

MARIA HELENA DE MELO LIMA

**"ESTUDO DAS ALTERAÇÕES GLICÊMICAS SEXO-DEPENDENTES
PRODUZIDAS EM RATOS PELA CONCANAVALINA A".**

ORIENTADORA: Profa. Dra. GLACI RIBEIRO DA SILVA

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas para a
obtenção do grau de Mestre em Farmacologia**

CAMPINAS-1995

L628e
25736/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Glaci Ribeiro da Silva

Membros:

1. Profa. Dra. Glaci Ribeiro da Silva

2. Prof. Dr. José Carlos Gomes

3. Profa. Dra. Jani Burgette de Aguiar Mendes

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 21/06/95

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Mestrado, apresentada a Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia da Enfermeira Maria Helena de Melo Lima.

Campinas, 21 de junho de 1995

Profa. Dra. Glaci Ribeiro da Silva
- Orientadora -

*"Para ser grande, sê inteiro:
nada teu exagera ou exclui.
Sê toda em cada coisa.
Põe quanto és no mínimo que fazes
assim em cada lago a lua toda
brilha, porque alta vive".*

FERNANDO PESSOA.

*A DEUS,
por poder crer...*

*Aos meus pais, Nair e Derval por
me ensinarem a persistir,
a acreditar e a ter coragem.*

As minhas irmãs, pelo apoio e estímulo.

Aos meus sobrinhos, pelo carinho.

*Ao João Flávio, que com carinho
esteve presente em todas as etapas e
ajudou-me a vencer obstáculos.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Glaci Ribeiro da Silva, pela orientação segura, incentivo e sua dedicacação neste trabalho.

À Ivani, que com amizade e paciência ajudou-me nos detalhes deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, em especial à Solange Aparecida dos Santos Basso, Maria Rita de Lima e Gislaine Elias Alipio pela enorme contribuição e boa vontade durante toda execução deste trabalho.

Aos demais funcionários do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas -UNICAMP, pela ajuda e amizade.

À Profa. Dra. Gun Birgitta Bergsten Mendes, pela revisão e relevantes críticas na elaboração do texto final.

Ao Prof. Dr. Aquiles Eugênio Piedrabuena, pelo auxílio prestado no apoio estatístico desta Tese.

Ao Biólogo Joaquim Francisco do Prado, pela colaboração técnica.

Ao Dr Stephen Hyslop, pelo auxílio na elaboração do texto em inglês.

Ao Zambelli, pela enorme boa vontade em todos os momentos.

Ao José Luiz Donato, pelo comportamento sempre acessível

INDÍCE

1.INTRODUÇÃO.....	01
2.OBJETIVO.....	06
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	09
1. MATERIAIS.....	09
1.1 Animais e esquema de alimentação.....	09
1.2 Drogas.....	09
2. MÉTODOS.....	10
2.1 Administração de Con A.....	10
2.2 Coleta de sangue.....	11
2.3 Dosagem de glicose sanguínea.....	11
2.4 Pré-tratamento com drogas.....	12
3. Protocolos Experimentais.....	14
4. Análise Estatística.....	15
4.RESULTADOS.....	16
5.DISSCUSSÃO.....	27
6.CONCLUSÕES.....	31
7.RESUMO.....	32
8.SUMMARY.....	34
9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

1. INTRODUÇÃO

Nas sementes de plantas leguminosas é muito comum a ocorrência tanto de proteínas tóxicas, como de outras proteínas não tóxicas como as lectinas, um grupo heterogêneo que embora não tenham semelhanças estruturais, são capazes de ligar-se seletivamente a carboidratos. Várias sementes, entre as quais a *Ricinus communis* (Stillmark, 1889; Ishiguro e col., 1964); *Abrus precatorius* (Olsnes e col., 1974); *Glicina max* (Sambeth e col., 1967) e *Phaseolus vulgaris* (Hamaguchi e col., 1977) mostram esta associação. Esta curiosa e sistemática associação entre lectinas e toxicidade dificultou bastante a separação e o isolamento dos princípios ativos e, de um modo geral, a toxicidade destas sementes foi preliminarmente atribuída às suas lectinas. Porém em alguns casos, este problema parece não ter sido equacionado e ainda existem incertezas quanto à toxicidade e propriedades biológicas de algumas das aglutininas isoladas. Esse é o caso do *Phaseolus vulgaris* (Stead e col., 1966; Hamaguchi e col., 1977) e da *Glicina max* (Stead e col., 1966; Sambeth e col., 1967).

