

EFEITO DE GRANDES DOSES DE VITAMINA "E"
SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA
GLÂNDULA SALIVAR SUBMANDIBULAR DO RATO,
DURANTE OS PERÍODOS
DE GESTAÇÃO E LACTAÇÃO.

Este exemplar corresponde a redação
final da tese defendida pelo candidato
Norair Salviato dos Reis e aprovada
pela Comissão julgadora

NORAIR SALVIATO DOS REIS

Norair Salviato dos Reis

ORIENTADOR: PROF. DR. REINALDO AZOUBEL

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas, para
a obtenção do título de
doutor em ciências.

R277e

8143/BC

UNICAMP

"Tudo tem seu tempo determinado e há tempo para todo propósito debaixo do céu;

Há tempo de nascer e tempo de morrer; tempo de plantar e tempo de arrancar o que se plantou;

Tempo de matar e tempo de curar; tempo de derribar e tempo de edificar;

Tempo de chorar e tempo de rir; tempo de prantear e tempo de saltar de alegria;

Tempo de espalhar pedras e tempo de ajustar pedras; tempo de abraçar e tempo de afastar-se de abraçar;

Tempo de buscar e tempo de perder; tempo de guardar e tempo de deitar fora;

Tempo de rasgar e tempo de coser; tempo de estar calado e tempo de falar;

Tempo de amar e tempo de aborrecer; tempo de guerra e tempo de paz".

Eclesiastes 3: 1-8.

INTRODUÇÃO.

A revisão bibliográfica relativa à vitamina "E" mostra inúmeros trabalhos atinentes à sua deficiência; poucos são, entretanto, os que se referem ao efeito causado pelo excesso da mesma. O conhecimento do efeito causado pela deficiência de vitamina "E" no organismo, todavia, pode ser de grande valia, como auxiliar na compreensão dos efeitos causados por altas doses da mesma. Com base neste raciocínio, procedeu-se ao levantamento dos trabalhos referentes à vitamina "E", tanto daqueles concernentes à referida deficiência, quanto daqueles que dizem respeito ao efeito de altas doses de alfa-tocoferol.

O resultado dessa pesquisa bibliográfica mostrou que durante algum tempo pensou-se que a vitamina "E" atuasse apenas sobre as funções sexuais. EVANS & BURR (1928), entretanto, verificaram que, quando as reservas de vitamina "E" de ratas lactantes caíam a níveis criticamente baixos, a prole apresentava paralisia generalizada que se instalava com maior frequência entre o 18º e o 25º dia de vida pós-natal. Essa paralisia, denominada paralisia tardia da lactação, aparecia repentinamente e se caracterizava por severa degeneração dos músculos esqueléticos. A terapia com vitamina "E" previne seu aparecimento em ratos, desde que iniciada até o 15º dia de lactação, tendo pouco ou nenhum efeito uma vez iniciado o processo. TELFORD et alii (1939 a,b), em experimento semelhante ao anterior, constatarem o surgimento de distrofia muscular caracterizada por creatinúria e acentuada degeneração da musculatura esquelética. Embora sejam conhecidos os efeitos da deficiência de vitamina "E" na a

musculatura esquelética, o papel do alfa-tocoferol na síntese protéica, continua obscuro. Admitiu-se que houvesse aumento da síntese protéica na musculatura de animais com deficiência de vitamina "E" (DINNING *et al.*, 1956 b; DIEHL, 1960; WEINSTOCK, 1966), entretanto, estudos "in vitro", forneceram resultados conflitantes (DE VILLERS *et al.*, 1972; REISS & TAPPEL, 1973), dificultando a interpretação da interação vitamina "E" e síntese de proteínas.

Outra atividade funcional foi atribuída à vitamina "E", quando observações levadas a efeito em animais submetidos a dietas usualmente adequadas para a reprodução, tornavam-se estéreis, sempre que a ração era constituída, na sua maior parte, por gorduras facilmente oxidáveis ou quando a ração era tratada por solução etérea de cloreto férrico (WADDEL & STEENBOCK, 1928). Por outro lado, na fração lipídica não saponificável de vários óleos vegetais e extratos de plantas, OLCOTT & MATTIL (1931 a, b; 1936) encontraram uma substância antioxidante e vitamina "E". Com base nessas observações, esses autores sugeriram que a vitamina "E" fosse facilmente oxidável e, por isso, era acompanhada por um antioxidante, ou então, a vitamina "E" e o antioxidante eram a mesma substância. Esta última hipótese foi a que se confirmou uma vez que, posteriormente, OLCOTT & EMERSON (1937) demonstraram a propriedade antioxidante dos tocoferóis.

Apesar de não ser a única, a função antioxidante é a que ganhou maior destaque (MASON, 1944). Como tal, a vitamina "E" impede a auto-oxidação de ácidos graxos insaturados quando expostos ao oxigênio molecular, evitando ou diminuindo a formação de lipoperóxidos tóxicos e suprimindo a formação de ceróides e lipofuscina (BIERI &

FARREL, 1976). Normalmente, os produtos de auto-oxidação das gorduras não ocorrem nos tecidos; porém, na deficiência de tocoferol, passam a ser encontrados em diferentes órgãos, principalmente nos depósitos de gordura e no fígado (LEHNINGER, 1976).

A ação da vitamina "E", entretanto, não se limita ao que até aqui foi exposto. Diversos autores demonstraram, experimentalmente, que a mesma interfere no metabolismo celular; dessa forma, ADAMSTONE (1931) investigando a viabilidade de ovos de galinhas alimentadas com ração deficiente em vitamina "E", verificou que a taxa de crescimento e de diferenciação dos embriões provenientes de tais ovos, era menor que o normal. Alguns embriões morriam nos dois primeiros dias de incubação, devido a alterações do sistema circulatório; outros mais tarde; porém, ao final do 4º dia de incubação, poucos sobreviviam. Após essas observações ADAMSTONE (1931) embora não sendo muito preciso em suas conclusões, sugeriu que a vitamina "E" fosse tão importante para as aves, quanto para os mamíferos.

JUHASZ-SCHAFFER (1931) adicionando vitamina "E" sob a forma de óleo de germe de trigo ao plasma sanguíneo, usado como meio de cultura de tecidos, observou forte estímulo no crescimento dessas culturas. Por outro lado, quando o óleo era retirado, o estímulo desaparecia.

MASON (1933) estudando as alterações histopatológicas encontradas em ratos submetidos a dietas com carência de vitaminas, inclusive da vitamina "E", observou que esta era necessária para o desenvolvimento inicial e para o funcionamento do sistema nervoso central (SNC) e verificou, também, que o tocoferol se fazia mais necessário por ocasião do desmame, por propiciar maior rapidez na di-

visão mitótica das células do tecido nervoso que, nessa espécie animal, ocorre por essa época. Ainda esse mesmo autor admite que a vitamina "E" seja necessária para a formação de componentes celulares, como a substância de Nissl. Nesse mesmo trabalho, MASON (1933) sugere que a vitamina "E" tenha efeito estimulante sobre a atividade das células, interferindo, dessa forma, no crescimento do corpo e agindo sobre áreas de rápida proliferação celular, como a epiderme. Conforme esse autor, a carência de vitamina "E", determinaria o retardamento generalizado da divisão celular, corroborando com os achados de VEZÁR & KOKÁS (1931), que relataram, em animais deficientes em vitamina "E", alterações nos pelos e decréscimo de, aproximadamente, 18% no metabolismo basal.

ADAMSTONE (1934) utilizando o método do cloreto férrico, preconizado por MADDEL-STEENBOCK (1928), para a destruição da vitamina "E" em rações, observou, em aves tratadas com essa alimentação por longos períodos, focos de destruição dos tecidos viscerais normais, que eram substituídos por tecido celular com aspecto indiferenciado. A partir dessas constatações, concluiu que a vitamina "E" estaria intimamente associada com o núcleo e, provavelmente, exerceria controle indireto sobre o mesmo, durante a divisão celular.

MASON (1933,1944) observando as alterações nucleares demonstradas pelo aumento da afinidade tintorial do material cromatínico à hematoxilina-férrica, pelo aumento do número de núcleos no músculo esquelético de coelhos e pela presença de células gigantes, multinucleadas, no testículo de ratos, interpretou tais achados como resultantes de alterações dos ácidos nucléicos, que ocorriam em animais vitamino-deficientes, principalmente nos animais deficientes em

vitamina "E". Mais tarde, a suspeita de que a vitamina "E" regulasse o metabolismo dos ácidos nucleicos ganhou novo impulso, com a constatação feita por YOUNG & DINNING (1951) de que havia um acúmulo tecidual de ácido ribonucleico (RNA), em animais carentes em vitamina "E". DINNING (1962, 1975); DINNING et alii (1955, 1956 a,b), após a administração de nucleotídeos marcados com carbono 14 na dieta de animais, tratados com ração deficiente em vitamina "E", verificaram que havia aumento na síntese específica do RNA, porém, sem o aproveitamento desses nucleotídeos. Este achado sugeria que novos nucleotídeos eram sintetizados e que, possivelmente, o acúmulo do ácido nucleico fosse devido à diminuição na taxa de degradação do mesmo.

Além do RNA, também o ácido desoxirribonucleico (DNA) é afetado em estados carenciais de vitamina "E". Em relação ao DNA, achados de YOUNG & DINNING (1951) evidenciaram duplicação no conteúdo desse ácido nucleico no músculo esquelético de coelhos com deficiência em vitamina "E". O uso de precursores de nucleotídeos marcados com carbono 14 (DINNING, 1975; DINNING et alii, 1956 a,b) e de nucleotídeos pré-formados (DINNING, 1962; DINNING et alii, 1956 b) possibilitou a verificação de que o aumento de ácidos nucleicos nos tecidos, resulta de acréscimo de cerca de vinte vezes maior na taxa de síntese do DNA, com conseqüente aumento na síntese de novos nucleotídeos. Além do aumento do DNA das células musculares, no macaco, há aumento, também, no DNA das células da medula óssea, devido à exacerbação na síntese do ácido nucleico (DINNING, 1962). Para esse mesmo autor, essas alterações no metabolismo dos ácidos nucleicos estariam relacionadas às doenças próprias de cada espécie animal, tais como a distrofia muscular no coelho, a distrofia muscular e a

anemia no macaco e, dessa forma, seria mais um elo a favor de uma ação de controle da biossíntese do DNA, exercida pela vitamina "E".

A atividade da vitamina "E" em relação a enzimas, foi estudada, principalmente, por CATIGNANI (1980). Este autor verificou aumento na atividade enzimática, em casos de deficiência da vitamina em questão. Este achado levou-o a concluir que o alfa-tocoferol poderia ter, talvez, ação co-repressora da atividade enzimática.

Quanto à influência sobre o metabolismo lipídico ALAM & ALAM (1979), estudando a composição química dos produtos de secreção das glândulas submandibulares e lacrimais, observaram que a quantidade de fosfolipídeos total era inversamente proporcional à quantidade de vitamina "E" na dieta. Esses mesmos autores relataram, também, mudança na proporcionalidade da fração lipídica, entre os lípidos neutros, ácidos e fosfolipídeos. Esta modificação seria decorrente de alterações do hormônio tireoideano circulante, corroborando com os resultados de MARCH *et alii* (1973), os quais notaram que quantidades excessivas de vitamina "E" suprimiam a atividade tireoideana em galinhas, e também com os achados de TSAI *et alii* (1978), que verificaram no homem, em condições idênticas, redução na taxa do colesterol sérico.

Embora diversas anormalidades do metabolismo lipídico tenham sido descritas em animais com deficiência de vitamina "E", grandes doses da mesma parecem afetar os níveis plasmáticos de lípidos. MARTIN & HURLEY (1977) verificaram em ratos que receberam doses suplementares de vitamina "E", na dosagem de 500mg/dia, durante a gestação e a lactação, que o nível de lipídeos encontrado no plasma sanguíneo era mais alto que o normal; o mesmo sucedia, segundo

esses autores, com os lipídeos totais séricos no homem, nos casos em que havia aumento na suplementação alimentar de vitamina "E". CHEN *et alii* (1972), por sua vez, também verificaram aumento no colesterol sérico, como decorrência de tratamento semelhante.

Poucas são as informações sobre a teratogenicidade da vitamina "E", em relação à ratos. A administração de grandes doses de vitamina "E" durante a gestação e a lactação, parece não provocar alterações no peso e no tamanho das ninhadas; porém, o tempo de gestação pode aumentar, sendo maior que 21 dias (MARTIN & HURLEY, 1977). Esses autores constataram, ainda, que os filhotes de ratas que receberam 200mg/dia de vitamina "E" durante a gestação, nasceram sem o dedo mínimo das patas traseiras. Notaram, também, que uma ninhada proveniente de ratas que receberam 500mg/dia de vitamina "E" durante a gestação e a lactação, tinha os olhos semi-abertos ao nascer; igual fato foi, também, observado em filhotes da segunda geração de mães que receberam igual dose de vitamina "E" como suplemento vitamínico, na ração. A transferência da vitamina "E" pela placenta, toda via, não parece ser proporcional à quantidade existente no organismo da mãe. Estudo realizado por MASON & BRYAN (1940) sugere que haja transferência apenas parcial através da placenta, uma vez que ocorre armazenamento limitado de vitamina "E", nos tecidos do feto. Essa transferência restrita da vitamina em questão pela barreira placentária, é interpretada como sendo decorrente de proteção natural ao organismo em desenvolvimento, ou para garantir à mãe certa quantidade de alfa-tocoferol, além daquela requerida pelo organismo fetal. Destacam, finalmente, que as limitações na transferência de vitamina "E" através da membrana placentária deve ser atribuída a uma seleti-

vidade fisiológica e, no que concerne às vitaminas lipossolúveis, essa seletividade pode decorrer do tamanho molecular dessas vitaminas.

STRAUMFJORD & QUARF (1946) relataram que a proporção de alfa-tocoferol plasmático no sangue da mãe, em relação ao da criança colhido do cordão umbilical no momento do parto, é de 5,7:1,0; PAR-RISH et alii (1950) trabalhando com bovinos, estabeleceram uma proporção de 6,0:1,0.

GERLOCZY et alii (1951) embora apontem como efetiva a seletividade da barreira placentária à vitamina "E", acham, no entanto, que as diferenças entre mãe e filho, quanto aos níveis séricos e plasmáticos do alfa-tocoferol, são devidos à pequena sensibilidade dos métodos empregados nas determinações.

SATO (1973a) apesar de não haver encontrado anormalidades no aspecto externo dos ratos nascidos de fêmeas que receberam 100 vezes mais vitamina "E" que o grupo "controle", obteve um número médio menor de implantações de blastocistos (10,7/8,4) no grupo "tratado"; verificou, também, que o número de fetos sobreviventes era igualmente menor que no grupo "controle" (10,7:8,2); e encontrou maior proporção de fetos com retardamento na ossificação do osso occipital e estérnebras, sugerindo que durante a prenhez o alfa-tocoferol atue desde os blastocistos, ou nas condições para a implantação dos mesmos, até nos fetos em desenvolvimento.

BARNES & BROWN (1974) utilizaram os isômeros alfa, beta, gama e delta do tocoferol, avaliando por medições diretas, a captação dos mesmos pelos fetos de ratos em diferentes estágios do desenvolvimento. Os resultados apresentados pelos autores demonstram

haver captação seletiva e progressiva dos tocoferóis. Inicialmente, os níveis fetais são muito mais baixos que aqueles encontrados na mãe, porém, vão aumentando durante a prenhez. O alfa-tocoferol é captado em maior quantidade no início da gestação; entretanto, no recém-nascido, a proporção final dos quatro isômeros é muito semelhante àquela encontrada no fígado materno, que não sofre variações significantes ao longo da prenhez.

Conquanto a vitamina "E" seja denominada vitamina da fertilidade, trabalho como o de CZYBA (1966) demonstrou, que a hipervitaminose "E" reduz a fertilidade do hamster dourado.

A vitamina "E" determina grande pleomorfismo de sintomatologia, quando no estado carencial. Isto talvez se explique pelo fato de ser necessária à manutenção da integridade estrutural e funcional dos músculos esquelético, cardíaco e liso e, em alguns animais, do sistema vascular periférico. Desempenha, como antioxidante, importante papel na estabilização do metabolismo lipídico. Como protetora dos componentes celulares, estaria relacionada com a função mitocondrial e com mecanismos de transporte (CATIGNANI, 1980; MARUSICH, 1980). Assim, o conceito de que funciona como protetora de lipoproteínas estruturais ou de componentes lipídicos oxidáveis das enzimas, ajuda a esclarecer a diversidade de lesões histopatológicas desenvolvidas durante a sua deficiência tais como aquelas que foram descritas em roedores, ovinos, peixes, aves, primatas, além do homem (NASON, 1954; FARREL, 1976; NELSON, 1980). As principais lesões histopatológicas encontradas, foram as seguintes: 1. Degeneração testicular. 2. Degeneração embrionária: traduzida por maior permeabilidade vascular e hemorragia no embrião ou feto; morte e reabsorção fetal.

Em embriões de pavão constatou-se, ainda, exoftalmia e catarata. 3. Diatese exsudativa com edema, por aumento da permeabilidade capilar. 4. Anemia microcítica e megaloblástica. 5. Fragilidade das hemácias, manifestada pela diminuição da vida média das mesmas e aumento do índice de hemólise. 6. Encefalomalácia, caracterizada por degeneração cerebelar com hemorragia puntiforme, causada por hidroperóxidos de ácidos graxos insaturados, no tecido cerebral. 7. Degeneração ou distrofia muscular, caracterizada por hialinização dos músculos esqueléticos e cardíaco, acompanhada por acentuada creatinúria, com consequente queda no fosfato de creatinina, necessário à respiração celular. 8. Degeneração necrótica, distrofia tóxica ou hepatose dietética em ratos, moléstia que está associada à diminuição da respiração do hepatócito. 9. Úlcera gástrica em ratos, moléstia associada à carência de piridoxina. 10. Degeneração dos túbulos renais. 11. Esteatite ou gordura marrom-amarelada. 12. Deformidades ósseas comumente de origem alimentar, apresentando no pavão macho, aumento no tamanho do tarso (esparavão). 13. Despigmentação dos dentes. 14. Degeneração nervosa. 15. Alteração no aproveitamento da vitamina "A". 16. Mau aproveitamento protéico.

