72

O exame da Figura 12, que representa as médias dos valores angulares correspondentes à área celular da zona de cartilagem seriada dos ratos controle e tratado, para cada grupo etário, revela um aumento celular (7,82%) para o rato tratado, em relação ao rato controle.

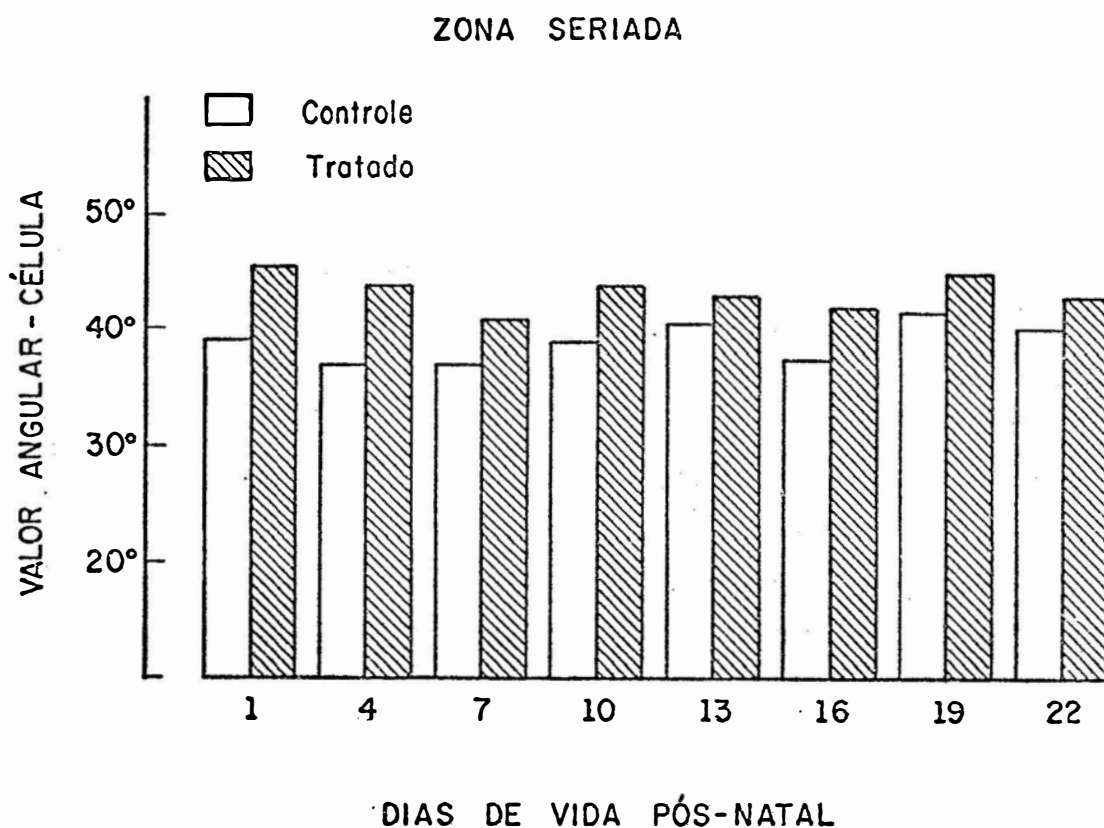


FIGURA 12 - Médias dos valores angulares correspondentes à área celular da zona de cartilagem seriada do disco epifisário do fêmur dos ratos controle (□) e tratado (▨), para cada grupo etário.

Na Figura 13 estão expressas as médias dos valores angulares correspondentes à área da matriz da zona de cartilagem seriada do disco epifisário do fêmur, obtidas de 5 animais para cada idade, em ambos os grupos estudados.

A projeção gráfica desta figura revela que durante todo o período da lactação, a vitamina A provocou uma diminuição da ordem de 7,82% da área da matriz da zona cartilaginosa seriada do animal tratado, em relação à do controle.

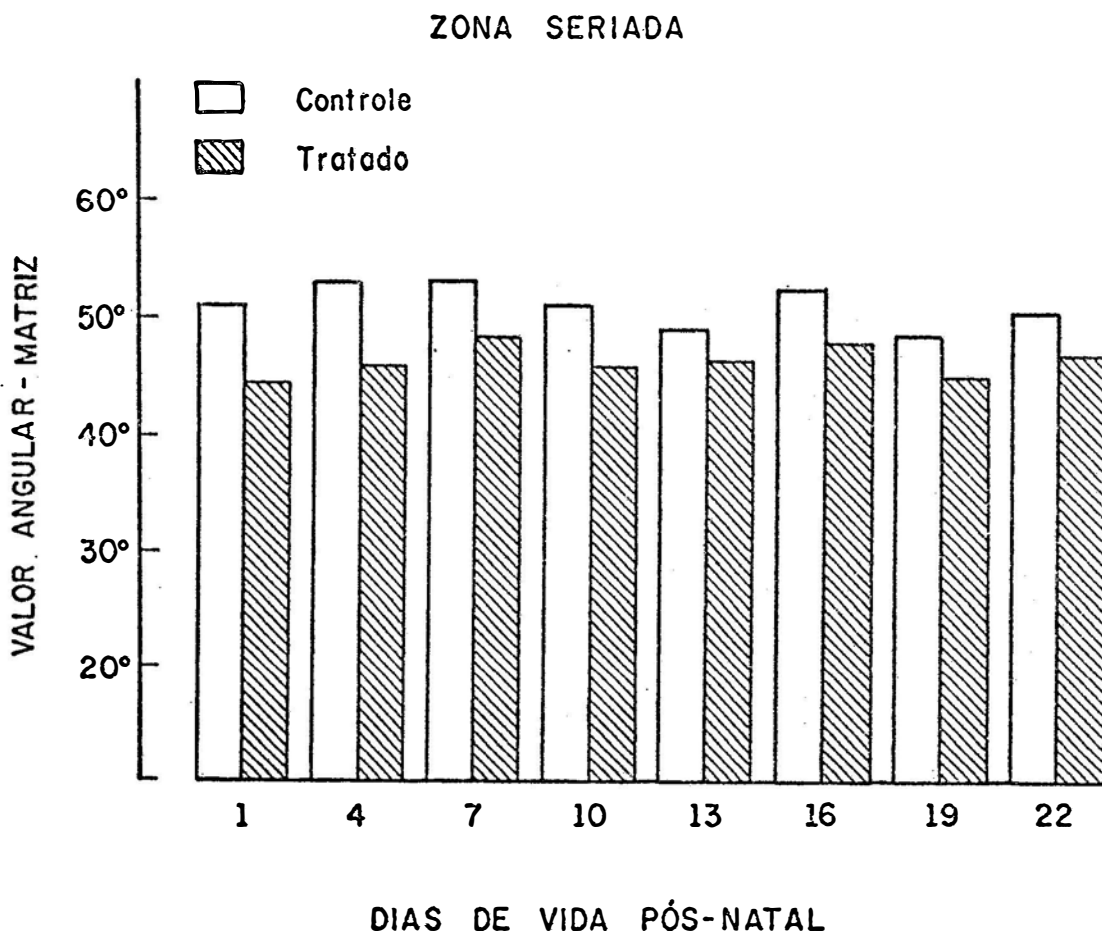


FIGURA 13 - Médias dos valores angulares correspondentes à área da matriz da zona de cartilagem seriada do disco epifisário do fêmur dos ratos controle (□) e tratado (▨), para cada grupo etário.

A análise de variância (Tabela 5) mostra que existe diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,01$ ) entre os valores celulares da zona seriada bem como entre os valores da matriz cartilaginosa ( $P = 0,01$ ), nos dois grupos experimentais.

Do exposto, conclui-se que a vitamina A parece provocar também na zona seriada um aumento da área celular (7,82%) e conseqüente diminuição da área da matriz cartilaginosa (7,82%). Com base nestes resultados, pode-se admitir a hipótese de que esse aumento celular da zona de cartilagem seriada estaria correlacionado com a intensa atividade de maturação e desintegração celular existente na zona de cartilagem hipertrófica.