Em outras sementes, contudo, foi possível separar-se inequivocamente as atividades tóxicas e aglutinadoras de células identificando-as como distintas as moléculas proteicas dotadas de cada uma das duas propriedades biológicas. Assim Takahashi e col. (1962) demonstraram que a ricina, princípio protéico tóxico e hemaglutinante isolado a partir do extrato da mamona (*Ricinus communis*), consistia na realidade de uma mistura de duas proteínas, uma delas não hemaglutinante e extremamente tóxica, a ricina propriamente dita, e a outra, uma hemaglutinina atóxica, que passou a ser denominada aglutinina do *Ricinus communis* (Ishiguro e col., 1964; Nicolson e col., 1974; Olsnes e col., 1974). Analogamente, foi também demonstrado que a semente do *Abrus precatorius* contém uma proteína tóxica, a abrina (Olsnes e Phil, 1973), e uma aglutinina não tóxica (Olsnes e col., 1974; Wei e col., 1975). Fato idêntico a este é observado em relação as sementes da

leguminosa *Canavalia esiformis* que abrigam tanto a lectina Concanavalina A (Con A), como a canatoxina (CNTX), uma toxina protéica descrita em 1981 por Carlini e Guimarães.

A Con A tem sido uma das lectinas mais estudadas, sendo considerada como um mitógeno específico para os linfócitos T, pertencente ao grupo das lectinas que se ligam a manose ou a glicose. A Con A é uma metaloproteína isenta de carboidratos que, em pH 7,0, apresenta-se como um tetrâmero constituído de quatro monômeros idênticos. Estes monômeros são formados por uma cadeia polipeptídica de 237 aminoácidos. De acordo com pH do meio, a Con A forma dímeros ou agregados maiores existindo, porém diferenças entre as atividades biológicas do tetrâmero íntegro e do fragmentado. Cada monômero tem um sítio para receber manose ou glicose, e outros sítios para íons Ca^{++} e Mn^{++} , íons estes considerados indispensáveis para ligação desta lectina com o açúcar (Sharon e Lis, 1972; Reeke e col., 1974; Brown e Hunt, 1978; Goldstein e Poretz, 1986; Klein, 1990).

Como ilustração, mostramos respectivamente nas páginas 7 e 8 a representação esquemática da estrutura tetramérica da Con A e a sequência de aminoácidos de cada monômero, conforme trabalho de Edelman e col. (1972).

Na literatura existem vários relatos mostrando que *in vitro* a Con A possui atividades semelhantes à insulina. Em células gordurosas isoladas foi demonstrado que a Con A, da mesma forma que a insulina, potencializa a oxidação da glicose e antagoniza o efeito lipolítico da adrenalina. Além disso, a Con A em concentrações muito baixas é capaz de ligar-se aos receptores de insulina presentes no fígado e nas membranas das células gordurosas o que, segundo esses autores, justificaria os efeitos do tipo insulina produzidos pela Con A (Cuatrecasas, 1973; Cuatrecasas e Tell, 1973; Czech e col., 1974). Outros trabalhos, ainda *in vitro*, mostram que a Con A interage com ilhotas pancreáticas isoladas e sugerem que os efeitos desencadeados por esta lectina e pela insulina são mediados por um sistema efector comum (Cuatrecasas e Tell, 1973; Maier e col., 1975; Blackard e col., 1980; Caro e Amatruda, 1980; Katzen e col., 1981; Suya e col., 1982; Sorimachi e Yasumura, 1984; Virji e col., 1984).

Embora, como relatamos acima, exista uma extensa literatura sobre os efeitos insulino-miméticos produzidos *in vitro* pela Con A, o mesmo não acontece com efeitos deste tipo produzidos *in vivo* por esta lectina. Neste sentido, em 1976, Nirmul e colaboradores mostraram que a Con A produz hipoglicemia em camundongos, todavia, esta queda dos níveis circulantes de glicose induzida pela Con A neste roedor é acompanhada de severa lesão hepática.