O efeito da deficiência de vitamina "E" sobre as glândulas submandibulares foi estudado por CRUZ & ARRUDA (1967) e CRUZ et alii (1975). Esses autores relataram modificações na estrutura morfológica da glândula em questão com diminuição do número de grânulos das células dos ácinos serosos, falta de estriação regular nos dutos estriados, sendo que nestes há o aparecimento de áreas necróticas quando o estado carencial se prolonga. Outras lesões, tais como túbulos hipertrofiados, ácinos proeminentes etc., são descritas em

estados carenciais de vitamina "E" associadas a hormônios sexuais.

Como foi visto, há inúmeras lesões observadas e relatadas em casos de deficiência de vitamina "E", mas poucas são as observações sobre o comportamento dos órgãos em casos de excesso da mesma. Tal fato justifica estudos mais específicos sobre a ação do alfa-tocoferol, em grandes doses, em órgãos que respondem à deficiência de vitamina "E". É o caso das glândulas salivares submandibulares, órgãos de alto metabolismo e que apresentam alterações regressivas nos estados de hipovitaminose "E" (CRUZ & ARRUDA, 1967; CRUZ et alii, 1975) e cujo comportamento frente a altas doses de vitamina "E", ainda é pouco estudado.

Por outro lado, estudos recentes têm demonstrado crescente preocupação dos investigadores no que diz respeito aos possíveis efeitos da vitamina "E", quando em excesso, nos diferentes tecidos, órgãos e suas respectivas funções. Pareceu-nos, portanto, interessante o estudo da ação da vitamina "E", em grandes doses, sobre a glândula salivar submandibular, por ser, este, um órgão que responde à deficiência de vitamina "E" e que talvez possa fornecer eventuais respostas à ação da mesma, em relação a biologia do desenvolvimento, quando sob a ação de altas doses da referida vitamina.

Diante do exposto e tendo em vista o aumento do consumo de vitamina "E" (TSAI et alii, 1978), pareceu-nos importante a realização deste trabalho. Procurou-se, neste estudo, correlacionar o efeito de grandes doses do alfa-tocoferol sobre as glândulas submandibulares, em diferentes etapas do desenvolvimento, tais como: no período pré-natal, tendo-se em vista a possível passagem pela barreira placentária.

ria e a teratogenicidade da referida vitamina; no período pós-natal, quanto à sua transferência pelo leite e sua influência na citodiferenciação dos elementos celulares das referidas glândulas.

MATERIAL E MÉTODOS

I- MATERIAL

Para a realização do presente trabalho, foram utilizadas 22 ratas albinas (*Rattus norvegicus* var. albino), adultas jovens, pesando $240 \pm 10g$, que foram distribuídas em 2 grupos: "controle" e "tratado", com 11 ratas cada.

As fêmeas de ambos os grupos experimentais, foram acasaladas com machos adultos jovens, sadios e bem conformados. O controle para o acasalamento foi feito através de exame de esfregaço vaginal; quando a fêmea se encontrava em estro, era colocada com o macho durante toda a noite, na manhã seguinte era feito um exame de material colhido da vagina e, sempre que detectada a presença de espermatozóides a fêmea era considerada prenhe e este era o dia zero da prenhez.

A partir do 8º dia de prenhez, o grupo "controle" recebeu 1ml de óleo de soja, por dia, por meio de intubação gástrica, até o 30º dia após o nascimento da prole. O grupo "tratado" recebeu, pela mesma via e tempo, 500mg de vitamina "E" (ROVINIX E - adsorbato, contendo 50 - 54% de di-acetato de alfa-tocoferol), dissolvidas em 1ml de óleo de soja. Foi eleito o 8º dia de prenhez para início do tratamento experimental porque, para esta espécie, considera-se o período entre o 8º e o 11º dia de prenhez, como o período crítico, quanto às malformações.

Os dois grupos receberam ração balanceada e água "ad libitum".

Por ocasião do nascimento, os filhotes foram contados e pesados; a seguir, com a finalidade de se verificar possíveis mal-formações, os filhotes foram submetidos à um exame externo, que constou do seguinte:

1. Exame de perfil: ocorrência de microftalmia e microcefalia; avaliação do sistema nervoso em conjunto; presença, ou não de abertura na coluna.
2. Exame da cabeça: tamanho do crânio; abertura das pálpebras; implantação da orelha externa; fusão, ou não dos tubérculos auriculares; formato da boca (circular, ou em fenda); fenda labial; fenda palatina; abertura, ou falta de soldadura dos ossos da mandíbula.
3. Exame dos membros: falta de segmentos; tamanho; conformação dos dedos.
4. Exame do abdome: presença, ou não de onfalocelo; persistência de herniação intestinal.
5. Exame dos genitais: tubérculo genital (atrofia, ou hipertrofia).
6. Região anal: anus imperfurado.

De cada prole do grupo "controle" e "tratado", foram tomados 5 animais, aleatoriamente, que foram sacrificados, com as idades de zero, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30 dias, por meio de injeção intraperitoneal de solução de hidrato de cloral a 10%.

Imediatamente após a morte de cada animal, ambas as glândulas salivares submandibulares foram dissecadas cuidadosamente, retiradas, comprimidas suavemente entre papel de filtro e pesadas em balança com precisão de 1×10^{-4} g.

II- MÉTODOS

1. Técnicas histológicas qualitativas:

Após pesagem, as glândulas salivares foram fixadas em AL-FAC (álcool 80%, formaldeído e ácido acético glacial, na proporção de 80: 15: 05 partes, respectivamente), por 24hs. Depois de fixado, parte do material foi separado e destinado à inclusão em parafina. O restante do material, por medida de precaução, foi guardado no próprio fixador. A inclusão em parafina foi feita pelas técnicas de rotina. Cortes com 6µm de espessura, foram montados em lâmina e corados pelo hemalume-eosina, ou pelo tricrômio de Masson.

2. Técnicas histológicas quantitativas:

a) Cariometria:

Com a finalidade de se estimar o volume dos núcleos das células acinosas e dos núcleos das células dos dutos estriados, procedeu-se da seguinte forma: com o auxílio de uma câmara clara, traçou-se o contorno em papel sulfite, de 20 núcleos das células acinosas escolhidos aleatoriamente, e de 10 núcleos de células dos dutos estriados, escolhidos da mesma forma que os anteriores, das glândulas salivares de cada animal, de cada grupo. O aumento final da pro-

jeção do núcleo sobre o papel sulfite, foi de, aproximadamente, 1000 X. A partir destes contornos, procedeu-se a medida do diâmetro maior (D1) e do diâmetro menor (D2), com auxílio de régua milimetrada. Determinou-se o contorno de um número menor de núcleos das células dos dutos estriados, em virtude destes apresentarem tamanhos mais regulares. Foram considerados, apenas os núcleos que mostravam contorno esférico, ou elipsoidal.

A câmara clara foi calibrada com o auxílio de uma lâmina milimetrada, a partir do que as medições foram transformadas em micrometros.

Para a obtenção dos volumes nucleares, estes foram comparados à figura de um elipsóide aplicou-se, então, a fórmula do elipsóide, de acordo com VALERI et alii. (1967):

$$V = 0,35341426 \times D1 \times D2 \times \sqrt{D1 \times D2}$$

Os valores assim obtidos, foram analisados estatisticamente.

3. Análise estatística

a) Alometria:

O estudo da relação de crescimento entre dois sistemas, por exemplo, peso de um órgão (y) e peso corporal (x), pode ser feito pela equação: $y = bx^k$, ou sua expressão linear:

$\log y = \log b + K \cdot \log x$, onde " b " e " K " são constantes (HUXLEY, 1924).

Projetando-se em gráfico os pontos correspondentes ao log do peso do órgão em função do log da massa corporal, esses dispor-se-ão segundo uma reta com inclinação " K " (coeficiente de alometria), desde que entre esses valores haja relação alométrica. O termo biologicamente importante na equação de alometria é o coeficiente " K ". Quando " K "=1 o crescimento entre x e y é isométrico, o que significa que, ao crescimento unitário de x , corresponde igual crescimento de y . Quando " K ">1, ao crescimento unitário de x corresponde um crescimento de y , " K " vezes maior; o inverso acontece quando " K "<1.

Para o estudo alométrico do aumento da massa glandular em relação à massa corporal, foi empregada uma técnica de regressão a duas variáveis sujeitas a erro. Essa técnica foi desenvolvida por WALD (1940), modificada por BARTLETT (1949) e empregada em alometria por CRUZ (1958) e por CRUZ & LISON (1963).

No presente trabalho, para a determinação do coeficiente de alometria e seus parâmetros, relativo ao crescimento glandular em relação à massa corporal, foram utilizados para cada grupo experimental, 11 lotes de ratos brancos, com 5 animais de ambos os sexos, cada lote e com idade variando entre zero e 30 dias de vida pós-natal.

Foram projetados em gráfico os pontos correspondentes ao log do peso glandular em função do log do peso corporal, de todos os animais de cada um dos grupos experimentais. Cada sequência de pontos foi dividida em duas partes, cada uma correspondendo a uma fase de crescimento, tendo como limite o ponto de inflexão observado no gráfico de cada uma das sequências. Para cada fase do crescimento de cada um dos grupos experimentais, foi estabelecido um coeficiente de alometria e seu respectivo intervalo de confiança. A linearidade dos pontos de cada sequência foi testada através do teste "t" de Student. A comparação entre os coeficientes de alometria foi feita por superposição da projeção gráfica dos coeficientes de alometria e seus respectivos intervalos de confiança. Sempre que houve superposição, mesmo parcial, os coeficientes de alometria, foram considerados iguais.

Com a finalidade de se trabalhar apenas com valores de log positivos, o peso das glândulas submandibulares foi multiplicado por mil ($\times 1000$).

b) Teste de "U" de MANN-WHITNEY:

Os pesos, tanto o corporal quanto o glandular, foram comparados entre si através do teste de Mann-Withney. Este teste, não paramétrico, foi escolhido por ser mais sensível que o teste "t" de Student, quando se trabalha com pequenas amostras (SIEGEL, 1956).

c) Teste da mediana:

Os dados de cariometria, tanto os provenientes das células acinosas, como aqueles dos dutos estriados, foram comparados entre si por meio do teste da mediana (SIEGEL, 1956). Utilizou-se a mediana para este tipo de comparação porque é menos sujeita a influência de dados aberrantes do que a média, uma vez que, durante a tomada das medidas, não se pode ter certeza se o que está sendo medido é uma calota de núcleo, ou se a imagem representa um corte que passou pela região equatorial do mesmo.

RESULTADOS

I. Exame da ninhada:

O exame de cada rato de todas as ninhadas, tanto do grupo "controle", como do grupo "tratado", de acordo com os parâmetros propostos na metodologia, não revelou qualquer tipo de alteração macroscópica, contudo, não foi realizada nenhuma investigação no sentido de evidenciar a conformação óssea.

II. Pesos corporal e glandular

A análise estatística mostrou que não há diferença entre os pesos corporais do grupo de animais "controle", quando comparados aos do grupo "tratado", por ocasião do nascimento. A partir do 3º dia de vida pós-natal até o 30º dia, todas as comparações estatísticas mostraram diferença significativa entre os pesos dos animais "tratados" e "controle", sendo que os animais "tratados" sempre apresentaram peso menor (Tabelas 1 e 2; Figura 1).

O peso das glândulas salivares comporta-se de modo análogo ao peso corporal. Quando comparados entre si através do teste U de Mann-Whitney, verifica-se que, à semelhança do peso corporal, não há diferença significativa entre os pesos das glândulas salivares dos grupos "controle" e "tratado", por ocasião do nascimento. As análises estatísticas dos dias subsequentes mostra, como para o peso corporal, que o peso das glândulas submandibulares do grupo tratado é inferior ao do grupo controle, durante o espaço de tempo estudado (Tabelas 1 e 2; Figura 2).

III. Cariometria:

A cariometria das células acinosas da glândula salivar submandibular, tanto do grupo "tratado" quanto do grupo "controle", forneceu resultados que, quando comparados estatisticamente entre si através do teste estatístico das medianas, mostra diferenças significantes entre os volumes nucleares desde os recém-nascidos até o 9º dia de vida pós-natal, a partir de onde as diferenças foram estatisticamente não significantes. O referido teste mostra que há menor volume nuclear das células acinosas no grupo "tratado" em relação ao "controle" (Tabelas 3; Figuras 3 e 4).

Com relação aos volumes nucleares das células do ducto estriados de ambos os grupos experimentais, foi verificado não haver diferenças estatisticamente significantes, em nenhuma das idades analisadas no presente trabalho (Figura 5).

IV. Crescimento alométrico da glândula submandibular dos ratos "controle", durante a lactação.

Os logarítmos dos pesos corporais, em relação à glândula submandibular do rato, foram divididos em três grupos, conforme a técnica de BARTLETT (1949) e ordenados segundo os valores crescentes do logarítmo do peso corporal. O exame da projeção gráfica (Figura 6) da relação entre o peso do animal e o peso da glândula, durante o período de vida pós-natal estudado, mostrou modificação da inclinação da reta a partir do 6º dia de vida extra-uterina, aproximadamente. Tal modificação situou-se à altura do valor 4,08 do eixo das abscissas e 10,4, para o eixo das ordenadas.

A tabela 4 mostra, os valores dos coeficientes de alometria e seus respectivos intervalos de confiança. A comparação entre esses coeficientes de alometria, mostra que as taxas de crescimento da glândula submandibular na 1ª e 2ª etapa de desenvolvimento, podem ser consideradas diferentes.

Até atingir a interfase, ou seja, o ponto onde ocorre a modificação da taxa de crescimento do órgão, o que se verifica em torno do 6º dia de vida pós-natal, o valor de "K" (coeficiente de alometria), para a relação peso do animal/peso glandular, foi igual a 0,24. A partir desse momento e durante todo o restante desse período de vida estudado, a taxa de crescimento da glândula, em relação ao peso corporal foi de 1,18.

V. Crescimento alométrico da glândula submandibular dos ratos "tratados", durante a lactação.

O exame do gráfico resultante da projeção dos logarítmos do peso das glândulas submandibulares, em função do peso corpóreo dos animais "tratados" (Figura 7), mostra que a interfase ocorre na altura do valor 4,06 do eixo das abcissas, o que corresponde ao peso médio de 10,6g, isto é, em torno do 9º dia de vida extra-uterina. Assim, na comparação entre os animais "tratados" e "controles", observa-se um atraso da época de modificação da taxa de crescimento. A tabela 4 mostra que a taxa de crescimento das glândulas submandibulares dos animais do grupo "tratado", são diferentes em ambas as etapas. Os valores obtidos de "K" foram: 0,21 para a primeira etapa de crescimento e 1,30, para a segunda, mostrando diferença entre as duas etapas de desenvolvimento.

A comparação dos coeficientes de alometria e seus respectivos intervalos de confiança, feita por superposição das figuras 6 e 7 permite estabelecer que durante a primeira etapa de desenvolvimento, as taxas de crescimento podem ser consideradas semelhantes para os animais de ambos os grupos. Após a interfase, que tem lugar no 6º dia, para o grupo "controle" e no 9º dia para o grupo de animais "tratados", as taxas de crescimento passam a ser diferentes entre si, sendo maior para os animais do grupo "tratado".

VI. Resultados histológicos:

O exame histológico das glândulas salivares submandibulares, dos grupos de ratos "controles" e "tratados", ao longo do período estudado, revelou:

1. ratos com zero dia de vida pós-natal: A glândula se apresenta revestida por delgada cápsula fibrosa que emite septos dividindo-a em lóbulos. Há grande quantidade de tecido conjuntivo mucóide nos septos e entre as unidades secretoras (Figuras 8 e 9).

As unidades secretoras, que derivam de células da extremidade distal das formações tubulares, denominadas de túbulos terminais nesta idade, apresentam-se tamanhos variados, dotados de lumen estreito e são formadas por células piramidais com núcleos esféricos, com cromatina frouxa e nucléolo evidente. O citoplasma é granuloso, geralmente apresentando granulação fina e acidófila; em algumas células, entretanto, essa granulação apresenta-se grosseira, ba-

sófila e apical. Em alguns túbulos, geralmente os mais periféricos, nota-se o aparecimento de células globosas, dotadas de citoplasma claro, núcleo esférico e cromatina também frouxa. Estas células são denominadas células pró-acinosas. (Figura 10).

Os dutos são evidentes e é possível distinguir suas porções intercalar, intralobular e interlobular. Os primeiros estão na junção com os túbulos terminais e são pequenos, formados por células cúbicas com núcleo globoso. Os dutos intralobulares são formados por células cilíndricas, núcleos ovalados, basais ou subcentrais. Os dutos interlobulares apresentam-se mais calibrosos, lumen mais amplo e são formados por células cilíndricas com núcleos alongados e dispostos no terço médio (Figura 10).

Tanto nos túbulos terminais quanto, nos segmentos ductais são frequentes as figuras de mitose. (Figura 11).

A comparação entre as figuras 10 e 11, referentes a animais com zero dia de vida, sugere um atraso no desenvolvimento da glândula salivar do grupo "tratado".