TABELA 5 - Análise de variância dos valores angulares correspondentes às áreas da célula e da matriz da zona de cartilagem seriada do fêmur dos animais controle e tratado. Valores de F.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valores de F
CÉLULA				
Entre grupos	82,04	1	82,040	31,289 *
Erro	36,71	14	2,622	
Total	118,75	15		
MATRIZ				
Entre grupos	83,86	1	83,860	30,922 *
Erro	37,97	14	2,712	
Total	121,83	15		

\* Significativo ao nível de 1%. Valor crítico de F ao nível de 1% = 8,86  
F 0,05 = 4,60

### 3.3.3. Zona de Cartilagem Hipertrófica

Os valores médios correspondentes às áreas celular e da matriz da zona de cartilagem hipertrófica, após transformação angular, do disco epifisário do fêmur, de ambos os grupos estudados, obtidos de 5 animais para cada grupo etário estão expressos na Tabela 6.

TABELA 6 - Médias dos valores angulares correspondentes às áreas da célula e da matriz da zona de cartilagem hipertrófica do fêmur dos ratos controle e tratado, para cada grupo etário.

Dias de vida pós-natal	ZONA DE CARTILAGEM HIPERTRÓFICA			
	CÉLULA		MATRIZ	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	54,63	37,47	35,30	52,53
4	56,11	36,33	33,96	53,67
7	56,11	36,39	33,89	53,61
10	56,48	35,43	33,46	54,57
13	54,76	35,06	33,40	55,00
16	51,59	34,63	38,41	55,37
19	49,72	35,00	40,28	55,00
22	48,45	35,43	41,55	54,57

A Figura 14 mostra a projeção gráfica dos valores angulares médios correspondentes à área celular da zona da cartilagem hipertrófica, do disco epifisário do fêmur. O exame desta figura e da tabela 6 revela que os valores celulares para o rato tratado encontram-se em nível bem mais baixo em relação aos do controle. Isto significa que durante todo o período de lactação o aumento da área celular para o rato tratado é menor que o do rato controle.

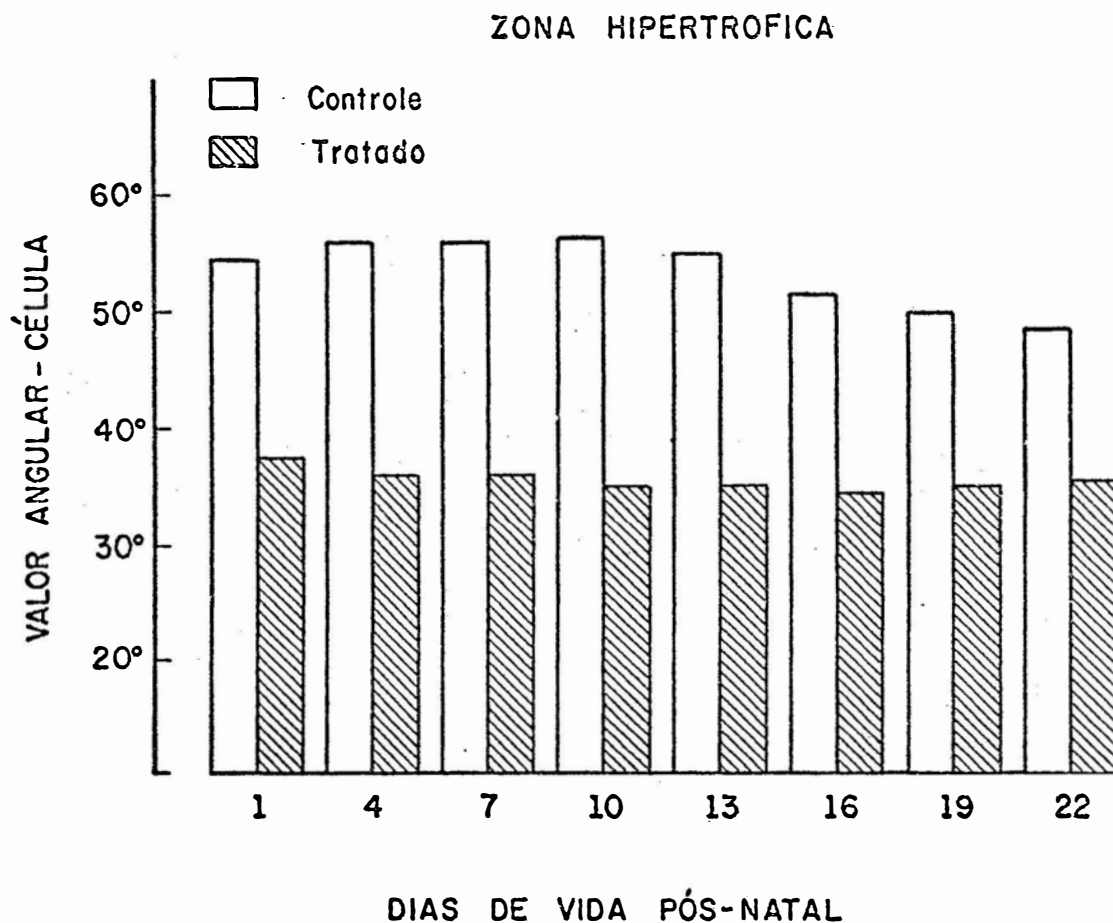


FIGURA 14 - Médias dos valores angulares correspondentes à área celular da zona de cartilagem hipertrófica do disco epifisário do fêmur dos ratos controle (□) e tratado (▨), para cada grupo etário.



A Figura 15 mostra a projeção gráfica das médias dos valores angulares correspondentes à área da matriz da zona de cartilagem hipertrófica do fêmur, obtidas para os dois grupos estudados e para cada idade.

Da análise desta figura, pode-se observar que durante todo o período da lactação a vitamina A provocou um aumento da área da matriz da zona cartilaginosa hipertrófica para o rato tratado em torno de 30,41%, quando comparado ao do controle.

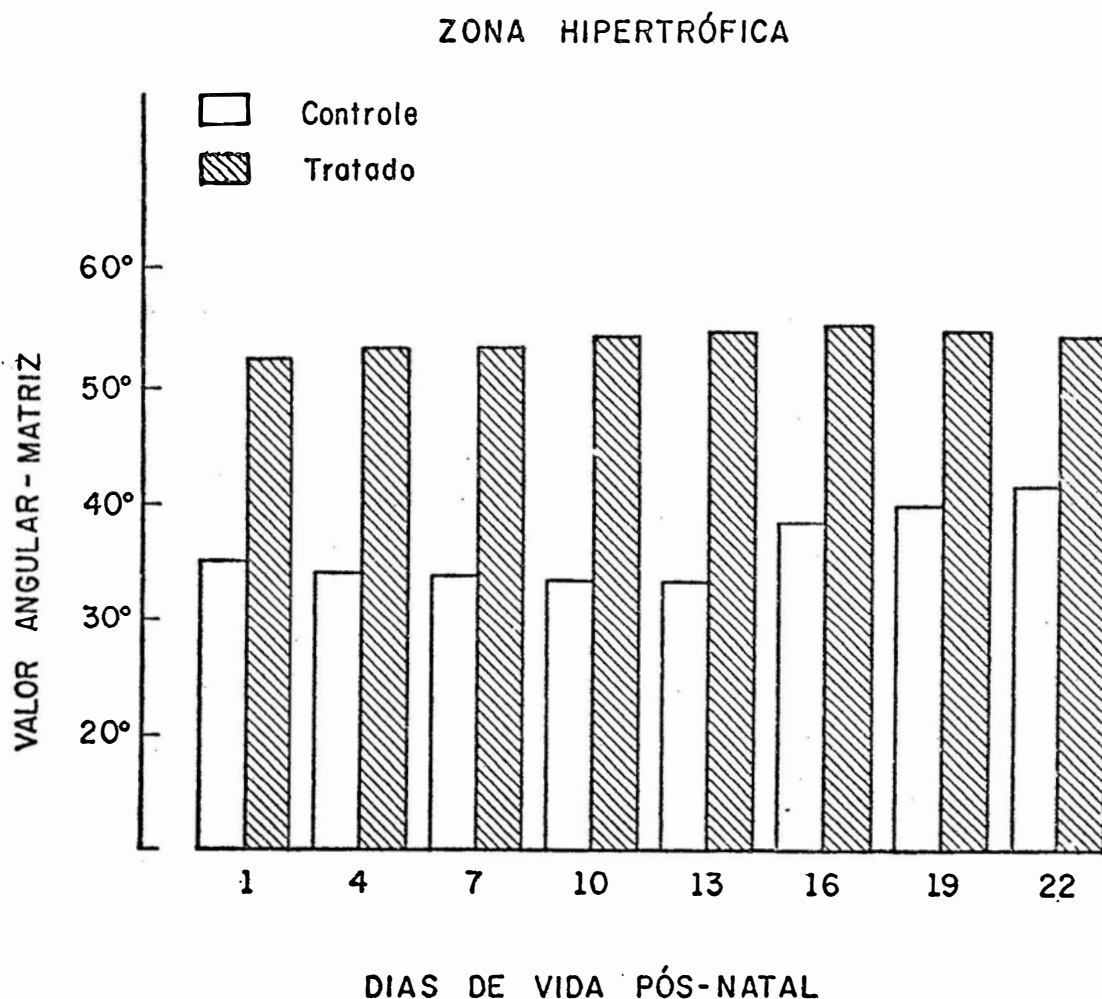


FIGURA 15 - Média dos valores angulares correspondentes à área da matriz da zona de cartilagem hipertrófica do disco epifisário do fêmur dos ratos controle (□) e tratado (▨), para cada grupo etário.

A análise de variância dos valores celular e da matriz (Tabela 7), da zona de cartilagem hipertrófica, revela que os valores da célula no animal controle, são significativamente maiores ( $P=0,01$ ) que no animal tratado; para a matriz, a análise de variância mostra diferenças estatisticamente significativas ( $P=0,01$ ) para os animais tratados, em relação aos controles.

Conclui-se, portanto, que na zona de cartilagem hipertrófica, o inverso ocorre em relação às zonas de cartilagem em repouso e seriada. Nesta zona hipertrófica observou-se que a vitamina A provocou uma diminuição da área celular acentuada, antecipando a hipertrofia dos condrócitos e um aumento significativo da área da matriz cartilaginosa promovido pela calcificação da substância fundamental envoltora.

TABELA 7 - Análise de variância dos valores angulares correspondentes às áreas da célula e da matriz da zona de cartilagem hipertrófica dos animais controle e tratado. Valores de F.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valores de F
CÉLULA				
Entre grupos	1262,20	1	1262,200	235,62 *
Erro	75,00	14	5,357	
Total	1337,20	15		
MATRIZ				
Entre grupos	1297,25	1	1297,250	219,09 *
Erro	82,89	14	5,921	
Total	1380,14	15		

\* Significativo ao nível de 1%. Valor crítico de F ao nível de

1% = 8,86

F 0,05 = 4,60

3.3.4. Zona de Ossificação

A Tabela 8 mostra os valores correspondentes à área das trabéculas, após transformação angular, do disco epifisário do fêmur, para cada grupo etário e em ambos os animais estudados.

TABELA 8 - Médias dos valores angulares correspondentes à área das trabéculas do lado diafisário do disco epifisário do fêmur dos ratos controle e tratado, para cada grupo etário.

T R A B É C U L A S		
Dias de vida pós-natal	Controle	Tratado
1	26,06	40,69
4	28,32	42,07
7	30,59	41,96
10	32,20	43,22
13	32,20	44,20
16	32,33	42,36
19	33,27	43,97
22	34,20	45,52

A projeção gráfica das médias dos valores angulares correspondentes à área das trabéculas do fêmur dos ratos controle e tratado é apresentada na Figura 16. O exame desta figura revela que durante todo o período da lactação, os valores trabeculares situam-se em nível superior para o rato tratado, em relação ao controle.

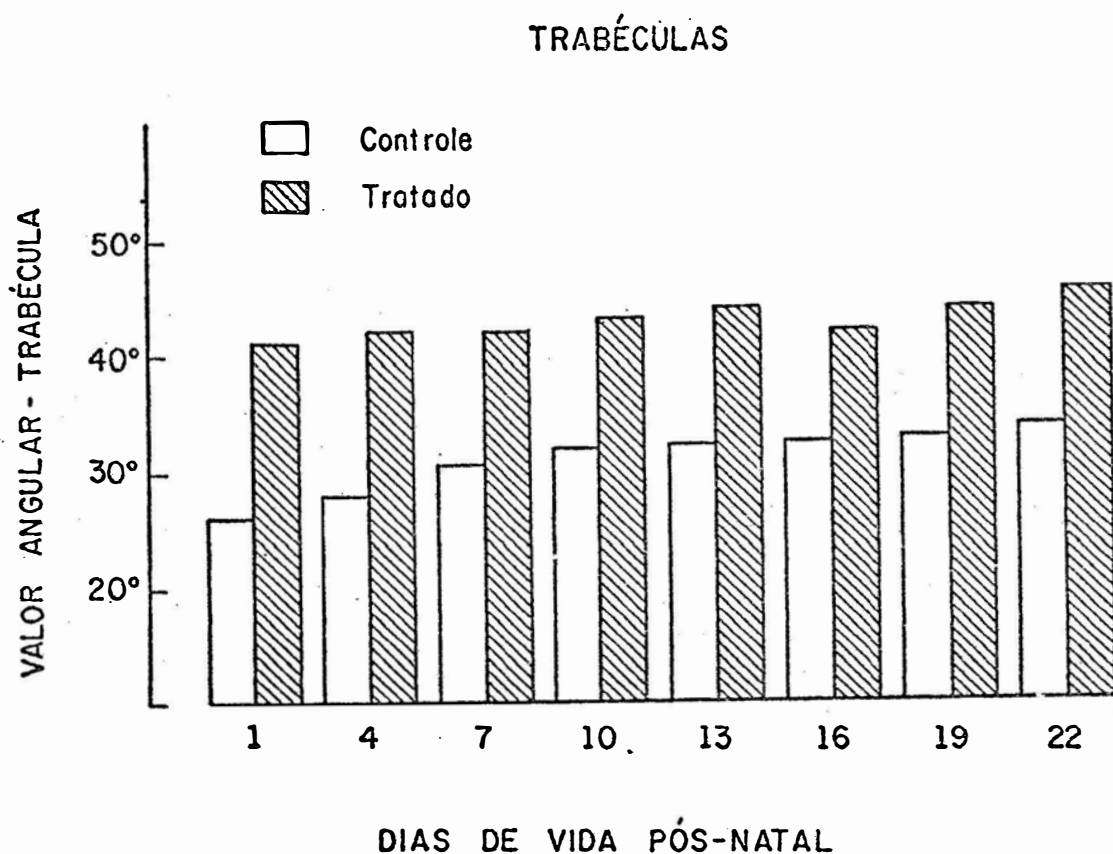


FIGURA 16 - Médias dos valores angulares correspondentes à área trabecular do lado diafisário do disco epifisário do fêmur dos ratos controle (□) e tratado (▨), para cada etário.

A análise de variância, mostrando que a diferença entre os valores das trabéculas do fêmur dos dois grupos estudados é estatisticamente significativa ( $P=0,01$ ), pode ser vista na Tabela 9.

Da análise da Figura 16 e da Tabela 9 conclui-se que a vitamina A provocou um aumento na área e na espessura das trabéculas do fêmur do animal tratado, quando comparadas às do controle. Esses resultados revelam ainda que a aceleração na calcificação da matriz cartilaginosa, pela vitamina A, foi seguida de uma aceleração no processo de ossificação.

TABELA 9 - Análise de variância dos ângulos correspondentes à área trabecular da diáfise do fêmur dos animais controle e tratado. Valores de F.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valores de F
TRABÉCULAS				
Entre grupos	561,93	1	561,930	115,528*
Erro	68,10	14	4,864	
Total	630,03	15		

\* Significativo ao nível de 1%. Valor crítico de F ao nível de  
 $1\% = 8,86$   
 $F_{0,05} = 4,60$

### 3.3.5. Relação Citoplasma-Nuclear

Os valores logarítmicos da relação citoplasma-nuclear das zonas de cartilagem em repouso, seriada e hipertrófica, obtidas de cada grupo etário e para ambos os grupos estudados são apresentados na Tabela 10.