2. Ratos com 3 dias de vida pós-natal:

a) Grupo "controle": a glândula apresenta-se mais desenvolvida, com aumento do número das unidades secretoras e maior compactação das mesmas dentro dos lóbulos (Figura 12). Os aspectos citológicos das unidades secretoras, aparentemente, são os mesmos se comparados ao grupo de zero dia (Figura 8). O número de células pró-acinosas é nitidamente maior na periferia dos túbulos terminais. (Figura 14).

Os dutos também se apresentam mais desenvolvidos e já se nota, principalmente nos interlobulares, evidente estriação basal. (Figura 18).

b) Grupo "tratado": o exame histológico das glândulas salivares deste lote de animais revela que há um atraso no desenvolvimento do órgão, representado pelo menor número de unidades secretoras dentro dos lóbulos e pela quantidade de tecido conjuntivo mucóide nos septos e entre os túbulos terminais (Figura 13). O sistema de dutos permanece igualmente pouco desenvolvido, embora os dutos interlobulares já exibam a estriação basal. Neste material as células pró-acinosas são bem mais evidentes. (Figura 15).

No geral, em relação ao grupo controle, o aspecto é de uma estrutura atrófica (Figura 13).

3. Ratos com 6 e 9 dias de vida pós-natal:

a) Grupo "controle": segue o desenvolvimento normal do órgão, com aspectos histológicos compatíveis com as idades em foco (Figuras 16, 17, 18, 20 e 22).

b) Grupo "tratado": até o 9º dia de vida pós-natal há nítida defasagem no desenvolvimento da glândula submandibular neste grupo em relação ao grupo "controle". Após 6 dias, aparentemente, há um grande aumento das células pró-acinosas. (Figuras 19 e 23).

A partir de 12 dias de idade, as diferenças histológicas tornam-se progressivamente menos acentuadas, até que aos 15 dias de vida pós-natal tanto para o grupo "controle" quanto para o grupo "tratado" o quadro histológico evidente à microscopia óptica é, aparentemente, semelhante (Figuras 24 e 25). Aumenta a compactação dos lóbulos glandulares. As células pró-acinosas são vistas mais facilmente ao redor dos túbulos terminais, aparecendo individualmente ou formando pequenos crescentes; embora pálidas, seu citoplasma mostra pequenas granulações. Às vezes, os túbulos terminais aparecem como centros em meio às células pró-acinosas. Os dutos intercalares agora estão bem definidos e continuam-se com os dutos estriados intralobulares que por sua vez continuam-se nos dutos interlobulares. As figuras de mitose são frequentes nas células pró-acinosas e ocasionalmente nos dutos.

Nos estágios finais do tempo proposto para esta estudo (3 a 4 semanas), persiste a igualdade nos aspectos histológicos em ambos os grupos experimentais. Os ácinos e túbulos terminais com crescente predominam, ultrapassando em número os dutos estriados. Por sua vez, ácinos, crescentes e células pró-acinosas também ultrapassam os remanescentes dos túbulos terminais, também chamados centros.

TABELA 1- Efeito da vitamina "E" em altas doses. Média, com seus respectivos desvios padrão, dos pesos, corporal e glandular, medidos em gramas, dos ratos dos grupos "Controle" e "Tratado".

Dias /	"Controle"		"Tratado"	
de /				
vida /				
	peso corporal	peso glandular	peso corporal	peso glandular
00	4,3 ± 0,274	14,1 ± 0,510	4,2 ± 0,270	13,9 ± 0,460
03	6,6 ± 0,271	16,1 ± 0,460	5,7 ± 0,274	14,8 ± 0,607
06	10,4 ± 1,140	17,9 ± 0,687	9,0 ± 0,791	15,5 ± 0,404
09	15,4 ± 0,548	20,6 ± 2,918	12,5 ± 0,791	16,8 ± 0,554
12	19,2 ± 1,037	24,0 ± 0,515	15,8 ± 0,570	17,0 ± 0,608
15	23,4 ± 0,894	28,7 ± 0,850	18,5 ± 0,500	22,5 ± 0,608
18	26,0 ± 0,612	32,1 ± 0,760	22,2 ± 1,804	26,0 ± 0,539
21	34,0 ± 0,707	51,9 ± 1,026	26,8 ± 1,304	38,0 ± 0,632
24	40,7 ± 0,988	60,0 ± 0,696	33,5 ± 1,768	56,2 ± 0,667
27	50,0 ± 0,061	78,3 ± 1,604	42,9 ± 1,084	72,2 ± 0,284
30	56,1 ± 2,356	88,8 ± 1,273	49,0 ± 2,356	84,3 ± 1,625

Obs. Peso glandular = peso da glândula X 1000

TABELA 2- Efeito da vitamina "E" em altas doses. Comparação entre os grupos "Controle" e "Tratado", dos pesos corporal e glandular, efetuado através do teste "U" de Mann-Whitney.

Dias /	peso	peso	Dias /	peso	peso
de /	corporal	glandular	de /	corporal	glandular
vida /			vida /		
00	NS	NS	18	S	S
03	S	S	21	S	S
06	S	S	24	S	S
09	S	S	27	S	S
12	S	S	30	S	S
15	S	S			

NS = Não significante; S = Significante

p = 0,05

TABELA 3- Efeito da vitamina "E" em altas doses. Valor do X resultante da comparação entre os volumes nucleares das células acinosas da submandibular, dos grupos "controle" e "tratado", em idades diferentes. (Teste da mediana), $p=0,05$

Comparação	X	significância
Zero dia "C" X Zero dia "T"	19,23	S
10-9 dias "C" X 0-9 dias "T"	18,62	S
19-30 dias "C" X 9-30 dias "T"	0,12	NS
"C"-controle	S - significativa	
"T"-tratado	NS- não significativa	

TABELA 4- Efeito da vitamina "E" em altas doses sobre o desenvolvimento da glândula submandibular. Valores dos coeficientes de alometria "K" e limites de seus respectivos intervalos de confiança.

Etapa do crescimento alométrico	Coeficiente de alometria	Intervalo de confiança Limites	
		máximo	mínimo
Primeira etapa "controle"	0,23958	0,26744	0,20618
Segunda etapa "controle"	1,18088	1,23158	1,13158
Primeira etapa "tratado"	0,20649	0,24723	0,17335
Segunda etapa "tratado"	1,29651	1,34391	1,24951

—•— Média do peso corporal do animal controle
 - - - • - Média do peso corporal do animal tratado

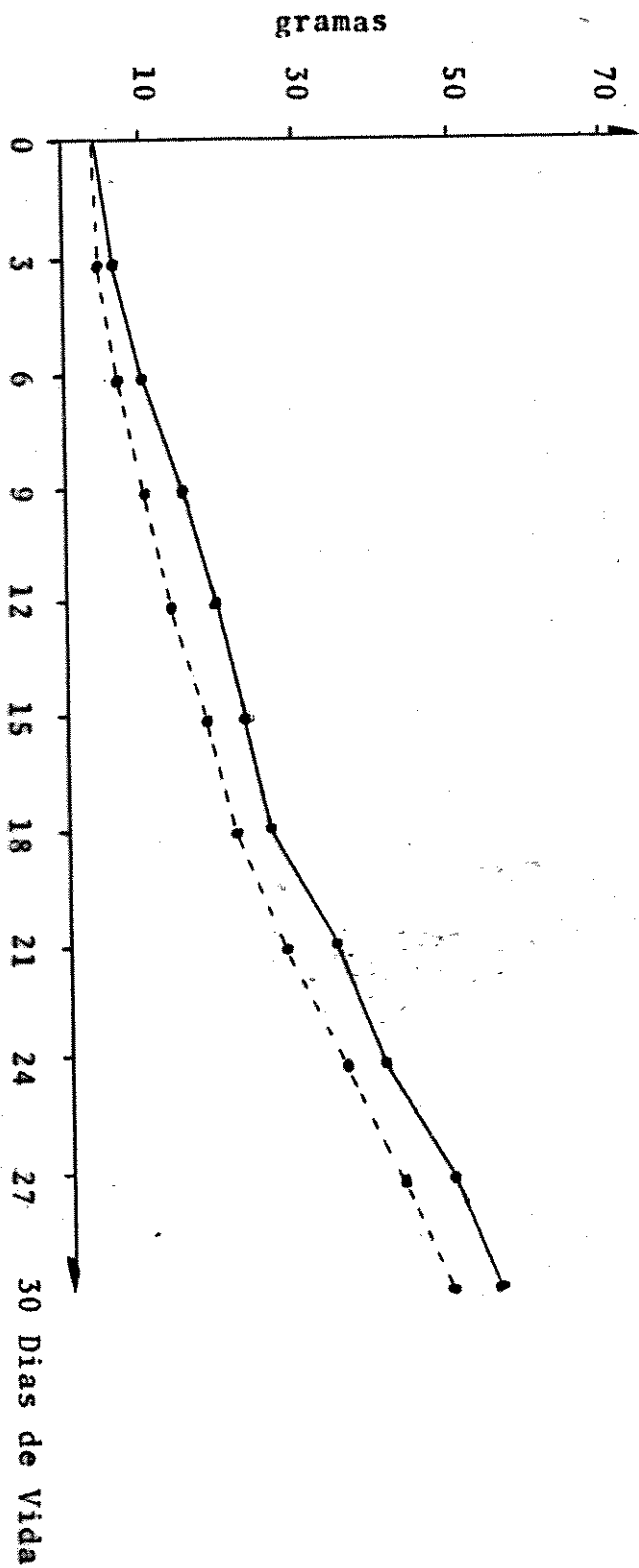


Fig. 1 - Projeção das médias dos valores absolutos dos pesos corporais dos animais submetidos a alta dose de vitamina "E" e dos animais controles em função da idade, em dias de vida pós natal.

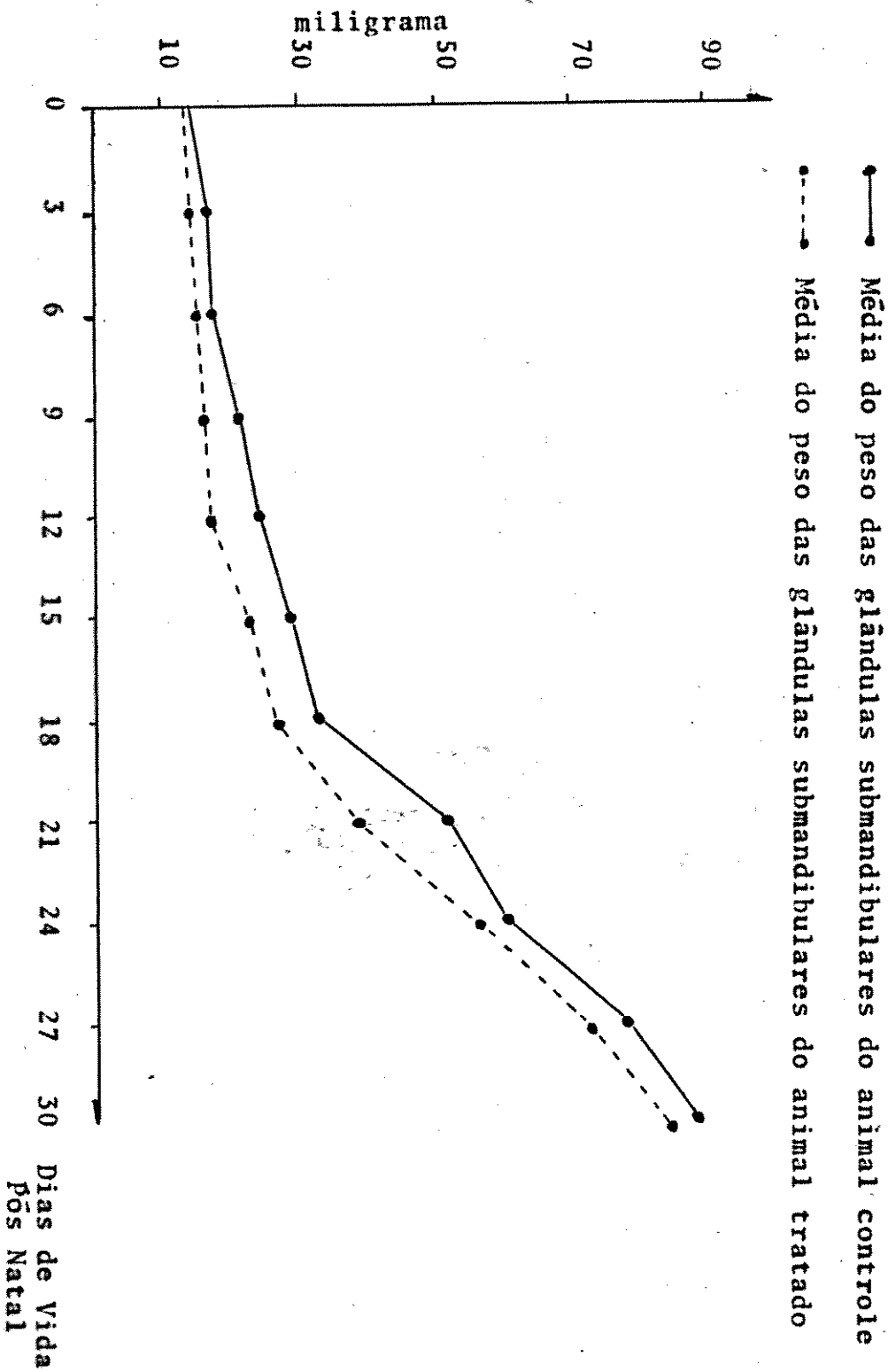


Fig. 2 - Projecção das médias do peso das glândulas submandibulares (mg) dos animais submetidos a alta dose de vitamina "E" e nos animais controles em função da idade, em dias de vida pós-natal.

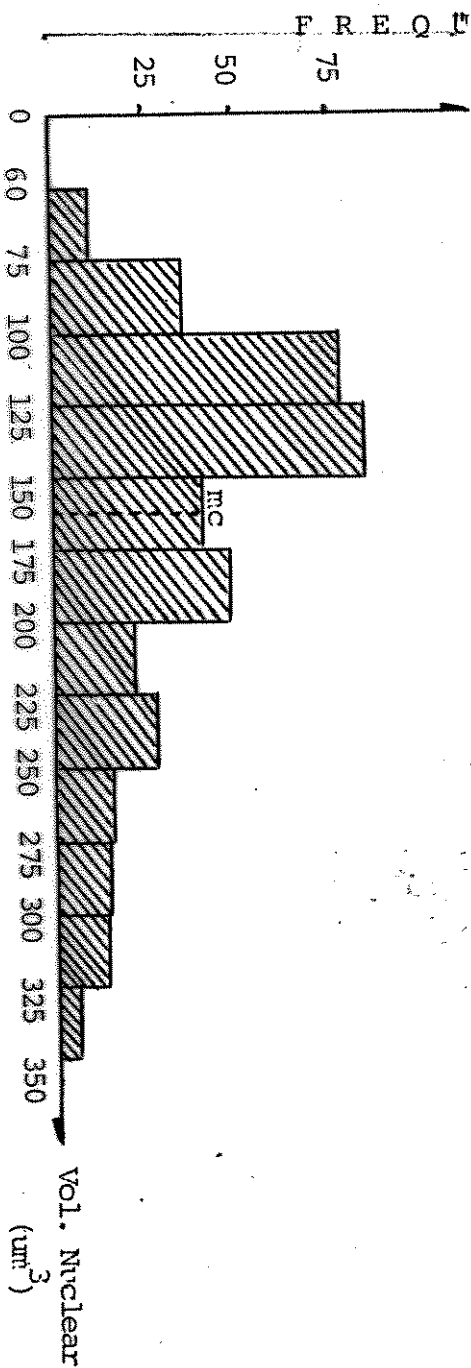
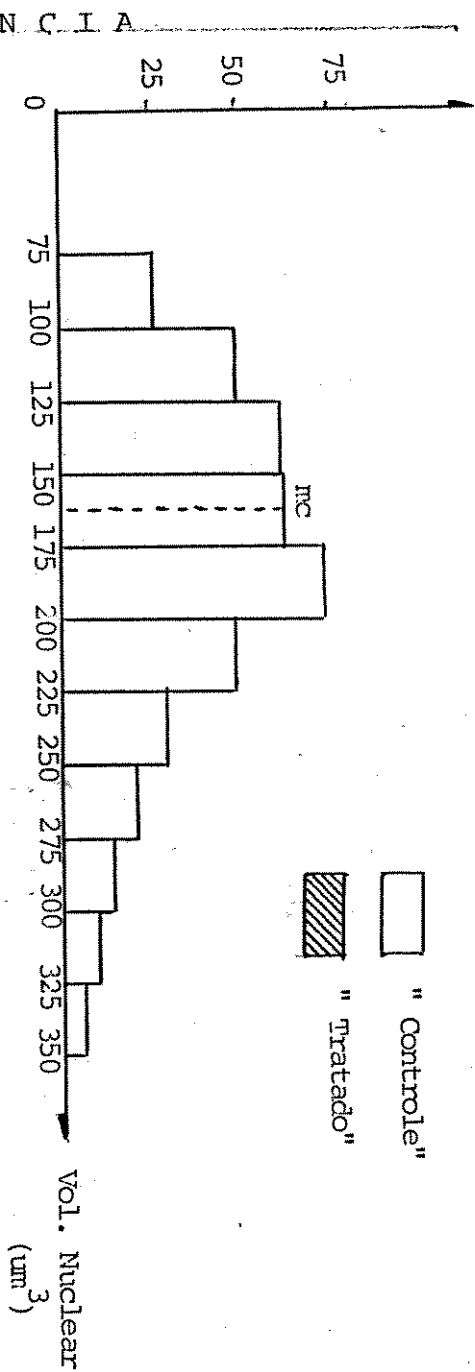


Fig. 3 - Volume nuclear das células acinosas das glândulas submandibulares de ratos "controles" e "tratados" com vitamina "E", de zero a 9 dias de vida pós-natal.