TABELA 10 - Valores logarítmicos médios da relação citoplasma-nuclear das zonas de cartilagem em repouso, seriada e hipertrófica do disco epifisário do fêmur, de cada grupo etário dos animais controle e tratado.

RELAÇÃO CITOPLASMA-NUCLEAR						
Dias de vida pós-natal	Zona em Repouso		Zona Seriada		Zona Hipertrófica	
	Contr.	Trat.	Contr.	Trat.	Contr.	Trat.
1	1,33	1,33	1,47	1,25	1,49	1,41
4	1,22	1,23	1,40	1,29	1,66	1,60
7	1,17	1,34	1,29	1,33	1,60	1,53
10	1,34	1,37	1,27	1,40	1,74	1,63
13	1,41	1,27	1,27	1,30	1,81	1,47
16	1,31	1,08	1,21	0,98	1,69	1,25
19	1,23	0,98	1,37	0,75	1,61	1,28
22	1,21	1,04	1,20	0,57	1,48	1,20

A Figura 17 mostra a representação gráfica dos valores da relação citoplasma-nuclear para a zona de cartilagem em repouso do fêmur, em função dos dias de vida pós-natal, dos animais controle e tratado.

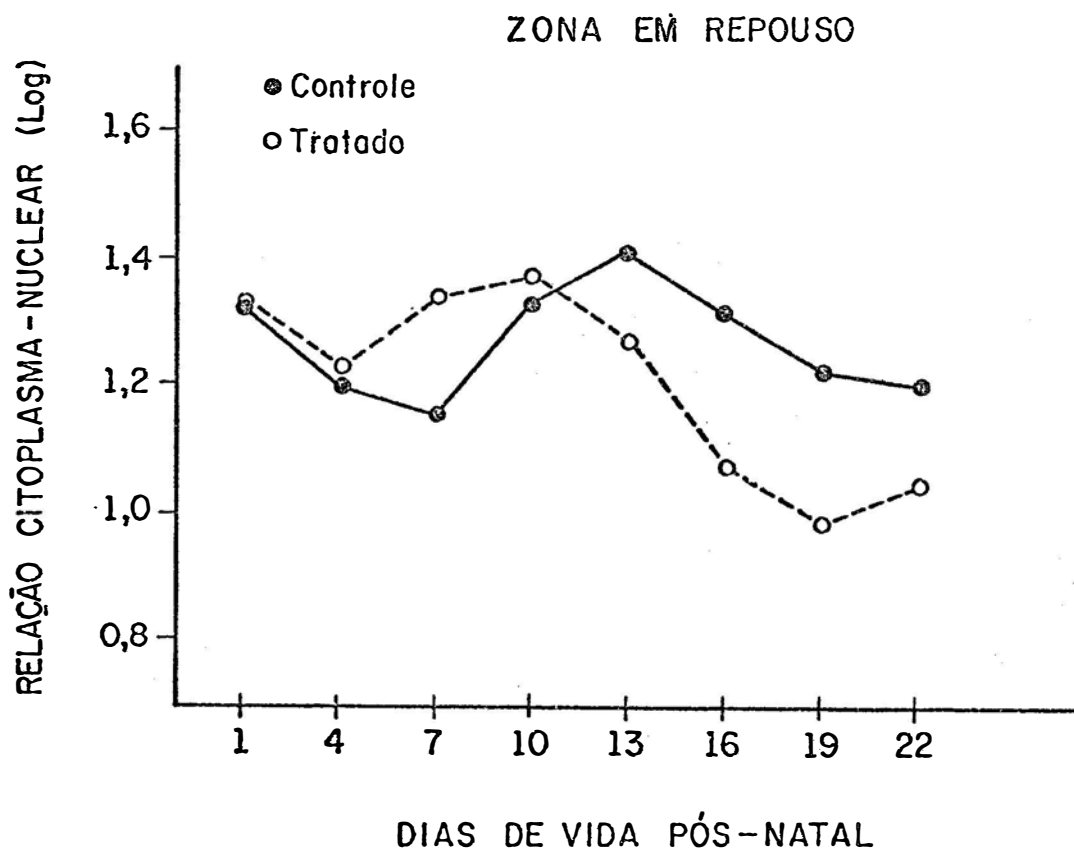


FIGURA 17 - Projeção logarítmica das médias dos valores da relação citoplasma-nuclear da zona de cartilagem em repouso do fêmur do rato controle (●) e do rato tratado (○), obtidas em cada grupo etário.

A relação citoplasma-nuclear da zona cartilaginosa em repouso do disco epifisário do fêmur mostra que, a partir do 4º dia de vida pós-natal para o animal tratado, e do 7º dia de vida pós-natal para o controle, o valor desta relação aumenta lenta e progressivamente até os animais atingirem o 10º e o 13º dias de vida pós-natal para os ratos tratado e controle, respectivamente (Figura 17). Desde então, o valor desta relação decresce em ambos os grupos até o final do período estudado (Tabela 10). A representação gráfica mostra, portanto, que esta zona cartilaginosa exibe um comportamento diferente no 10º e no 13º dias de vida pós-natal conforme o animal estudado.

Para o tratado, o aumento do valor da relação citoplasma-nuclear se faz em ritmo acelerado até o 10º dia de vida pós-natal (e o 13º dia para o controle) para, em seguida, decrescer em nível menos elevado ao do rato controle. Esses achados sugerem que a zona de cartilagem em repouso do animal tratado, até o 10º dia de vida pós-natal, talvez esteja relacionada com o tecido ósseo que vai se formar no centro da epífise; para o animal controle se fazem necessários 13 dias de vida para que esta zona de cartilagem possa fixar o disco epifisário no centro de ossificação.

Há, portanto, indícios de que a zona de cartilagem em repouso do rato tratado, esteja sofrendo uma antecipação da hiperplasia dos condrócitos e talvez do processo de multiplicação celular (10º dia) em relação à do rato controle (13º



dia), após o que, ocorre uma diminuição celular para ambos os animais até o final do período estudado.

Para a zona de cartilagem seriada, a relação citoplasma-nuclear do disco epifisário do fêmur dos animais controle e tratado está representada graficamente na Figura 18.

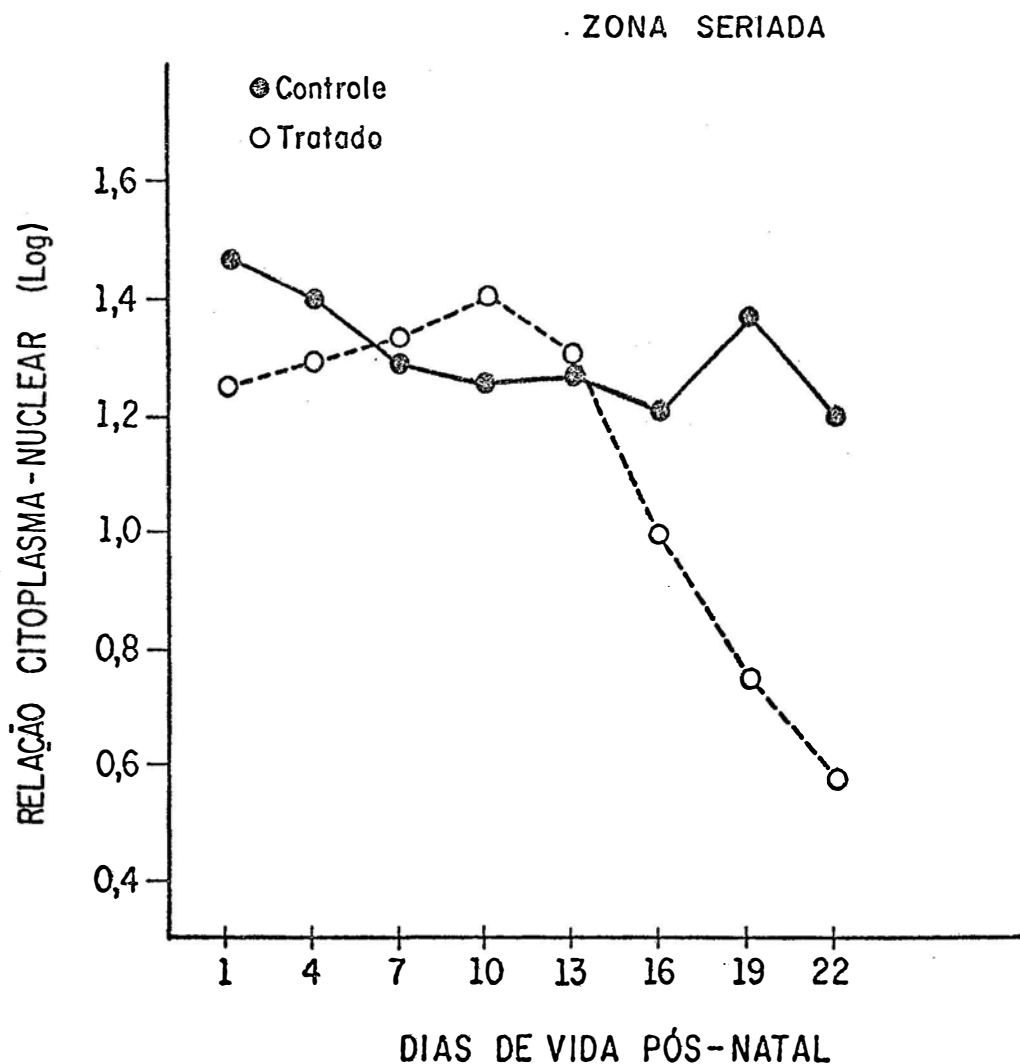


FIGURA 18 - Projeção logarítmica das médias dos valores da relação citoplasma-nuclear da zona de cartilagem seriada do fêmur do rato controle (●) e do rato tratado (○), obtidas em cada grupo etário.

A relação citoplasma-nuclear da zona cartilaginosa seriada do fêmur mostra um comportamento diferente entre os dois grupos experimentais, nos primeiros dias de vida pós-natal (Figura 18).

Para o rato tratado, o valor desta relação aumenta lenta e progressivamente até o 10º dia, para em seguida decrescer até o 22º dia de vida pós-natal.

Para o rato controle, o valor desta relação decresce até o animal atingir o 10º dia de vida pós-natal. A partir de então, o valor apresenta um certo grau de estabilidade até o final do período estudado (Figura 18), havendo somente um ponto (em torno do 19º dia de vida pós-natal) que não se coloca dentro desta área de estabilidade.

Há, portanto, na zona de cartilagem seriada, para o rato tratado, indícios de que os valores da relação citoplasma-nuclear exibem um comportamento diferente do controle durante todo o período da lactação.

Assim é que, até o 10º dia de vida pós-natal, a zona de cartilagem seriada para o rato tratado exhibe um aumento celular acentuado em relação ao do controle, para em seguida, diminuir; para o rato controle esse processo de diferenciação celular se mantém.

A representação gráfica da relação citoplasma-nuclear da zona de cartilagem hipertrófica do fêmur, para ambos os grupos estudados, é apresentada na Figura 19.

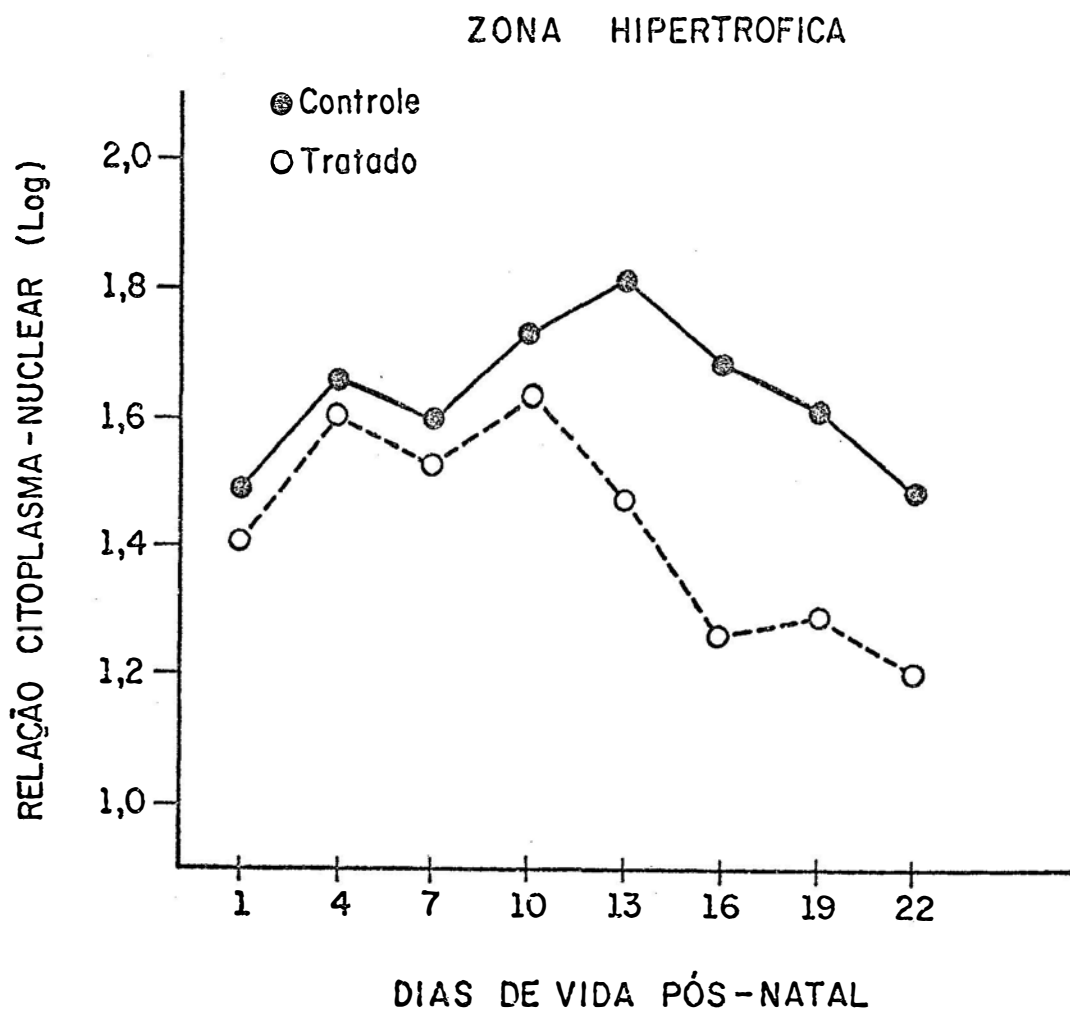


FIGURA 19 - Projeção logarítmica das médias dos valores da relação citoplasma-nuclear da zona de cartilagem hipertrófica do fêmur do rato controle (●) e do rato tratado (○), obtidos em cada grupo etário.

A Figura 19 mostra que os valores da relação citoplasma-nuclear da zona cartilaginosa hipertrófica do fêmur, para os dois grupos estudados, aumentam do 1º ao 10º dia para o rato tratado e para o controle, até o animal atingir o 13º dia de vida pós-natal. A partir desse período, os valores dessas relações decrescem em ambos os animais até o final da lactação (Tabela 10).

Para o animal tratado, o aumento do valor da relação citoplasma-nuclear se faz em ritmo acelerado desde o 1º dia de vida (principalmente do 1º ao 4º dia) até o 10º dia, e, para o controle, este período se prolonga até o 13º dia de vida pós-natal, após o que o valor dessa relação para o rato tratado decresce em nível menos elevado que o do rato controle.

Existem, portanto, indícios (Figura 19) de que esta zona de cartilagem hipertrófica, para o animal tratado, representa uma antecipação do processo de calcificação da matriz cartilaginosa (10º dia de vida pós-natal), em relação ao animal controle (13º dia de vida pós-natal).