Mc= mediana comum

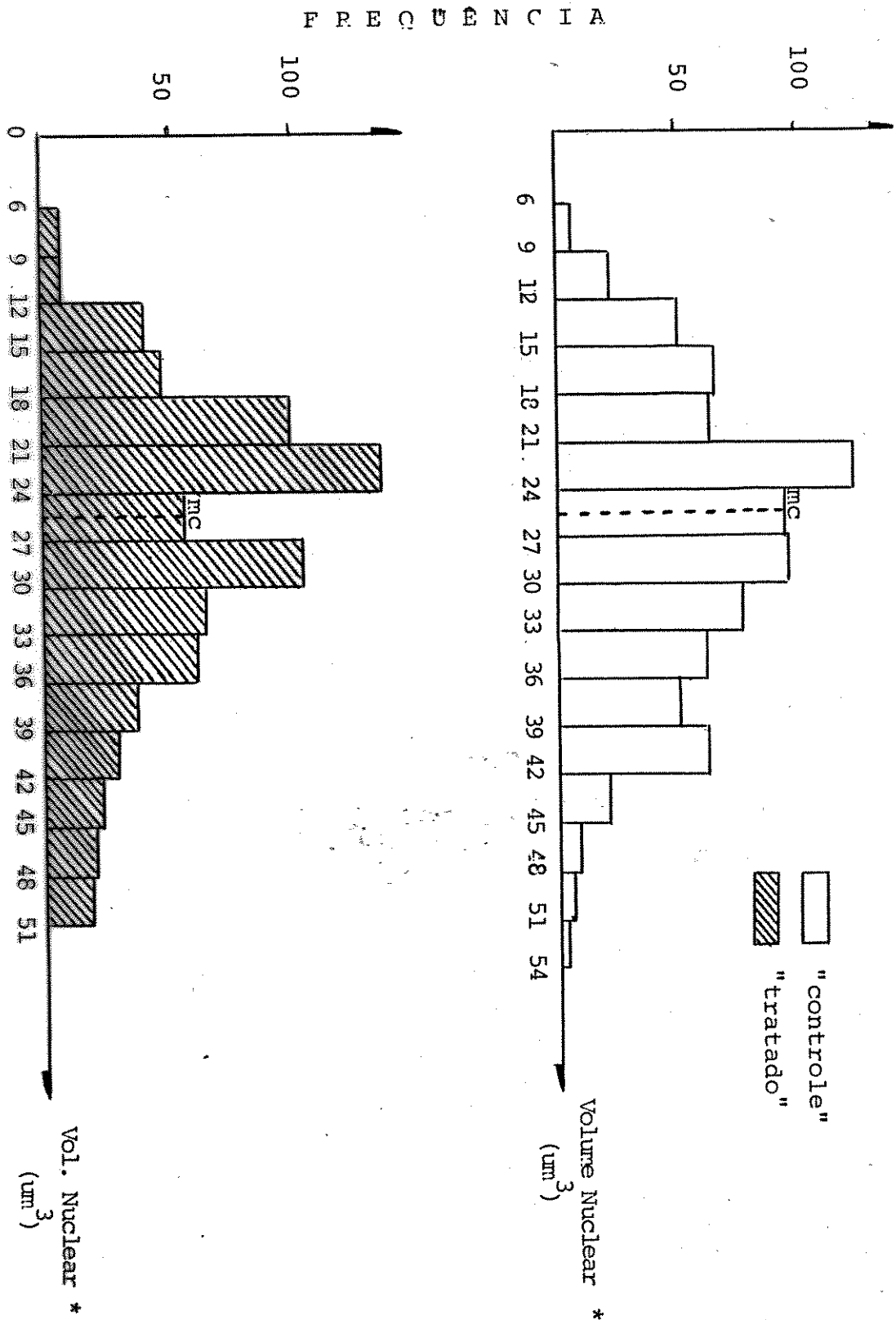
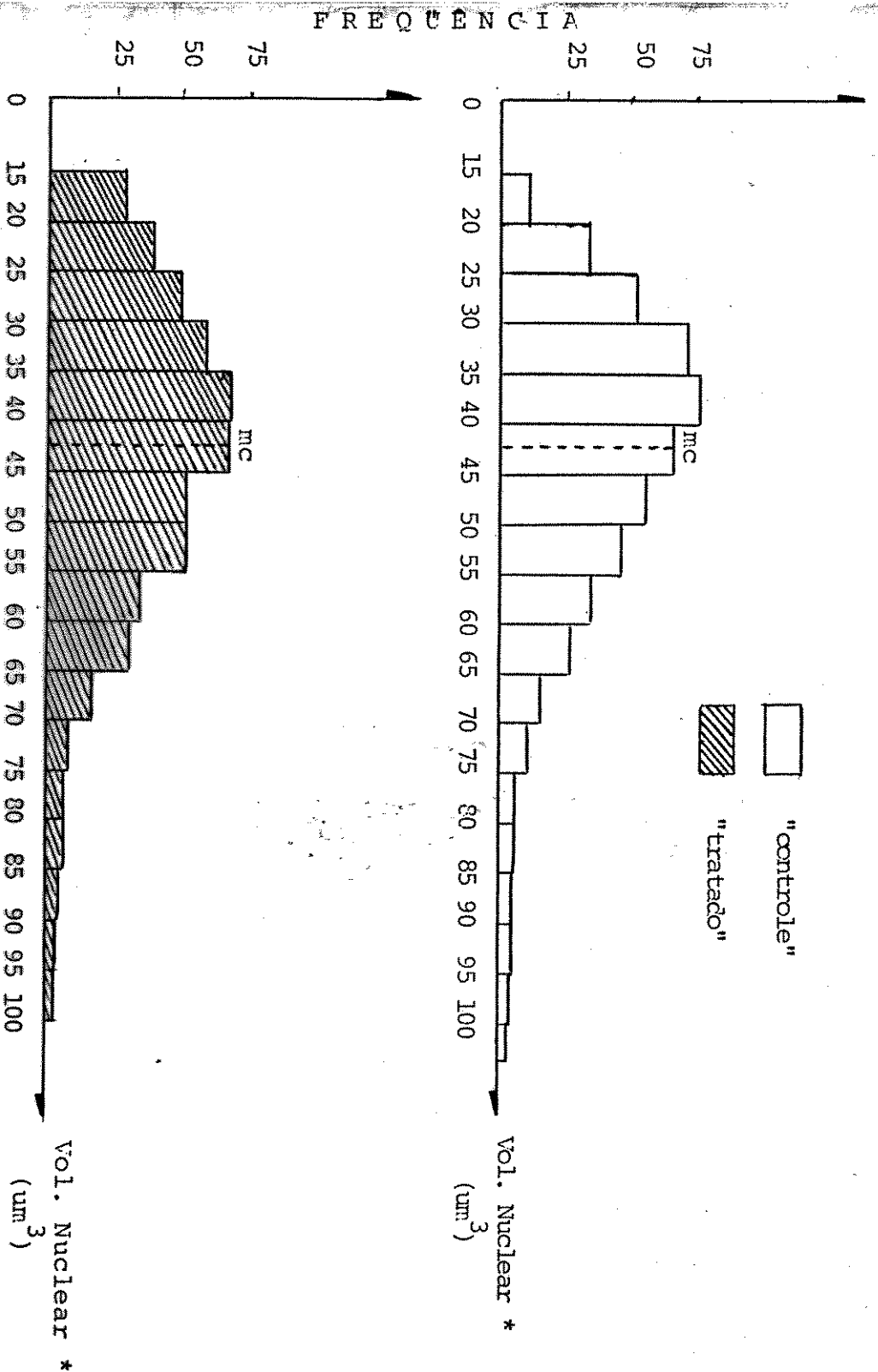
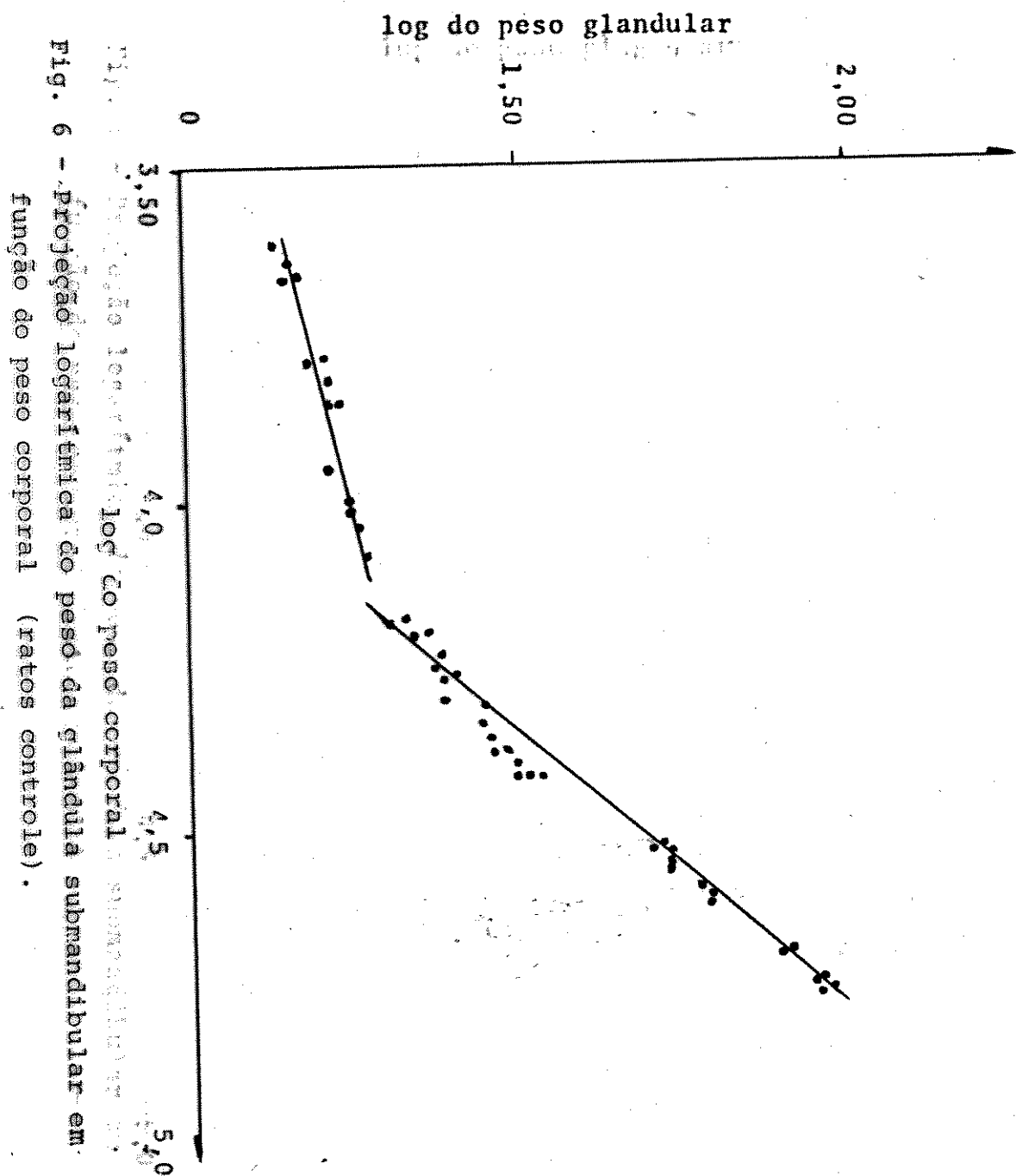


Fig. 4 - Volume nuclear das células acinosas das glândulas submandi-
bulares de ratos "controle" e "tratados" com vitamina "E"
de 9 a 30 dias de vida pós-natal.

* Vol. Nuclear X 10⁻³ - MC= mediana comum



* Volume nuclear * 10 Mc= mediana occur



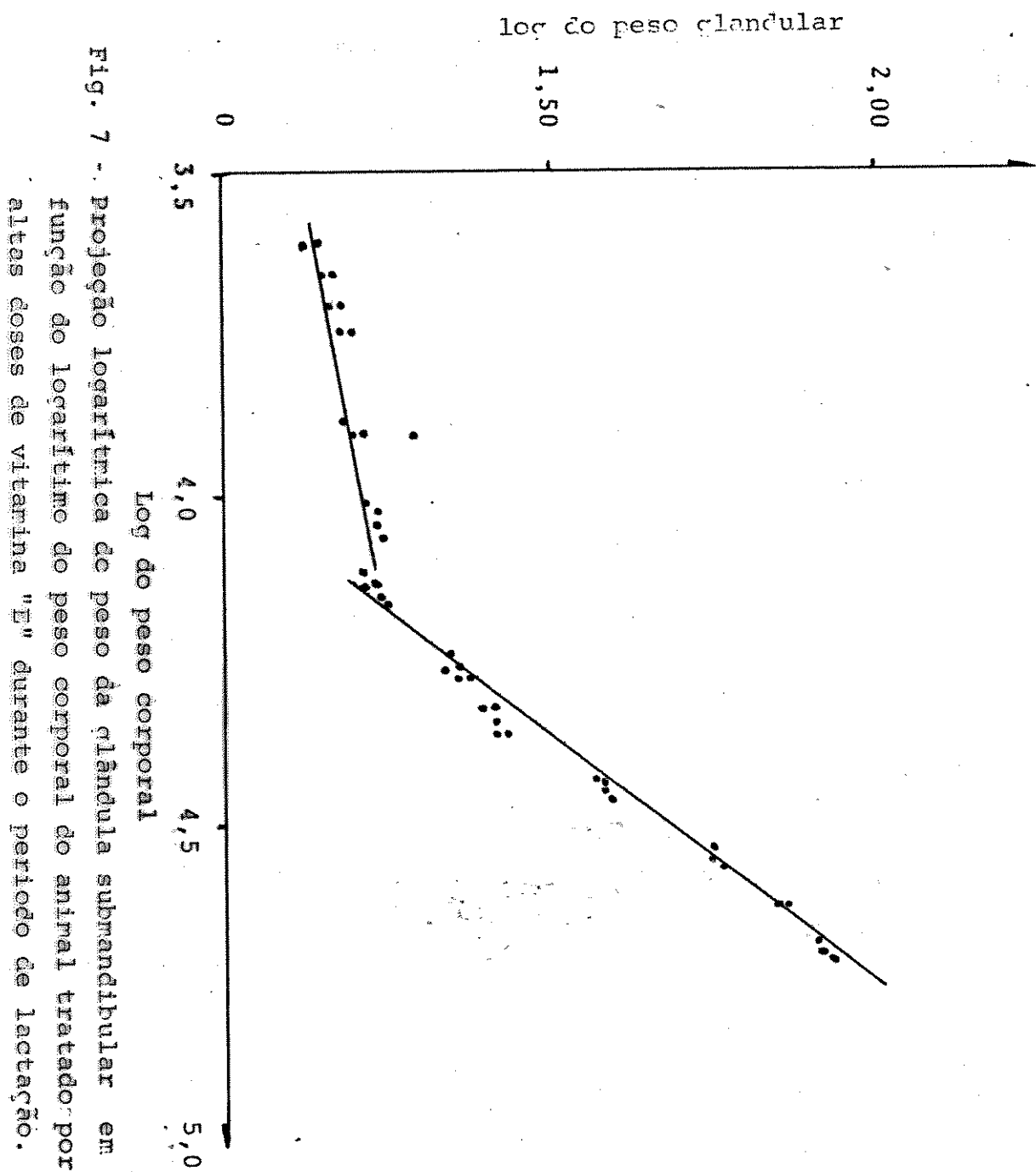


Figura- 08 Corte histológico de glândula submandibular de rato, recém-nascido (zero dia de vida pós-natal). Tricrômio de Masson - 30x. "Controle". Lóbulos glandulares separados por tecido conjuntivo. Túbulos terminais. Dutos intra e interlobulares.

Figura- 09: Corte histológico de glândula submandibular de rato recém-nascido (zero dia de vida pós-natal). Tricrômio de Masson - 30x. "Tratado". Lóbulos glandulares e túbulos terminais separados por maior quantidade de tecido conjuntivo. Estrutura, aparentemente, com menor número de unidades secretoras.