#### 4. DISCUSSÃO

Foram observados histologicamente, no animal tratado, as seguintes alterações nas zonas de cartilagem em repouso e seriada: células mais numerosas e matriz menos abundante, quando comparadas às do animal controle. O centro de ossificação epifisário apareceu precocemente (10º dia), quando comparado ao do controle (13º dia). Já na zona de cartilagem hipertrófica do animal tratado, observou-se, durante todo o período experimental, um número menor de células e matriz mais abundante, quando comparada à do animal controle.

O aparecimento precoce do centro de ossificação epifisário no rato tratado, como também a presença de um número maior de células nas zonas de cartilagem em repouso e seriada, de um número menor de células e matriz mais abundan

te na zona de cartilagem hipertrófica, sugeriu condrogênese e erosão cartilaginosa mais aceleradas.

Tal fato foi evidenciado quando se comparou o comprimento dos fêmures dos animais de ambos os grupos estudados. O rato tratado mostrou, até o 10º dia de lactação, fêmures de maior comprimento (Tabela 1).

Ainda mais, os resultados morfométricos confirmaram essa possibilidade, pois os achados obtidos com o emprego da técnica de CHALKLEY (1943) modificada revelaram que a vitamina A provocou nas zonas de cartilagem em repouso (Tabela 3, Figuras 10 e 11) e seriada do fêmur (Tabela 5 e Figuras 12 e 13) do animal tratado, um aumento da área celular e uma diminuição da área da matriz e, na zona cartilaginosa hipertrófica uma diminuição da área celular e um aumento da área da matriz (Tabela 7, Figuras 14 e 15).

A análise histológica da zona de ossificação mostrou, para o rato tratado, trabéculas ósseas mais espessas e em maior número, condroplastos acelulares em maior quantidade perto da zona de cartilagem hipertrófica, além de antecipação da ossificação, em relação ao animal controle. Tal quadro histológico indicou que a ossificação trabecular se apresentou aumentada no animal tratado e que houve uma transformação óssea acelerada.

Essa possibilidade foi confirmada quando se empregou a técnica de CHALKLEY (1943) modificada, que revelou (Tabela 9, Figura 16) a ação da vitamina A provocando, na zona

de ossificação do fêmur do rato tratado, um aumento da área trabecular, se comparada à do seu controle.

Quando se aplicou a relação citoplasma-nuclear para as zonas de cartilagem em repouso, seriada e hipertrófica verificou-se, no animal tratado, um aumento do valor desta relação em ritmo acelerado até o 10º dia de vida pós-natal (antecipadamente em relação ao controle) para, em seguida, decrescerem, tratado e controle, até o final da lactação.

Vários autores já observaram, em outros órgãos e em diferentes condições fisiológicas, que o 10º dia de vida pós-natal representa a "época de crise" do desenvolvimento do rato. (IUCIF, 1965; IUCIF, LOPES & AZOUBEL, 1974; LOPES, VALERI, AZOUBEL, IUCIF & CAMPOS, 1974; LOPES, VALERI, IUCIF, AZOUBEL & CAMPOS, 1975; SOUZA, AZOUBEL, IUCIF & LOPES, 1975).

Conclui-se do exposto que os fenômenos de condrogênese e erosão cartilaginosa acelerada, além de ossificação trabecular aumentada e transformação óssea acelerada, indicam uma ossificação endocondral mais rápida nos fêmures dos ratos tratados.

O modo de ação da vitamina A na aceleração ou retardo dos processos condrogenéticos e osteogenéticos é muito complexo. Entretanto, há a possibilidade de se levar em consideração três mecanismos:

1. Já em 1944, MELLANBY chamava a atenção para o fato de altas doses de vitamina A atuarem diretamente na atividade dos osteoblastos e osteoclastos. Essa ação direta exer

cida pela vitamina A no osso também foi observada por WOLBACH em 1947 e por IRVING em 1949.

Estudos *in vitro* (FELL & MELLANBY, 1952) e *in situ* (BARNICOT, 1950) sugerem também que, administrada em altas doses, atua diretamente nos tecidos osteogênicos, uma vez que quando se adicionava vitamina A no meio de cultura ou diretamente no osso, havia dissolução do material intercelular do rudimento ósseo ou do próprio osso.

Somente em 1961, DINGLE e, mais tarde, FELL & DINGLE (1963) verificaram a causa da dissolução dos rudimentos de osso e cartilagem cultivados em meio de cultura contendo vitamina A. Tais fenômenos estavam relacionados com as enzimas lisossômicas, pois a vitamina A ativaria os lisossomos dos condrócitos, por modificação na permeabilidade da membrana, os quais liberariam hidrolases, inclusive catepsina; haveria, portanto, digestão das proteínas do complexo glicoprotéico da matriz com subsequente desintegração. É possível que o mecanismo seja responsável também pela degradação da matriz óssea, uma vez que se sabe ser o osteoblasto rico em lisossomos (FELL, 1965). Finalmente, DINGLE, FELL & LUCY (1966) verificaram que a vitamina A estava relacionada com as alterações observadas nos sulfatos de condroitina.

As alterações na estabilidade dos lisossomos frente à hipervitaminose A ocorrem não só *in vitro*, mas também *in vivo* (DINGLE, SHARMANN & MOORE, 1963; WEISSMANN, UHR & THOMAS, 1963).



Embora esse mecanismo lisossômico, sob a ação direta da vitamina A, seja perfeitamente possível no feto, uma vez que GIROUD, GOUNELLE & MARTINET (1957) observaram níveis elevados de vitamina A nos fetos cujas mães receberam a vitamina durante a gestação, além de VAES (1964) ter observado a presença de enzimas lisossômicas em ossos fetais e FELL (1965) verificado que as mesmas poderiam ser liberadas em meio de cultura contendo a vitamina A, tal fato não pode ser relacionado neste material, uma vez que não houve degradação e sim aceleração da atividade condrogênica e osteogênica. Possivelmente isto seja devido à pequena quantidade de vitamina A presente nos ossos fetais dos animais estudados nesta pesquisa.

2. Os aspectos distintos de aceleração e desaceleração de certos processos de crescimento envolvidos na ossificação endocondral parecem estar integrados com mecanismos hormonais.

Ficou bem estabelecido que a vitamina A afeta a estabilidade estrutural dos lisossomos (DINGLE, 1961; FELL & DINGLE, 1963; ROELS, ANDERSON, LUI, SHAH & TROUT, 1969) e que os corticosteróides, por outro lado, protegem os lisossomos da desintegração (FELL & THOMAS, 1961; WEISSMANN & DINGLE, 1961; De DUVE, WATTIAUX, WIBO, 1961; WEISSMANN & THOMAS, 1963; De DUVE & WATTIAUX, 1966). Também é fato estabelecido que a vitamina A provoca hipertrofia do córtex adrenal e que essa ação é mediada via hipófise, devido ao aumento do ACTH cir-

culante (NATANSON, MITASHOVA & CHUVAEV, 1966).

Baseados em todos esses fatos, RAM & MISRA (1975) admitem que, nos casos de estimulação máxima da adrenal pelo excesso de vitamina A, a síntese e a liberação dos corticosteróides também deveriam ser máximas, vindo assim a proteger os lisossomos dos efeitos labilizantes 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 ruptura da cadeia lateral do colesterol, influenciando conseqüentemente a gênese dos esteróides. Quando essa hiperatividade da adrenal não for proporcional às quantidades elevadas de vitamina A, haverá diminuição na síntese e na liberação de adrenocorticóides, e isto resultará em desintegração dos lisossomos, desencadeando todas as alterações descritas para a ação direta da vitamina nos tecidos ósseo e cartilaginoso.

Em experimentos bem controlados, BAUMANN & MOORE (1939) em ratos tireoidectomizados; SELYE (1957); WOLBACH & MADDOCK (1952) em ratos hipofisectomizados e tratados com vitamina A e WOLBACH, MADDOCK & COHEN (1955) em ratos adrenalectomizados tratados com vitamina A, cortisona ou uma associação destas, verificaram que as alterações esqueléticas induzidas pelo excesso de vitamina A resultava de uma ação direta da vitamina nos tecidos osteogênico e da adrenal.