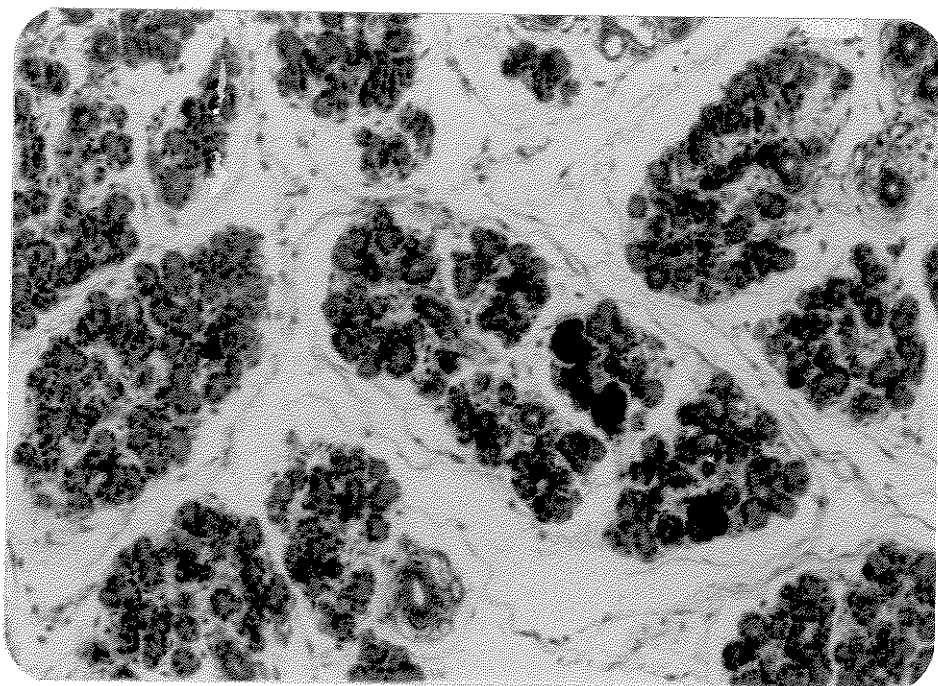


Figura- 05

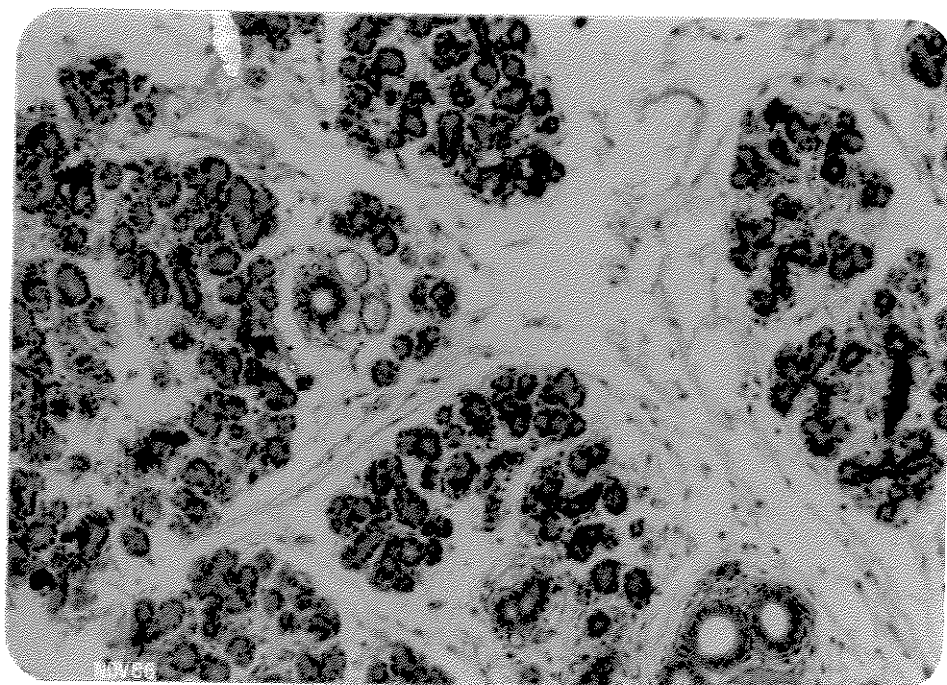


Figura- 09

Figura- 10: Corte histológico de glândula submandibular de rato, recém-nascido (zero dia de vida pós-natal). Tricrômio de Masson - 300x "Controle". Lóbulos glandulares separados por tecido conjuntivo. Túbulos terminais com tamanhos variados; células com grânulos apicais basófilos. Dutos intra e extra-lobulares

Figura- 11: Corte histológico de glândula submandibular de rato, recém-nascido (zero dia de vida pós-natal). Tricrômio de Masson - 300x "Tratado". Lóbulos glandulares separados por tecido conjuntivo. Túbulos terminais com figuras de mitose (seta).

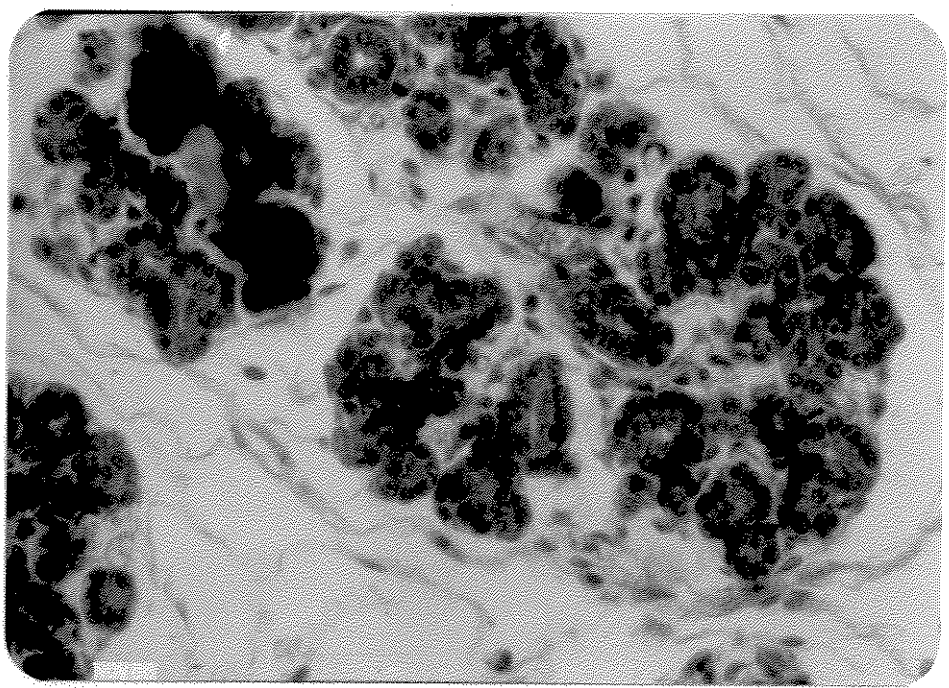


Figura- 10

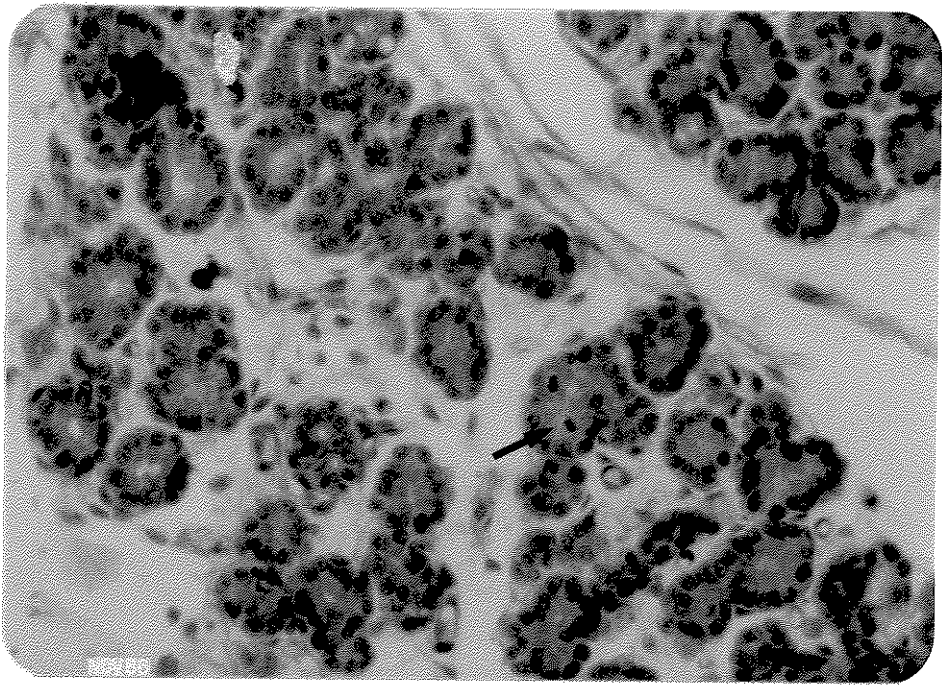


Figura- 11

Figura- 12: Corte histológico de glândula submandibular de rato, 3 dias de vida pós-natal. Tricrômio de Masson - 30x. "Controle". Maior número de unidades secretoras no interior dos lóbulos.

Figura- 13: Corte histológico de glândula submandibular de rato, 3 dias de vida pós-natal. Tricrômio de Masson - 30x. "Tratado". Túbulos terminais em menor quantidade no interior dos lóbulos. Aumento aparente do tecido conjuntivo. Aspecto de atrofia.

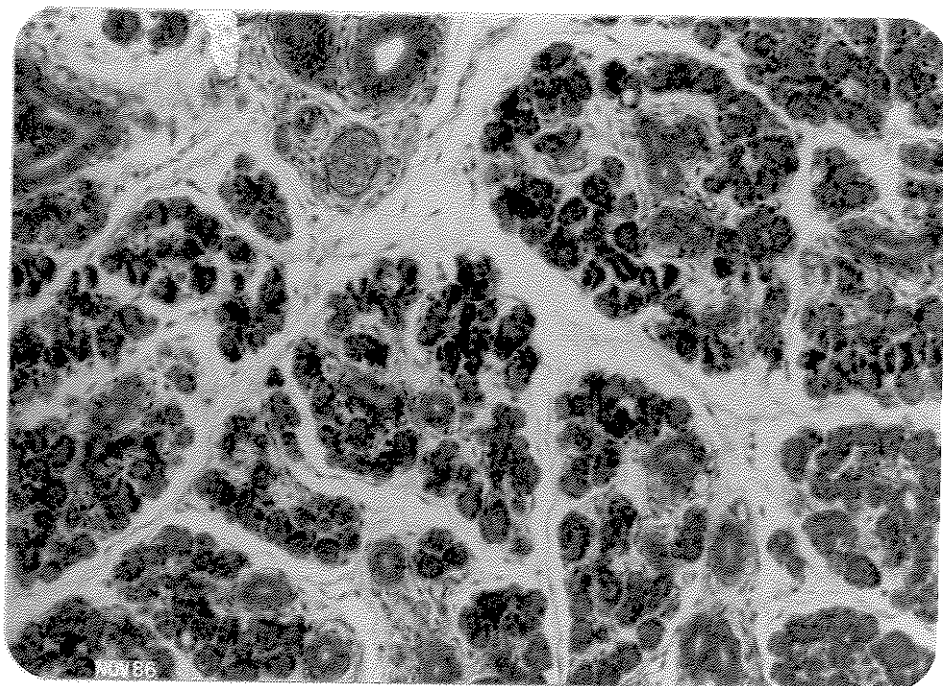


Figura- 12

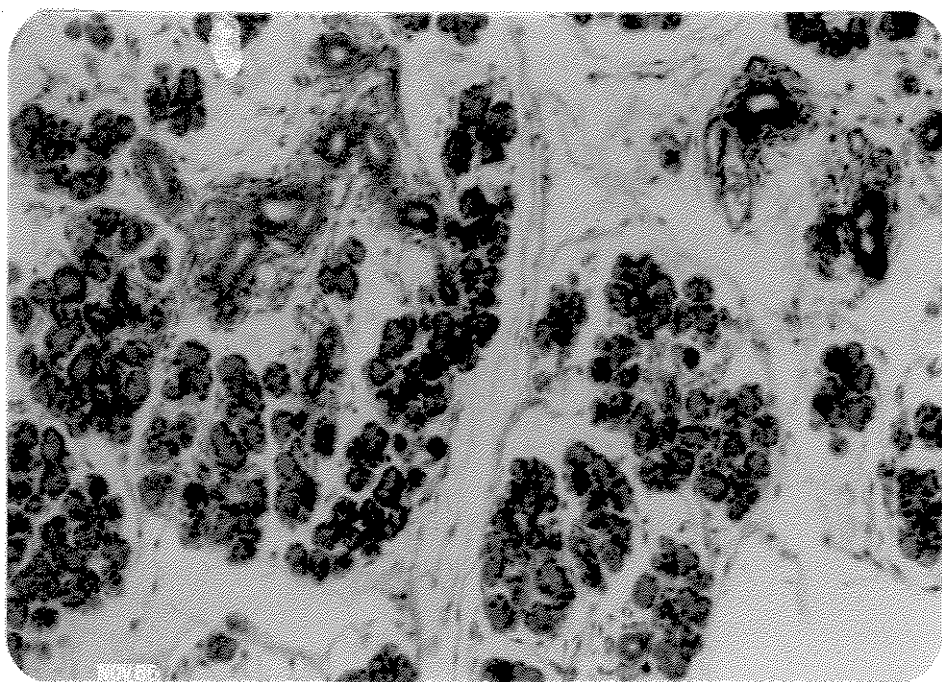


Figura- 13

Figura- 14: Corte histológico de glândula submandibular de rato, 3 dias de vida pós-natal. Tricrômio de Masson - 300x. "Controle". Duto intercalar (seta maior); células pró-acinosas (seta menor).

Figura- 15: Corte histológico de glândula submandibular de rato, 3 dias de vida pós-natal. Tricrômio de Masson - 300x. "Tratado". Aumento aparente de tecido conjuntivo entre os lóbulos glandulares. Células pró-acinosas (seta).

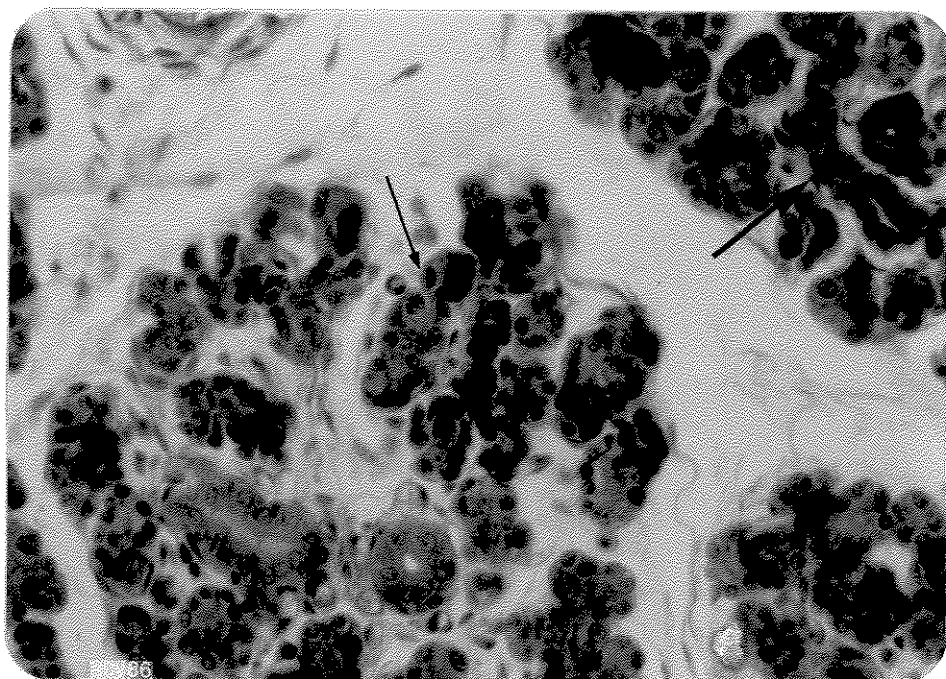


Figura- 14

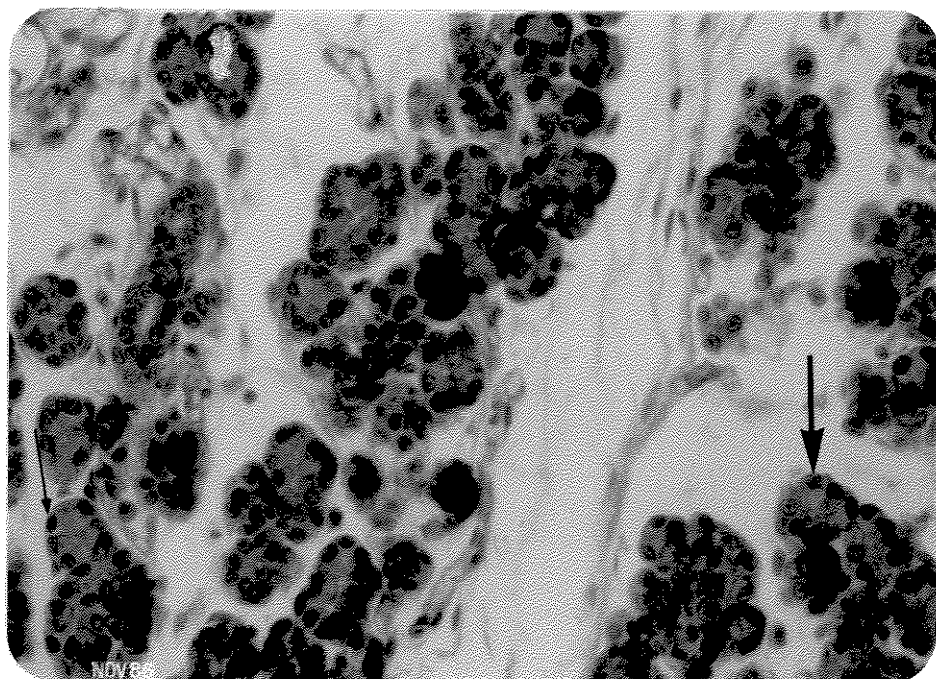


Figura- 15

Figura- 16: Corte histológico de glândula submandibular de rato, 6 dias de vida pós-natal. Tricrômio de Masson - 30x. "Controle". Maior desenvolvimento de unidades secretoras.

Figura- 17: Corte histológico de glândula submandibular de rato, 6 dias de vida pós-natal. Tricrômio de Masson - 30x. "Tratado". Material ainda exibindo atraso no desenvolvimento. Figura semelhante ao "controle" com 3 dias de vida pós-natal.