Tendo em vista os resultados de BAUMANN & MOORE (1939); SELYE (1957); WOLBACH & MADDOCK (1952); WOLBACH, MADDOCK & COHEN (1955); acredita-se que, no material utilizado neste trabalho, a vitamina A tenha atuado diretamente nos tecidos cartilaginoso e ósseo da epífise do fêmur, provocando uma ossificação endocondral acelerada.

3. Outro mecanismo que se deve levar em conta e que vitamina A influencia diretamente o metabolismo dos sulfatos e das hexosaminas, na síntese dos açúcares aminados, pelo menos em cultura de rudimentos ósseos de embrião de galinha (DINGLE, FELL & LUCY, 1966).

Embora os três mecanismos, que explicam o modo de ação da vitamina nos tecidos calcificados, sejam largamente aceitos, não se tem elementos para ajuizar que os resultados obtidos neste trabalho possam ser ou não correlacionados com esses fatores. Em vista da dose de vitamina administrada ter sido pequena, é possível que ela tenha sido insuficiente para atuar significativamente no córtex adrenal, provocando a sua hipertrofia e hiperfunção, não havendo então a ação dos adrenocorticóides nos tecidos calcificados dos animais estudados. Assim, sugeriu-se a possibilidade de que a administração de uma única dose de 30 000 UI de vitamina A na rata, no 10º dia de gestação, atua na epífise do fêmur do recém-nascido e por todo o período de lactação, diretamente sobre os tecidos cartilaginoso e ósseo, provocando uma ossificação endocondral acelerada.

## 5. SUMÁRIO E CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivos a caracterização das alterações causadas pela vitamina A no comprimento e no disco epifisário do fêmur de ratos, durante a lactação, cujas mães receberam uma única dose de vitamina A, no 10º dia de gravidez.

Para tanto, foram utilizadas ratas adultas das quais 10 receberam uma única dose de vitamina A, intraperitonealmente, de 0,20 ml de AROVIT contendo 30.000 UI de palmitato de vitamina A no 10º dia de gravidez; as 10 restantes nas mesmas condições das precedentes, receberam uma única injeção de 0,20 ml de NaCl a 0,85%, servindo como controles.

Oitenta ratos recém-nascidos de mães que receberam vitamina A foram denominados "tratados" e os outros 80 ratos recém-nascidos de mães que receberam solução salina constituíram o grupo controle. Esses animais foram sacrificados em número de 10 para cada idade, isto é, nos 1º, 4º, 7º, 10º, 13º, 16º, 19º e 22º dias de vida pós-natal e pesados nos dias de sacrifício; após a fixação, os fêmures, em número de 5 tra-

tados e 5 controles para cada idade, foram retirados, dissecados, pesados em balança de torção e medidos com paquímetro com precisão de 0,1 mm.

Após a inclusão em parafina, os cortes seriados de 7 micrômetros de espessura foram corados pelo hemalúmen e eosina e tricrômico de Masson.

Os achados morfológicos revelaram:

1. O peso corporal e o peso do fêmur dos animais tratados apresentaram-se semelhantes aos dos animais controles, e para ambos os grupos observou-se uma mudança brusca dos pesos corporal e do fêmur ao redor do 10º dia de vida pós-natal. O comprimento do fêmur dos animais tratados apresentou-se aumentado até o 10º dia de vida pós-natal, após o que assemelhou-se aos dos animais controles.

2. Os achados histológicos mostraram:

- a) para a zona de cartilagem em repouso:

células maiores e mais numerosas; matriz menos abundante para o rato tratado em relação ao controle, e o aparecimento antecipado do centro de ossificação epifisário para o animal tratado (10º dia), quando comparado ao animal controle (13º dia).

b) Para a zona de cartilagem seriada:

- nos 10 primeiros dias de vida pós-natal, maior número de células, matriz menos abundante e melhor disposição das colunas celulares, para o animal tratado em relação ao controle.
- após o 10º dia, o aspecto histológico da zona de cartilagem seriada do animal tratado assemelhou-se ao do animal controle.

c) Para a zona de cartilagem hipertrófica:

- durante todo o período experimental, células em menor número, matriz aumentada e conseqüente antecipação do processo de maturação para o animal tratado, em relação ao controle.

d) Para a zona de ossificação:

- trabéculas ósseas mais espessas e em maior número, condroplastos acelulares em menor quantidade perto da zona de cartilagem hipertrófica e antecipação da ossificação para o animal tratado, em relação ao controle.

3. Os achados morfométricos (técnica de CHALKLEY modificada) revelaram:

a) para as zonas de cartilagem em repouso e seriada:

- aumento da área celular e diminuição da área da ma-

triz intercelular para o animal tratado, em relação ao controle, durante toda a lactação.

b) para a zona de cartilagem hipertrófica:

diminuição da área celular e aumento da área da matriz, durante toda a lactação, para o animal tratado em relação ao controle.

c) para a zona de ossificação:

- aumento da área trabecular, para o animal tratado, durante os 22 dias de vida pós-natal, em relação ao controle.

4. A relação citoplasma-nuclear mostrou:

- para as zonas de cartilagem em repouso, seriada e hipertrófica do rato tratado, aumento do valor desta relação até o 10º dia de vida pós-natal; e para o rato controle, aumento do valor desta relação até o 13º dia nas zonas de cartilagem em repouso e hipertrófica.

Os resultados apresentados no presente trabalho sugerem que a administração de uma única dose de 30 000 UI de vitamina A na rata, atua na epífise do fêmur do rato recém-nascido e por todo o período da lactação, diretamente sobre os tecidos cartilaginoso e ósseo, provocando uma ossificação endocondral acelerada.

## 6. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The objective for this research was to study the alterations caused by vitamin A during lactation in femur length and in the epiphysary disk of the femur of rats whose mothers had received a single dose of vitamin on the 10<sup>th</sup> day of pregnancy.

Twenty adult female rats were utilized for this experiment: 10 received a single dose of vitamin A (AROVIT), 0.20 ml containing 30,000 IU of vitamin A palmitate, injected intraperitoneally on the 10<sup>th</sup> day of pregnancy; the remaining 10 were used as controls, receiving a single dose of 0.20ml of 0.85% NaCl solution under the same conditions.

Eighty newborn rats from the mothers which had received vitamin A were designated as "treated", while 80 rats from mothers which had received saline were used as controls. Ten animals per each group were sacrificed at each of the following ages: 1<sup>st</sup>, 7<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup>, 13<sup>th</sup>, 16<sup>th</sup>, 19<sup>th</sup>, and 22<sup>nd</sup> day of life. The animals were weighed on the day of the sacrifice. After fixation, 5 treated and 5 control femurs



for each age were obtained, dissected, weighed on a torsion scale, and measured with a caliper of 0.1 mm precision. Sequential sections 7  $\mu$ -thick were enclosed in paraffin and stained with hemalumen-eosin and Masson trichrome dye.

1. The morphological data revealed:

- Body weight and femur weight of treated animals were similar to the control's both groups showing an abrupt change in body and femur weight around the 10<sup>th</sup> day of postnatal life. The femurs of treated animals showed increased length up to the 10<sup>th</sup> day of postnatal life, with values similar to those of the controls after this period of time.

2. The histological data showed:

a) for the zone of resting cartilage:

- larger and more numerous cells; less abundant matrix for treated rats as compared to the controls, and earlier appearance of the epiphysary ossification center for treated rats.

b) For the cartilage zone in series:

- a larger number of cells, less abundant matrix and better arrangement of cell columns for the treated animals during the first 10 days of postnatal life.

- after the 10<sup>th</sup> day, the histological aspects of the cartilage zone in series of the treated rat was similar to that of the controls.

c) for the zone of hypertrophic cartilage:

- a lower number of cells, increased matrix and consequent earlier maturation process for treated animals when compared to the controls, throughout the whole experimental period.

d) for the ossification zone:

- thicker and more numerous bone trabeculae, less numerous cell chondroplasts near the zone of hypertrophic cartilage and earlier ossification for treated animals than for the controls.