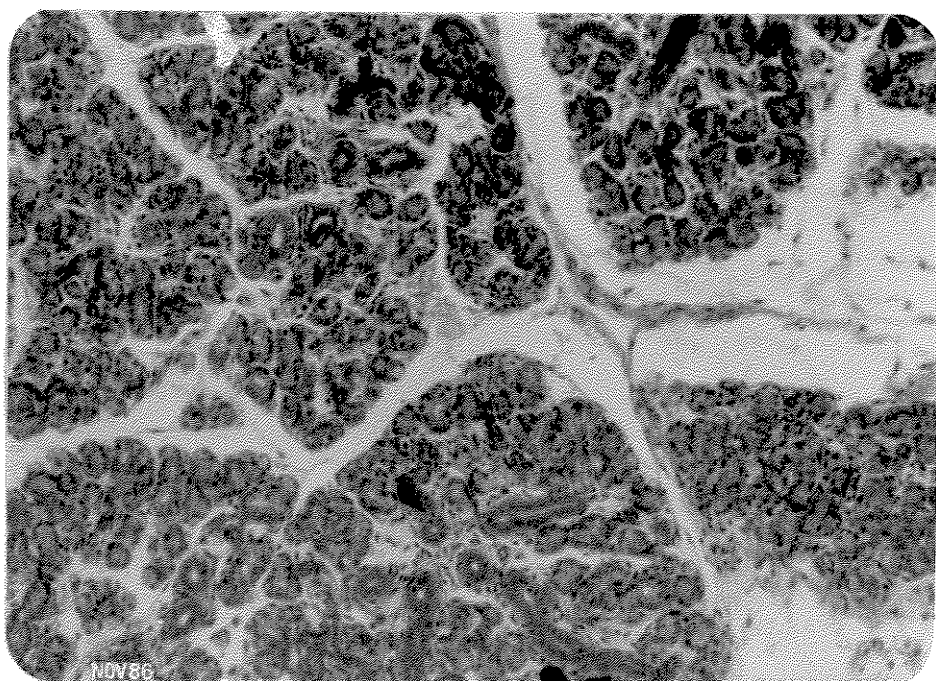


Figura- 16

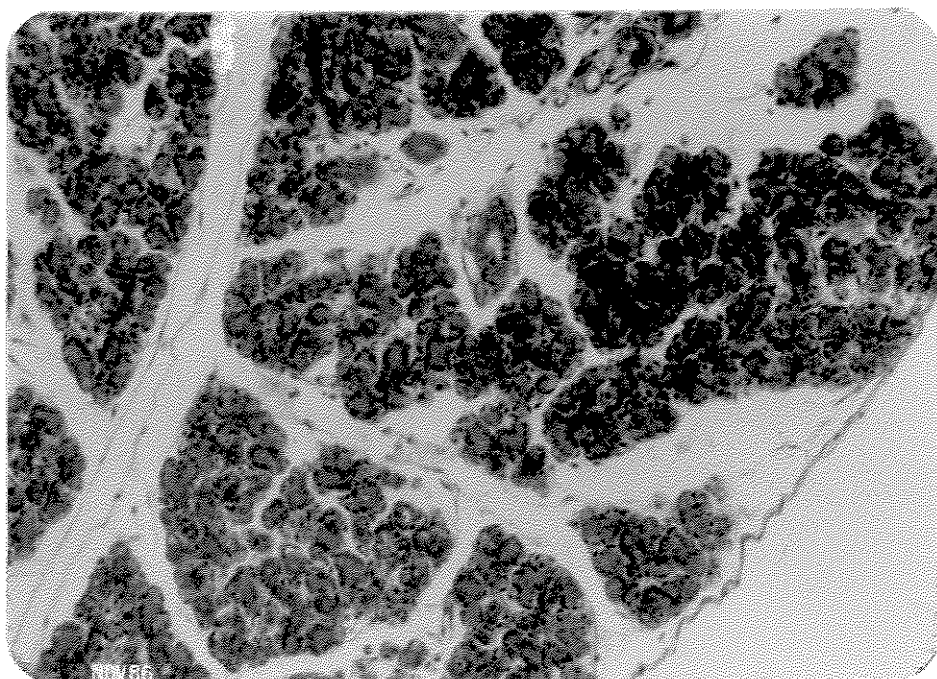


Figura- 17

Figura- 18: Corte histológico de glândula submandibular de rato, 6 dias de vida pós-natal. Tricrômio de Masson - 300x. "Controle". Dutos glandulares intralobulares com lumen amplo, presença de estriação basal (seta).

Figura- 19: Corte histológico de glândula submandibular de rato, 6 dias de vida pós-natal. Tricrômio de Masson - 300x. "Tratado". Número menor de unidades secretoras diferenciadas. Grande número de células pró-acinosas com granulação citoplasmática fina e basófila.

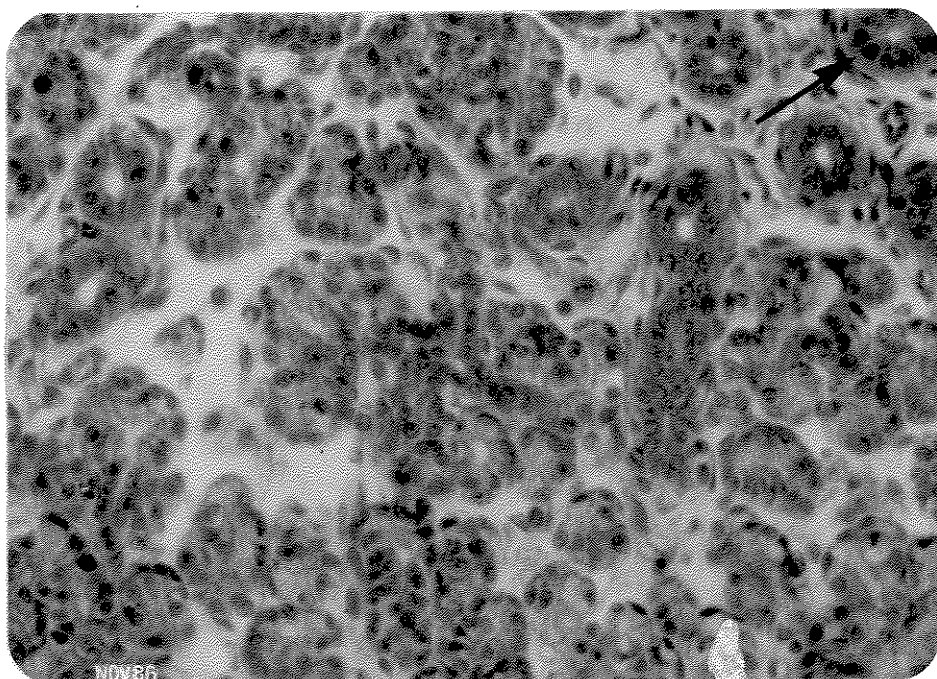


Figura- 18

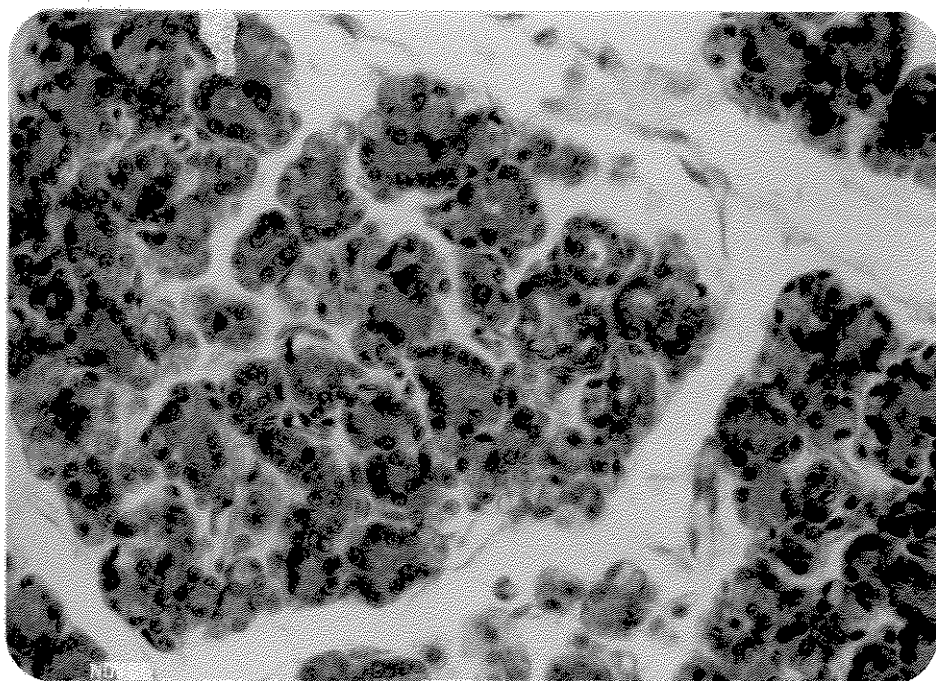


Figura- 19

Figura- 20: Corte histológico de glândula submandibular de rato, 9 dias de vida pós-natal. Tricrômio de Masson - 30x. "Controle". A diferença na quantidade de unidades secretoras não é tão nítida como nas figuras anteriores.

Figura- 21: Corte histológico de glândula submandibular de rato, 9 dias de vida pós-natal. Tricrômio de Masson - 30x. "Tratado". Defasagem no desenvolvimento, pouco aparente.

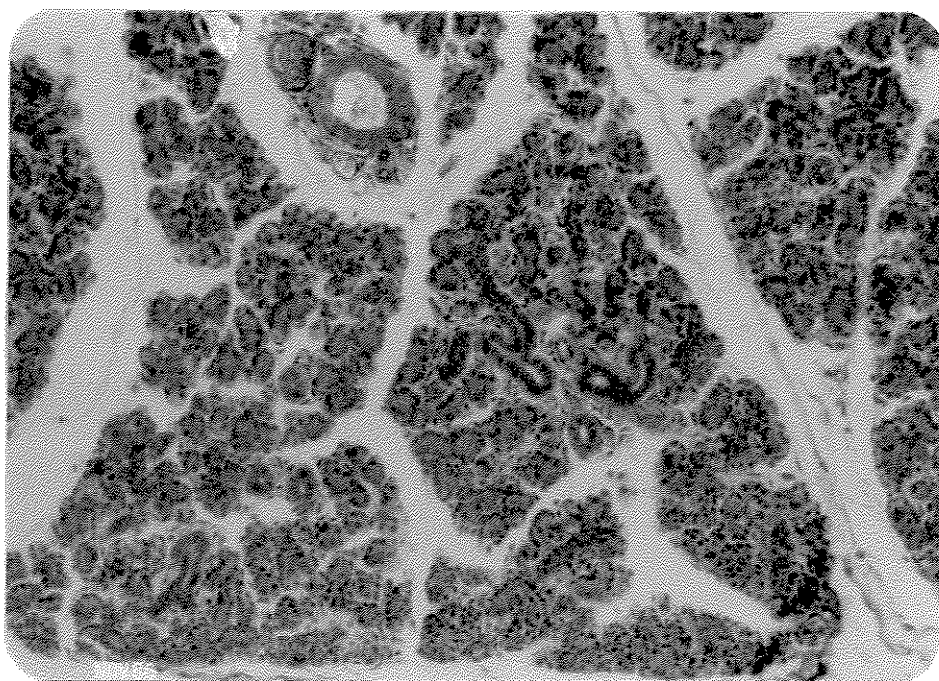


Figura- 20

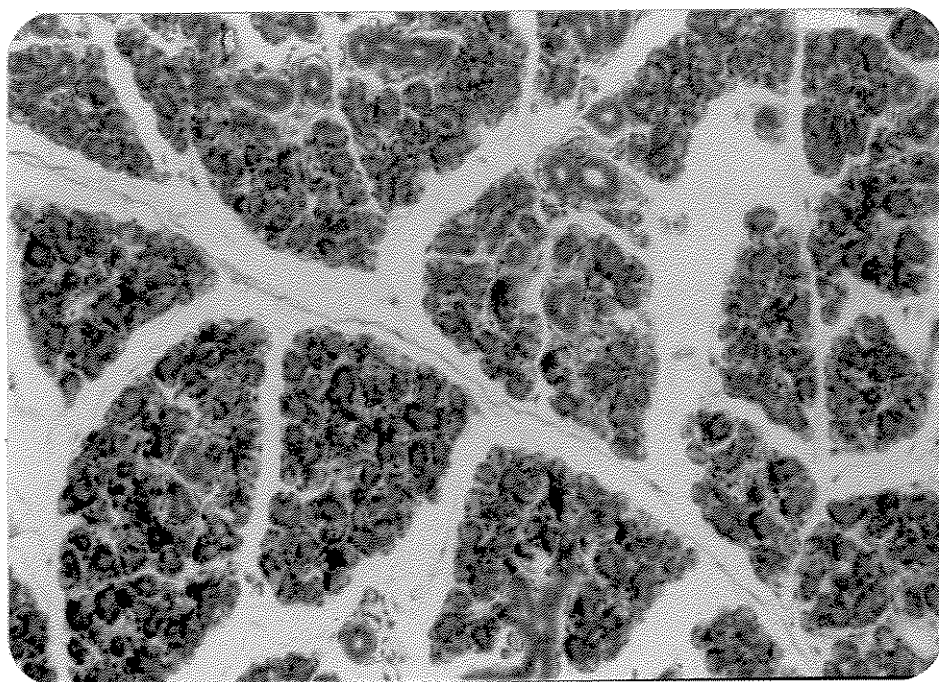


Figura- 21

Figura- 22: Corte histológico de glândula submandibular de rato, 9 dias de vida pós-natal. Tricrômio de Masson - 300x. "Controle". Diferenciação glandular compatível com a idade.

Figura- 23: Corte histológico de glândula submandibular de rato, 9 dias de vida pós-natal. Tricrômio de Masson - 300x. "Tratado". Em algumas unidades secretoras, túbulos terminais estão envolvidos por células acinosas (seta).

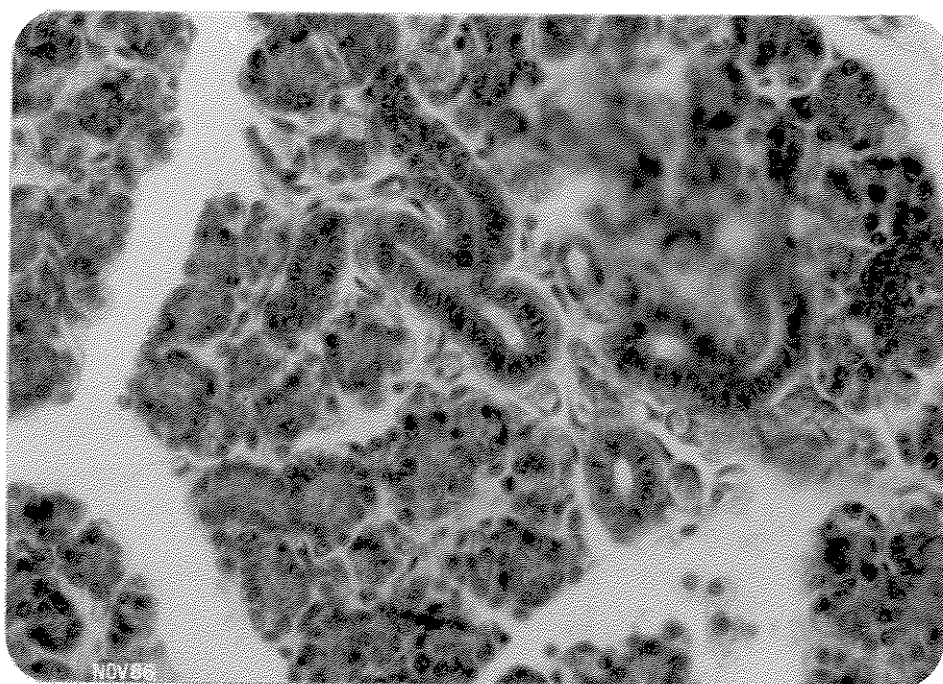


Figura- 22



Figura- 23

Figuras- 24 ("controle") e 25 ("tratado"): Corte histológico de glândula submandibular de rato, 15 dias de vida pós-natal. Tricrômio de Masson - 30x. Aparente igualdade na diferenciação.

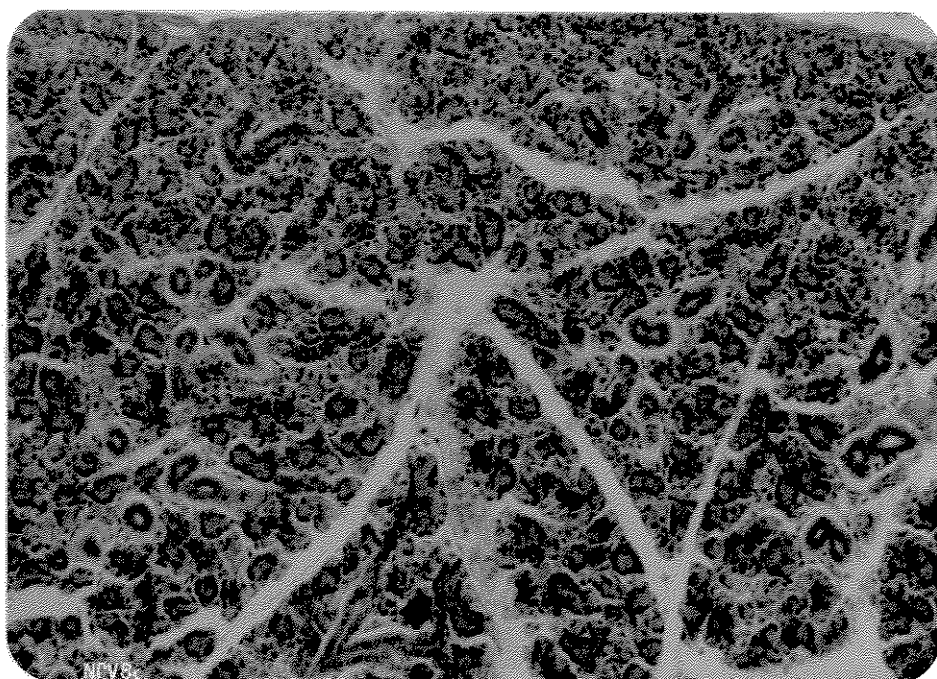


Figura- 24

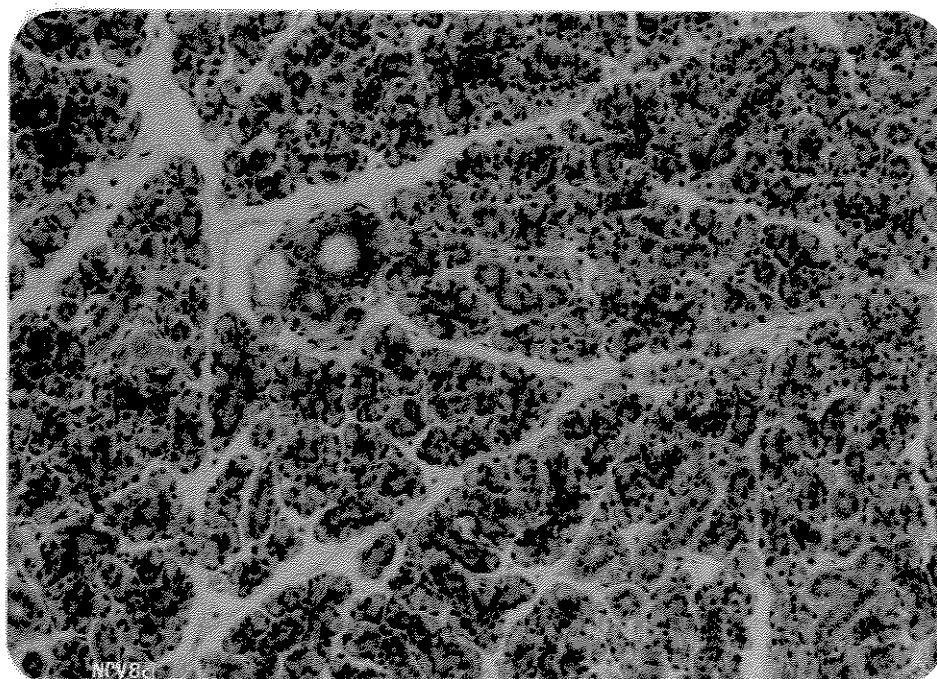


Figura- 25

DISCUSSÃO

Embora seja amplamente questionada a passagem de vitamina "E", através da placenta, admite-se que a mesma seja facilmente transferível ao leite, como normalmente acontece com as vitaminas lipossolúveis (DANN, 1932, 1936; McCOLLUM et alii, 1977). Essa propriedade facilita sua administração à animais lactentes, pois devido a ela a administração pode ser efetuada através da mãe, evitando-se, dessa forma, possível "stress" provocado pelo manuseio da prole, o que poderia acarretar resultados inesperados.

Inúmeros trabalhos alusivos à passagem da vitamina "E" para o leite são encontrados na literatura.

MASON & BRYAN (1938, 1940), estudando a transferência de vitamina "E" pela glândula mamária de ratos, constataram que, nas progênie de mães que receberam altas doses dessa vitamina, o armazenamento da vitamina "E" nos tecidos dos órgãos da prole, era três vezes maior que o normal, após as primeiras 48 horas de vida pós-natal. A própria glândula mamária, para esses autores, representa uma fonte de vitamina "E" concentrada. PARRISH et alii (1950), verificaram, em bezerras cujas mães receberam de 4 a 10g da vitamina "E" no último mês de gestação, que o conteúdo de alfa-tocoferol encontrado nos seus tecidos, era de 6 a 9 vezes maior que o do "controle", no 2º dia de vida. Além desses autores, WHITING & LODSLI (1948), trabalhando com carneiros, cabras e porcos, demonstraram a presença de vitamina "E" no colostro desses animais em concentração 3 a 4 vezes maior que o leite desses mesmos animais, obtido 4 dias mais tarde. O mesmo foi verificado por PARRISH et alii (1950), com relação aos

bovinos.

Os dados de MASON & BRYAN (1938,, 1940) e de PARRISH *et alii* (1950), sugerem que as alterações provavelmente provocadas pelo excesso de vitamina "E", se iniciem na época em que há maior concentração da mesma, no organismo.

No presente trabalho procurou-se estudar a ação da vitamina "E" (alfa-tocoferol), quando administrada em grandes doses, sobre o desenvolvimento da glândula salivar submandibular, tanto no período pré-natal, representado pelas observações efetuadas no dia do nascimento, quanto no período lactacional. Sempre que necessário, o peso da glândula salivar submandibular foi relacionado com o peso corporal.

A primeira preocupação, neste trabalho, foi a verificação de possível efeito teratogênico da vitamina "E", em altas doses. Para tanto, foi efetuado o exame físico dos ratos de todas as ninhadas ao nascimento, tanto do grupo "tratado", quanto do grupo "controle". O resultado deste exame não mostrou qualquer anormalidade que evidenciasse possível efeito teratogênico da vitamina "E", na dose utilizada no tratamento e dentro do período estudado. Tal observação, confirma a constatação de PARRISH *et alii* (1950), SATO (1973 b) e MARTIN & HURLEY (1977), sobre a baixa toxicidade do tocoferol.

A partir do 3º dia de vida pós-natal e durante todo o período estudado, as comparações entre os grupos experimentais, tanto do peso corporal quanto do peso glandular, mostraram diferenças estatisticamente significantes. Desse modo, tanto o peso corporal quanto o peso da glândula salivar submandibular, foi sempre menor no grupo "tratado", do que no "controle". Estes resultados sugere-

rem um atraso no desenvolvimento corporal e glandular, possivelmente provocado pelas altas doses de vitamina "E". O mesmo foi observado por MARCH *et alii* (1973), em frangos que, receberam ração alimentar suplementada com vitamina "E", na proporção de 2200 UI/Kg de ração, os quais também apresentaram menor ganho de peso corporal.

Os resultados sobre o ganho de peso em ambos os grupos experimentais, estabelecidos neste trabalho, estão em concordância, também, com os dados de MARTIN & HURLEY (1977), obtidos em ratos, onde relataram que embora a sobrevivência dos animais, cujas mães receberam 500mg/dia de alfa-tocoferol, durante a gestação e lactação, não tenha sido afetada, o ganho de peso das proles foi menos evidente que o do grupo "controle".

A análise comparativa entre o peso corporal e o glandular, dos grupos "tratado" e "controle", efetuada através do teste "U" de MANN-WHITNEY, à época do parto, demonstrou não haver diferença significativa entre os grupos comparados, corroborando, dessa forma, com autores que questionam, ou não admitem a passagem de vitamina "E" pela barreira placentária (MASON & BRYAN, 1940; STRAUMFJORD & QUAIFFE, 1946; PARRISH *et alii*, 1950; GERLOCZY *et alii*, 1951; MARTIN & HURLEY, 1977).

Por outro lado, a comparação entre os resultados obtidos através da cariometria das células acinosas, revela diminuição do volume nuclear das células do grupo "tratado", em relação ao "controle" ($X=19,23$), desde os recém-nascidos até o 9º dia de vida pós-natal. Este resultado decorre, aparentemente, da ação do alfa-tocoferol em altas doses, sugerindo que, pelo menos parte dos órgãos do feto, sofra a ação da vitamina "E", durante o desenvolvimento fetal.

Esta ação, se for tomada em consideração a barreira placentária que impediria a passagem da vitamina "E", deve se realizar à distância, por meio de fatores ainda desconhecidos. BARNES & BROWN (1944), no entanto, aceitam a transferência de vitamina "E" para o feto. GERLOCZY et alii (1951), embora admitam a seletividade da barreira placentária para com a vitamina "E", concordam que a metodologia por eles empregada poderia não ser a ideal, além de que, fatores nutricionais e sazonais, poderiam ter interferido nos resultados por eles obtidos. Com base na observação de alterações nucleares irreversíveis verificadas nos testículos de ratos deficientes em vitamina "E", MASON (1933, 1944) sugeriu que essa vitamina fosse essencial para a manutenção do estado físico-químico normal do núcleo, ou para algumas fases do metabolismo celular relacionadas com a síntese de cromatina. Neste caso, a principal alteração apontada pelo autor foi a liquefação da cromatina, o que não foi confirmado no presente trabalho, uma vez que os núcleos, aparentemente, tinham, aspectos normais.

Ainda com relação à cariometria, além da diferença no volume nuclear das células acinosas à época do parto, esta persiste até o 9º dia de vida pós-natal no grupo "tratado" em relação ao "controle" ($X=18,62$)), sendo que o volume dos núcleos das células estudadas no grupo "tratado", foram sempre menores. Assim, 56,25% dos núcleos das células acinosas dos animais do grupo "tratado" estão abaixo do valor da mediana comum a ambos os grupos, enquanto que no grupo "controle", apenas 40,75% é inferior ao mesmo valor. A partir do 9º até o 30º dia de vida pós-natal as diferenças não foram estatisticamente significantes ($X=0,12$). Esses resultados sugerem

que ocorra retardamento no desenvolvimento das células acinosas da glândula submandibular do rato, possivelmente por ação da vitamina "E". Tal atraso se inicia, provavelmente, na vida intrauterina, uma vez que os resultados obtidos através da cariometria das células acinosas de animais recém-nascidos do grupo "tratado", já mostram diminuição do volume nuclear, conforme foi discutido acima.

Por outro lado, a cariometria não revelou nenhuma diferença quanto ao volume nuclear das células dos dutos estriados. Tal resultado sugere que a vitamina "E" não atue neste componente glandular. Admite-se que, tanto as células que revestem os dutos estriados, quanto as células acinosas, derivem embriologicamente, de células denominadas "secretoras", encontradas nos túbulos terminais que por sua vez se originam de ramificações da extremidade distal do duto formado pelo broto epitelial que origina a glândula (JACOBY & LEESON, 1959). A constatação da ausência de modificações no volume dos núcleos das células dos dutos estriados, do grupo "tratado", leva a crer que, possivelmente, o revestimento dos dutos estriados, seja constituído por elementos celulares de origem diferente daquele das células acinosas, ou talvez, por elementos celulares de origem semelhante, porém com potencialidade diferente.

Para melhor compreensão das diferenças encontradas, no que diz respeito ao peso do órgão, ao volume nuclear e ao peso corporal, efetuou-se estudo de crescimento alométrico entre a glândula salivar em apreço e o peso corporal. Os resultados do estudo do crescimento alométrico da glândula submandibular, de ambos os grupos experimentais, mostrou que apenas uma reta era insuficiente para representar o desenvolvimento do órgão. A observação do gráfico em que foram

projetados os logaritmos dos pesos da glândula salivar em estudo, em função do peso corporal, revelou a existência de duas etapas bem evidentes de crescimento glandular. Para os ratos do grupo "controle", a 1ª etapa compreende as idades de zero a 6 dias de vida pós-natal, inclusive, e para o grupo "tratado" esta etapa prolonga-se até o 9º dia, inclusive, havendo portanto, uma defasagem de 3 dias entre os dois grupos. Esse resultado corrobora outros já estabelecidos neste trabalho, reforçando a idéia de que, talvez a vitamina "E" provoque, por si mesma, ou indiretamente, um atraso na evolução da glândula submandibular. Essa primeira etapa caracterizou-se em ambos os grupos, por um crescimento glandular proporcionalmente menor que o crescimento corporal, portanto, com um coeficiente de alometria " K ", menor que 1, ($K < 1$). A segunda etapa, com início aos 9 ou 12 dias de vida pós-natal, respectivamente, para os grupos "controle" e "tratado", prolongou-se até o limite máximo de idade a que foi proposto este estudo. Durante esse período a glândula submandibular apresentou crescimento proporcionalmente maior em relação ao corpo ($K > 1$), em ambos os grupos.

Reforçando a idéia de que a vitamina "E" possa provocar um atraso no desenvolvimento da glândula submandibular, ALVARES & SESSO (1975), em estudo efetuado sobre a frequência dos tipos celulares encontrados na glândula submandibular de ratos durante a vida pós-natal, estabeleceram que é no 5º dia de vida extra-uterina que ocorre maior multiplicação das células acinosas. O 5º dia de vida pós-natal é, aproximadamente, o dia em que se dá a inflexão da reta alométrica do grupo "controle", deste trabalho. Este dado condiz com a idéia de possível retardamento no desenvolvimento da glândula sali-

var submandibular, dos animais do grupo "tratado", uma vez que o ponto de inflexão do crescimento alométrico, se encontra defasado em, aproximadamente, 3 dias, em relação ao grupo controle.

O estudo da relação ponderal entre a glândula submandibular e o corpo mostrou que na primeira etapa o coeficiente de alometria é 0,23958, demonstrando um crescimento glandular 4,17 vezes menor que o corporal, no grupo "controle". Para os ratos "tratados" o valor de K (coeficiente de alometria) é 0,20649, o que determina um desenvolvimento glandular 4,87 vezes menor que o do corpo e 13,8% menor que o desenvolvimento das glândulas submandibulares dos animais do grupo "controle". A comparação entre esses coeficientes mostrou que os mesmos são diferentes, havendo um crescimento menor da glândula submandibular do grupo "tratado", durante esse período. A segunda etapa mostrou-se diferente, em relação à anterior. O coeficiente de alometria é 1,18088 para o grupo "controle", com uma taxa de crescimento 1,18 vezes maior da glândula salivar submandibular, em relação ao crescimento corporal. No grupo "tratado" o coeficiente de alometria calculado foi de $K = 1,29651$; portanto, com uma taxa de crescimento da glândula em estudo de, aproximadamente, 1,3 vezes maior que o do corpo. A referida relação ponderal parece confirmar para o grupo "tratado", o atraso no desenvolvimento da glândula submandibular na etapa inicial e, depois, uma aceleração deste desenvolvimento na etapa seguinte, onde a glândula submandibular dos animais do grupo "tratado", cresce 9,8% a mais que as do grupo "controle". O início dessa aceleração coincide com a abertura dos olhos dos filhotes, época em que há mudança nos hábitos do mesmos, inclusive com relação aos alimentos, sugerindo que a possível ação do alfa-tocoferol seja reversível.

O exame microscópico das glândulas salivares submandibulares revelou que somente a partir de 12 dias de vida pós-natal, não há diferenças histológicas aparentes no material de ambos os grupos experimentais. Do zero ao 9º dia, de vida extra-uterina, entretanto, o grupo "tratado" exhibe um quadro de glândulas atróficas, aspecto que se traduz sempre pela menor compactação (hipocelularidade) dos elementos celulares no interior dos lóbulos glandulares. Esta hipocelularidade se traduz por maior quantidade de tecido conjuntivo nos septos e entre as células, e pela diferenciação algo tardia das estruturas ductais. Contudo, neste grupo e faixas etárias não se observou qualquer sinal aparente dos fenômenos degenerativos que levam à morte celular.

A aparente igualdade que se estabelece no material histológico dos dois grupos experimentais a partir de 12 dias de vida pós-natal, poderia ser explicada pela abertura dos olhos e erupção dos dentes incisivos dos filhotes, o que ocorre, aproximadamente, nessa idade. A partir dessa época, os animais começam a procurar e ingerir alimento sólido, o que faz baixar a ingestão láctea e por conseguinte a de vitamina "E".

BASTIANI & ZATTI (1952) estudando em ratos jovens, o efeito da hipervitaminose "E" sobre a cortical da adrenal e do timo, constataram aumento do peso relativo desses órgãos, entre 4 e 8 dias após o início do tratamento, porém, na sequência do mesmo, os pesos voltaram aos seus limites normais. O exame histológico realizado por essa época, não revelou alterações no timo; entretanto, a suprarrenal apresentou aumento da vascularização, alteração do limite entre as zonas glomerular e fasciculada, e diminuição dos grânulos suda-

nófilos desta última região. Esses sinais, por sua vez, desapareceram por completo, 24 dias após o início do mesmo.

CZYBA (1966), por sua vez, estudando o testículo de hamster dourado, detectou diminuição importante no volume do órgão, fenômeno que se instalou tão logo foi iniciada a administração de vitamina "E", com consequente parada da espermatogênese, na maioria dos túbulos seminíferos. Após um mês do início do tratamento esse quadro voltou à normalidade quanto ao aspecto histológico e funcional do órgão.

Na espécie humana HILLMAN (1957), constatou, após a ingestão de altas doses de vitamina "E", durante 93 dias, somente o aparecimento de uma creatinúria transitória, interpretada como manifestação precoce de um desvio metabólico induzido pelas doses excessivas de alfa-tocoferol. A avaliação efetuada através do eletrocardiograma, da função hepática, da coagulação sanguínea e da taxa de colesterol sérico mostrou normalidade desses quadros. Tsai et alii (1978), da mesma forma, não evidenciaram qualquer efeito benéfico ou não sobre as condições gerais de higiene de homens ou mulheres; constataram, no entanto, casos de redução significativa nos níveis séricos do hormônio tireoideano em ambos os sexos e elevação dos triglicérides séricos na mulher.