3. The morphometric findings (obtained by the technique of CHALKLEY, modified) revealed:

a) for the cartilage zones, both at rest and in series:

- increased cellular area in addition to decreased area of intracellular matrices for treated animals when compared to the controls, throughout lactation.

b) for the zone of hypertrophic cartilage:

- decreased cellular area and increased matrix area for

treated animals when compared to the controls, throughout lactation.

c) For the ossification zone:

- increased trabecular area for treated animals when compared to the controls during the first 22 days of postnatal life.

4. The cytoplasm-nucleus ratio showed:

- increased ratio up to the 10<sup>th</sup> day of postnatal life for the cartilage zones at rest, in series and with hypertrophy of treated rats. In the controls, the value of this ratio increased up to the 13<sup>th</sup> day in the resting and hypertrophic cartilage zones.

The results reported in this study suggest that administration of a single dose of 30,000 IU of vitamin A to female rats acts on the epiphysis of the femur of newborn rats and continues to act throughout the nursing period with a direct effect on the cartilage and bone tissues by causing accelerated endochondral ossification.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARNICOT, N.A. The local action of vitamin A on bone. *J. Anat.*, 84: 374-387, 1950.
- BAUMANN, C.A. & MOORE, T. Thyroxine and hypervitaminosis A. *Biochem. J.*, 33: 1639-1644, 1939.
- BAUME, L.J.; CONNE, P.H. & KORNER, W.F. Les effets d'une carence en vitamine A de plus en plus prolongée et d'un excès de vitamine A sur le développement du tibia du rat blanc. *Helv. odont. Acta.*, 14: 80-87, 1970.
- CHALKLEY, H.W. Method for the quantitative morphologic analysis of tissues. *J. nat. Cancer Inst.*, 4: 47-54, 1943.
- DeDUVE, C. & WATTIAUX, R. Functions of lysosomes. *Ann. Rev. Physiol.*, 28: 435-492, 1966.
- DeDUVE, C.; WATTIAUX, R. & WIBO, M. Effects of fat-soluble compounds on lysosomes *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.*, 8: 30, 1961.
- DINGLE, J.T. Release of a bound protease by the action of vitamin A. *Biochem. J.*, 79: 509-512, 1961.

- DINGLE, J.T.; FELL, H.B. & LUCY, J.A. The effect of retinol and hydrocortisona on cultured limb-bone rudiments. *Biochem. J.*, 98: 173-181, 1966.
- DINGLE, J.T.; SHARMANN, I.M. & MOORE, T. The influence of vitamin A on the proteolytic activity of lysosomes from the livers and kidneys of rats. *Proc. Nutr. Soc.*, 22: X-XI, 1963.
- FELL, H.B. The effect of vitamin A on the breakdown and synthesis of intercellular material in skeletal tissue in organ culture. *Proc. Nutr. Soc.*, 24: 166-172, 1965.
- 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.
- FELL, H.B. & MELLANBY, E. The effects of hypervitaminosis A on embryonic limb-bones cultures *in vitro*. *J. Physiol. (Lond.)*, 116: 320-349, 1952.
- FELL, H.B. & THOMAS, L. The influence of hydrocortisone on the action of excess vitamin A on limb-bone rudiments in culture. *J. exp. Med.*, 114: 343-362, 1961.
- GIROUD, A.; GOUNELLE, H. & MARTINET, M. Données quantitatives sur le faux de la vitamin A chez le rat lors d'expériences de tératogénese par hypervitaminose A. *B. Soc. Biol.*, 39: 331-336, 1957.
- HERBST, E.J.; PAVCEK, P.L. & ELVEHJEM, C.A. *Science*, 100: 338, 1944. Apud CLARK, L. Hypervitaminosis A: a review. *Aust vet. J.*, 47: 568-571, 1971.

IRVING, J.T. The effects of avitaminosis and hypervitaminosis A upon the incisor teeth and incisor alveolar bone of rats *J. Physiol (Lond.)*, 108: 92-101, 1949.

IUCIF, S.: Crescimento alométrico da supra-renal em ratos castrados. *Ciência e Cultura*, 17: 241, 1965.

IUCIF, S.; LOPES, R.A. & AZOUBEL, R. Estudo do crescimento pós natal do arco dentário do rato, após a administração da hidrocortisona. *Folia Anat. (Coimbra)*, 43: 1-34, 1974.

LOPES, R.A.; VALERI, V.; AZOUBEL, R.; IUCIF, S. & CAMPOS, G.M. Estudo alométrico do rato submetido a uma hipervitaminose A, durante a lactação. *Rev. Bras. Pesq. Med. e Biol.*, 7: 283-291, 1974.

LOPES, R.A.; VALERI, V.; IUCIF, S.; AZOUBEL, R. & CAMPOS, G.M. Estudo alométrico do rim do rato submetido a uma hipervitaminose A, durante a lactação. *Ciência e Cultura*, 27: 57-62, 1975.

MADDOCK, C.L.; WOLBACH, S.B. & MADDOCK, S. *J. Nutr.*, 39: 117, 1949. Apud CLARK, L. Hypervitaminosis A: a review. *Aust. vet. J.*, 47: 568-571, 1971.

MELLANBY, E. Croonian Lecture: Nutrition in relation to bone growth and nervous system. *Proc. roy Soc. Biol.*, 132: 28-1944.

MELLANBY, E. Vitamin A and bone growth: The reversibility of vitamin A - deficiency changes. *J. Physiol. (Lond.)*, 105: 382-399, 1947.

MOORE, T. & WANG, Y.L. Hypervitaminosis A. *Biochem. J.*, 39: 222-228, 1945.

NATANSON, A.O.; MITASHOVA, N.I. & CHUVAEV, A.V. Role of hypophysis in development of adrenal hypertrophy in rats with hypervitaminosis A. *Fed. Proc. [Transl. Suppl.]*, 25: 59-62, 1966.

RAM, G.C. & MISRA, U.K. Studies on the mode of action of vitamin A. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 45: 3-19, 1975.

ROELS, O.A.; ANDERSON, O.R.; LUI, S.T.; SHAH, D.O. & TROUT, M.E. Vitamin A and membranes. *Amer. J. clin. Nutr.*, 22: 1020-1032, 1969.

SELYE, H. Prevention of vitamin A overdosage by somatotrophic hormone. *J. Endocr.*, 16: 231-235, 1957.

SOUZA, M.L.; AZOUBEL, R.; IUCIF, S. & LOPES, R.A. Estudo do crescimento do cérebro de ratos submetidos à hipervitaminose A, durante a lactação. *Rev. Bras. Pesq. Med. e Biol.*, 8: 53-60, 1975.

VAES, S.G. *Abstr. Fed. Europ. Biochem. Soc.*, 1: 83, 1964. Apud FELL, H.B. The effect of vitamin A on the breakdown and synthesis of intercellular material in skeletal tissue in organ culture. *Proc. Nutr. Soc.*, 24: 166-172, 1965.

WEISSMANN, G. & DINGLE, J.T. Release of lysosomal by ultraviolet irradiation and inhibition by hydrocortisone. *Exp. Cell Res.*, 25: 207-210, 1961.

WEISSMANN, G. & THOMAS, L. Studies on lysosomes. II. The effect of cortisone on the release of acid hydrolases from

a large granule fraction of rabbit liver induced by excess of vitamin A. *J.Clin.Invest.*, 42: 661-669, 1963.

WEISSMANN,G.; UHR,J.W. & THOMAS,L. Acute hypervitaminosis A in guinea pigs. Effects on acid hydrolases. *Proc.Soc.exp. Biol.(N.Y.)*, 112: 284-291, 1963.

WOLBACH,S.B. Vitamin A deficiency and excess in relation to skeletal growth. *J.Bone Jt.Surg.*, 29: 171-192, 1947.

WOLBACH,S.B. & MADDOCK,C.L. Vitamin A acceleration of bone growth sequences in hypophysectomized rats. *Arch.Path.*, 53: 273-278, 1952.

WOLBACH,S.B.; MADDOCK,C.L. & COHEN,J. The hypervitaminosis A syndrome in adrenalectomized rats. *Arch.Path.*, 60: 130-135, 1955.