Deve se destacar ainda, a interferência da vitamina "E" sobre a função tireoideana. Os resultados dos pesos corporais e glandulares estabelecidos neste estudo, estão de acordo com as observações de SATO (1973b) que demonstrou haver, em ratos submetidos à hipervitaminose "E", uma redução no crescimento e diminuição do peso da tireóide. VALENTI & BOTTARELLI (1966) observaram uma dimi-

nuição da atividade tireoidiana de ratos em idênticas condições experimentais. CZYBA *et alii*. (1966) constataram em hamsters, também submetidos à hipervitaminose "E", uma estimulação transitória, seguida de depressão na atividade daquela glândula. MARCH *et alii* (1973) descreveram que a captação e liberação de I estavam diminuídas na tireóide de frangos, alimentados com grandes doses da vitamina em estudo. Na espécie humana, há uma redução significativa nos níveis de t3 e t4 séricos (TSAI *et alii*, 1978). Observados no aspecto global, esses fatos todos sugerem que grandes quantidades de vitamina "E" podem interferir com a função tireoidiana. Finalmente há a correlação funcional entre a glândula submandibular e os órgãos do sistema endócrino. Apesar da glândula salivar em questão estar funcionalmente ligada a todas as glândulas endócrinas, a conexão com a tireóide, neste caso, é a que merece maior consideração, uma vez que a vitamina "E" interfere com a função tireoidiana (GALLO-TORRES, 1972). A tireóide afeta a glândula submandibular e vice-versa (ARVY *et alii*, 1950; FLORES-VEAS, 1964; NUNEZ, 1970). HAMMETT (1923), demonstrou que há parada total no crescimento da glândula submandibular após a tireoidectomia, sem haver, no entanto, involução. Para o autor (HAMMETT, 1923), o crescimento da glândula salivar dependeria da atividade tireoidiana, porém a manutenção da mesma seria independente. LEBLOND & GRAD (1948), assinalaram diminuição do peso da glândula submandibular e atrofia dos túbulos serosos com parcial transformação dos mesmos em dutos excretórios, em ratos tireoidectomizados, de ambos os sexos. Constataram, ainda, que a administração de tiroxina repara tais alterações. ARVY *et alii*. (1950) demonstraram que a tiouréia fornecida também a ratos, causa atrofia do segmento

tubular da glândula submandibular, semelhante àquela provocada pela tireoidectomia. FLORES-VEAS (1964) apontou a parada de crescimento da glândula salivar na fêmea e o retardamento no crescimento da mesma no macho, após a ablação da tireóide, corroborando o trabalho de LEBLOND & GRAD (1948), os quais relataram alterações mais severas nas fêmeas que nos machos. De outro modo, NUÑEZ (1970) verificou em ratos brancos que 12 dias após a sialoadenectomia a tireóide dos mesmos apresentava sinais de regressão, aspecto que se acentuou aos 25 dias e atingiu o grau máximo aos 40 dias de pós-operatório, com achatamento do epitélio vesicular.

Ante o exposto neste estudo, existem razões suficientes para sugerir a interferência, mesmo que passageira, de altas doses de vitamina "E", sobre o desenvolvimento da glândula salivar submandibular, tanto na fase pré-natal quanto na pós-natal. Todos os parâmetros estudados, como o peso corporal, o peso glandular, o volume nuclear e a histologia qualitativa, mostraram diferenças significativas entre os animais "tratados", em relação aos "controles". ALAM & ALAM (1979) verificaram que diferentes doses de vitamina "E" (250 e 2500 UI/Kg) fornecidas a ratos, durante a gestação e a lactação, alteram o conteúdo de fosfolípidos na glândula submandibular, modificando também a proporção das frações dos ácidos oleico e linoleico e que, após algum tempo de tratamento há tendência do órgão alvo, em voltar à normalidade; embora este fato já tenha sido observado por outros autores (BASTIANI & ZATTI, 1952; CZYBA, 1966) permanece inexplicado, a não ser que ocorra uma adaptação do organismo às novas condições alimentares.

Por outro lado, a diferença que se estabelece quanto ao peso corporal e glandular dos animais "tratados" em relação aos "controles", a qual nunca se igualou no decorrer do período experimental considerado, aliada à imagem histológica do retardo do desenvolvimento, observada entre os dias zero a 9º de vida pós-natal, sugere comprometimento da síntese protéica. Aliás, o nível de síntese protéica se apresenta aumentada "in vivo" durante a deficiência de vitamina "E" (DINNING *et alii*, 1955; WEINSTOCK, 1966); entretanto, experimentos realizados "in vitro" na tentativa de esclarecer o efeito do alfa-tocoferol nesse processo de síntese, têm levado a resultados conflitantes, ora mostrando aumento (DE VILLERS *et alii*, 1973), ora diminuição do nível da síntese protéica (REISS & TAPPEL, 1973), o que permite sugerir correlação dos achados do presente trabalho com alteração do nível de síntese protéica.

CONCLUSÕES:

Os resultados obtidos no presente trabalho, sugerem as seguintes conclusões:

- 1. Doses excessivas de vitamina "E" administradas por via gástrica a ratos, durante o período de gestação e de lactação provoca diferença de crescimento ponderal com diminuição do peso dos animais do grupo "tratado".*
- 2. O peso das glândulas submandibulares dos animais "tratados" com grandes doses de vitamina "E" foi sempre menor que aquele dos animais "controles".*
- 3. O uso do teste da mediana permitiu mostrar que os volumes nucleares das células acinosas das glândulas submandibulares dos ratos "tratados", apresentam projeções gráficas diferentes das dos "controles", qquer se considere o período compreendido entre zero a nove dias de vida pós-natal, ou o restante do período estudado.*
- 4. Os volumes nucleares das células dos dutos estriados das glândulas submandibulares dos ratos "tratados" e "controles" não apresentam diferenças estatisticamente significantes.*
- 5. O crescimento da glândula submandibular do rato, durante o período de vida estudado, pode ser considerado do tipo alométrico, apresentando duas etapas bem definidas, sendo diferentes nos animais "tratados" e "controles".*

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

- ADAMSTONE, F.B. The effects of vitamin E deficiency on the development of the chick. J. Morph. Physiol., 52(1): 47-89, 1931
- A possible relation of vitamin E to unrestricted cell division. Science, 80: 450, 1934
- ALAM, S.Q. & ALAM, B.S. Effect of vitamin E on lipid composition of submandibular and lacrimal glands in rats. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 162: 281-286, 1979
- ALVARES, E.P. & SESSO, A. Cell proliferation, differentiation and transformation in the rat submandibular gland during early post-natal growth. A qualitative and morphological study. Arch. histol. jap., 38(3): 177-208, 1975
- ARVY, L.; DEBRAY, C. & GABE, M. Action de la thiourée sur la glande sous-maxillaire du rat albino. C.R. Soc. Biol., 144: 111-113, 1950
- BARNES, M.McC. & BROWN, D.J. The uptake of tocopherols by the developing rat fetus. Internat.J.Vit.Nutr.Res., 44(2): 184-188, 1974
- BARTLLETT, M.S. Fitting a straight line when both variable are subject to error. Biometrics, 5: 207-212, 1949

- BASTIANI, G. & ZATTI, P. Effetti della vitamina E sulla cortecia surrenalica del ratto albino. Boll. Soc. Ital. Biol. sper., 28(5): 1024-1025, 1952
- BIERI, J.G. & FARREL, P.M. Vitamin E. Vitamins and Hormones, 34: 31-75, 1976
- CATIGNANI, G.L. Vitamin E. A comprehensive treatise. Role in nucleic acid and protein metabolism. Lawrence J. Machlin ed. N.Y. 1980
- CHEN, L.; LIAO, S. & PACKETT, L.V. Interaction of dietary vitamin E and protein level or lipid source with serum cholesterol levels in rats. J. Nutr., 102: 729-732, 1972
- CRUZ, A.R. Contribuição ao estudo das interrelações núcleo-citoplasmática: a relação de alometria núcleocitoplasmática em alguns tipos de neurônios. Tese de doutoramento. Faculdade de Medicina, Ribeirão Preto, 1958
- CRUZ, A.R. & LISON, L.A. Nucleocitoplasmatic allometric relation in some nerve cells. J. Microsk. Anat. Forsch., 20: 139-167, 1963
- CRUZ, A.O. Avitaminose E experimental e glândulas salivares. Cienc. e Cult., 19(2): 385-386, 1967

CRUZ,A.O.; COSTA,M.R. & ARRUDA,E.M.V. Avitaminose E e as glândulas salivares submandibulares de ratos fêmeas. Arc. Latinoam. Nut., 25(2): 187-197,1975

CZYBA,J.C. Effects de la hypervitaminose E sur le testicule du hamster doré. C. R. Soc. Biol.,160(1): 765-768,, 1966

-----; GIROD,C & DURAND,N. Modifications morfologiques de la thyroïde du hamster doré traité par la vitamine E. C. R. Soc. Biol., 160: 2101,1966.

DANN,W.J. The transmission of vitamin A from parents to young in mammals. Biochem.,26: 1072, 1932

-----. The tranmission of vitamin A from parents to young in mammals.V. The vitamin A and carotenoid contents of human colostrum and milk. Biochem. J., 30: 1644,1936

DE VILLERS,A.;SIMARD,P. & SRIVASTAVA,U. Biochemical changes in progressive muscular dystrophy. X.Studies on biosynthesis of protein and RNA in cellules fractions of the skeletal muscle of normal and vitamin E deficient rats. Can. J. Biochem., 51: 450-459, 1973

DIEHL,J.F. Incorporation of labeled amino acids into tissue proteins of vitamin E deficient and control rat. Arch. Biochem. Biophys., 87: 339-340, 1960

DINNING, J.S. Nucleic acid metabolism in vitamin E deficiency. *Vitamins and Hormones*, 20: 511-519, 1962

----- ; The role of vitamin E in regulating the turnover rate of nucleic acids. *Biol. Chem.*, 212: 735-739, 1975

----- ; SIME, J.T. & DAY, P.L. The influence of vitamin E deficiency on the metabolism of sodium formate-¹⁴C and glycine-¹⁴C by the rabbit. *J. Biol. Chem.*, 217: 205-211, 1955

----- An increased incorporation of ³²P into nucleic acids by vitamin E-deficient rabbits. *J. Biol. Chem.*, 222: 215-217, 1956a

----- Incorporation of [¹⁴C] guanylic acid into nucleic acids by normal and vitamin E deficient rabbits. *Biochem. Biophys. Acta*, 21: 283-284, 1956b

EVANS, H.M. & BURR, G.O. Development of paralysis in the suckling young mothers deprived of vitamin E. *J. Biol. Chem.* 76: 273-297, 1975

FARREL, P.M. Deficiency states, pharmacological effects and nutrient requirements. In: *Vitamin E. A comprehensive treatise*. Lawrence J. Machlin, Ed., N.Y., 1980

- FLORES_VEAS,G. Contribution à l'étude de la glande salivaire de rongeurs. Étude histologique et expérimentale chez le rat. Z. Mikr. Anat. Forsch. 70: 364-411, 1964
- GALLO-TORRES,H. Vitamin E in animal nutrition. Internat.J.Vit.Nutr. Res., 42: 312-323, 1972
- GERLOCZY,F.;BENCZE,B.;SZÉNASY,J. & KUNCZ,O. Examination of the vitamin E barrier of the placenta. Experientia 7: 427-428, 1951
- HAMMETT,F.Studies of the thyroid apparatus. XV- The growth of the heart, lungs, liver, kidneys, spleen submaxillary glands and eyeballs in male and female albino rats thyro-parathyroidectomized and parathyroidectomized when 100 days of age. Am. J. Anat.,32: 75- 94, 1924
- HILLMAN,W. Tocoferol excesss in man. Creatinina associated with prologed ingestion. Am. J. Clin. Nutr., 5(6): 597-600,1957
- HUXLEY,J.S. Constant differential growth-ratlon and their significance. Nature 114: 895-896, 1924
- JACOBY,F. & LEESON,C.R. The postnatal development of the rat submaxillary gland. J.Anat. (London) 93: 201-216, 1959

JUHÁSZ-SCHAFFER, A. *Arbeiten über das E vitamin. II Mitteilung Wirkung des E vitamin auf explantate in vitro.* Arch. Z. Pat. Anat. U. Physiol. 281: 35-45, 1931

LEBLOND, C.P. & GRAD, B. Control of the serous acini of the rat submaxillary gland by the thyroid hormone. Anat. Rec. 100: 750, 1948

LEHNINGER, A.L. Bioquímica. Vol. I.- Componentes moleculares das células. Editora Edgard Blucher Ltda., 1976

MARCH, B.E.; WONG, E.; SEIER, J.S. & BIELY, J. Hypervitaminosis E in the chick. J. Nutr. 103: 371-377, 1973

MARTIN, M.M. & HURLEY, L.S. Effect of large amounts of vitamin E during pregnancy and lactation. Am. J. Clin. Nutr. 30: 1629-1637, 1977

MARUSICH, W.L. Vitamin E as an "in vivo" lipid stabilizer and its effect on flavor and storage properties of milk and meat. In: Vitamin E. A comprehensive treatise. Lawrence J. Machlin, Ed., N.Y., 1980

MASON, K.E. Differences in testis injury and repair after vitamin A deficiency, vitamin E deficiency and inanition. Am. J. Anat. 52: 153-239, 1933

----- Physiological action of vitamin E and its homologues. Vitamins and Hormones, 2: 107-153, 1944

MASON, K.E. The tocopherols. VII. Effects on deficiency. A. In animals. The vitamins, vol. III, W.H. Sebrell Jr. and Robert S. Harris, Eds., Academic Press, N.Y., 1954

MASON, K.E. & BRYAN, W.L. Standardization of the rat for bio-assay of vitamin E. Biochem. J. 32: 1785-1791, 1938

-----, Placental and mammary transfer of vitamin E in the rat. J. Nutr. 20: 501-517, 1940

MCCOLLUM, E.V.; SIMMOND, N.; BECKER, J.E. & SHIPLEY, P.G. Studies on experimental rickets. XXVIII. Does vitamin D pass into the milk? Am. J. Dis. Child. 33: 230, 1927

NELSON, J.S. Pathology of vitamin E deficiency. In: Vitamin E. A comprehensive treatise. Lawrence J. Machlin, Ed., N.Y., 1980

NUNEZ, J.M.S. Effect of removal submaxillary glands on the thyroid gland. J. dent. Res., 49: 454, 1970

OLCOTT, H.S. & EMERSON, O.H. Antioxidants and the autooxidation of the fats. IX. The antioxidant properties of the tocopherols. J. Am. Chem. Soc., 59: 1008-1009, 1937

OLCOTT, H.S. & MATTIL, H.A. The unsaponifiable lipids of lettuce.

II. Fractionation. J. Biol. Chem., 93: 59-64, 1931a

----- The unsaponifiable lipids of lettuce. III.

Antioxidant. J. Biol. Chem., 93: 65-70, 1931b

----- . Vitamin E. I. Some chemical and Physiological properties. J. Biol. Chem. 104: 423-435, 1934

PARRISH, D.B.; WISE, G.H.; LATSCHAR, C.C. & HUGHES, J.S. Effect of the prepartal diet of the cow on the placental and mammary transfer of tocopherol to the calf. J. Nutr., 40: 193-202, 1950

REISS, N. & TAPPEL, A.L. Increased activity in protein synthesis systems from liver of vitamin E deficient rats. Biochem. Biophysic. Acta 312(3): 608-615, 1973

SATO, Y. Study of developmental pharmacology of vitamin E. Folia Pharmacol. Jap. 69: 293-298, 1973a

-----, Study of developmental pharmacology on vitamin E. II. Experimental study on the nutrition of rats administered vitamin E. Folia Pharmacol. Jap. 69: 379-386, 1973b

SIEGEL, S. Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences. McGraw-Hill Book Company N.Y., 1956

STRAUNFJORD, J.V. & QUAIFE, M.L. Vitamin E levels in maternal and fetal blood plasma. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 61: 369, 1946

TAPPEL, A.L. Vitamin E on the biological antioxidant. Vitamins and Hormones 20: 493-510, 1962

TELFORD, I.R.; EMERSON, G.A. & EVANS, H.M. Histological changes in skeletal musculature of paralyzed suckling young of E-low rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 41: 291-295, 1939a

----- Reduced muscle creatine in
paralyzed young E-low rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 41:
315-318, 1939b

TSAI, A.C.; KELLEY, J.J.; PENG, B. & COOK, N. Study on the effect of megavitamin E supplementation in man. Am. J. Clin. Nutr. 31: 831-837, 1978

VALERI, V.; CRUZ, A.R.; BRANDAO, J.H.S. & LISON, L.A. Relationship between cell nuclear volume and deoxyribonucleic acid of cell of normal epithelium, of carcinoma "in situ" and of invasive carcinoma of uterine cervix. Acta Cytol., 116(6): 488-496, 1967

VALENTI, G. & BOTTARELLI, E. Studio radioisotopico e cromatografico della funzione tiroidea nella ipervitaminosi "E" del ratto. Fol. Endocrinol., 18(3): 318-326, 1965

- VEZAR, F. & v.KOKAS, E. Die wirkung des mangels an E-vitamin auf da
haarkleid der Ratten (Inkretion und Avitaminose) XIII.Mitteilung.
Arch. f.d. ges. Physiol., 227: 511-516, 1931
- WADDEL, J. & STEENBOCK, H. The destruction of vitamin E in a ration
composed and varied foodstuffs. J. Biol.Chem., 80: 431-442, 1928
- WALD, A. The fitting of sstraight lines if both variables are subject
to error. Ann. Mat. Stat., 11: 284-300, 1940
- WASSERMAN, R.H. & TAYLOR, A.N. Metabolic roles of fat-soluble vitamins
D, E e K. Ann. Rev. Biochem., 41: 179-202, 1972
- WEINSTOCK, I.M. Comparative biochemistry of miopathies Ann. N.Y.
Acad. Sci., 138: 199-212, 1966
- WHITING, F. & LOOSLI, J.K. The placental and mammary transfer of to-
copherols (vitamin E) in sheep, goats and swine. J.Nutr. 36:
721-726, 1948
- YOUNG, J.M. & DINNING, J.S. A relationship of vitamin E to nucleic
acid metabolism. J.Biol.Chem., 193: 743-748, 1951