Um estudo tóxico-farmacológico preliminar da CNTX, foi feito em 1984 por Carlini e colaboradores. Estes autores mostraram que as convulsões desencadeadas pela toxina, tem origem medular e podem ser moduladas por drogas de ação central. No entanto, os níveis totais medulares e cerebrais de vários neurotransmissores não se alteram em ratos e camundongos tratados com doses convulsivantes de CNTX. Os animais apresentam hipertensão efêmera e bradicardia, mas a toxina não altera a frequência do átrio isolado de rato. O fato da CNTX não agir em preparações isoladas de reto abdominal de sapos e frênico-diafragmática de ratos, levou esses autores a concluir que ela não tem ação direta sobre a musculatura esquelética e nem é capaz de potencializar o impulso nervoso para produzir contração. Neste trabalho foi demonstrado também, que ratos injetados com doses convulsivantes de CNTX, ficam marcadamente hipotérmicos; este fato, da mesma forma que as convulsões, evidencia a ação da toxina sobre o sistema nervoso central. De acordo com trabalhos de Ribeiro-DaSilva e col. (1989a) as convulsões induzidas por CNTX, estão relacionadas com a hipóxia desencadeada pela mesma.

Vários efeitos descritos para a CNTX são lipoxigenase-dependentes. Carlini e colaboradores em 1985, demonstraram que a CNTX produz agregação plaquetária por ativação da lipoxigenação do ácido araquidônico; além disto, estes autores mostraram que ^{14}C -serotonina é liberada de plaquetas pré-marcadas quando estas células são estimuladas por CNTX. Posteriormente, um efeito semelhante foi descrito para sinaptossomas de cérebro de ratos contendo ^{14}C -serotonina e ^3H -dopamina. A liberação destes neurotransmissores pela toxina ocorre em concentrações nanomolares, de uma forma dose-

dependente e sem causar lesão celular. Este efeito é lipoxigenase-dependente e não está relacionado com a via da ciclooxigenase (Carlini e col., 1985; Barja-Fidalgo e col., 1988).

Além disto, recentemente foi demonstrado que a CNTX é capaz de liberar histamina de mastócitos peritoneais de ratos, através de um processo secretório ativo que também é lipoxigenase-dependente (Grassi e Ribeiro DaSilva, 1989).

De acordo com vários autores (Olsnes e col., 1974; Hamaguchi e col., 1977), as lectinas e as proteínas tóxicas que estão presentes em uma mesma semente, frequentemente compartilham algumas propriedades químicas e farmacológicas. Assim, embora a CNTX e Con A sejam princípios ativos diferentes e não possuam nem mesmo determinantes antigênicos em comum (Carlini e Guimarães, 1981, 1991; Carlini e col. 1988), ambas são capazes de ativar plaquetas (Bellville e col., 1979; Carlini e col., 1985), de secretar histamina de mastócitos peritoneais de ratos (Sullivan e col., 1975; Shores e Mongar, 1980; Grassi-Kassisse e Ribeiro-DaSilva, 1992) bem como, de produzir edema de pata e migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de roedores (Shier, 1975; Barja-Fidalgo e col., 1992; Ghazaleh e col., 1992; Bento e col., 1993).

A administração endovenosa de CNTX produz no rato alterações glicêmicas sexo-dependentes; no macho, observa-se uma alteração bifásica com hiperglicemia inicial e efêmera que é seguida por uma longa fase de hipoglicemia. A fase hiperglicêmica, está relacionada com a hipóxia que a toxina produz, sendo inibida por hexametônio ou diazepam, mas não se alterando quando do pré-tratamento dos animais com alfa ou beta adrenobloqueadores. A fêmea injetada com CNTX apresenta somente hipoglicemia, que pode ser inibida por hexametônio, atropina, naloxone ou naltrexone (Ribeiro-DaSilva e col., 1986; Collares e Ribeiro-DaSilva, 1988; Ribeiro-DaSilva col., 1989b, Ribeiro-DaSilva e Prado, 1993). Portanto, a hipoglicemia é a principal alteração glicêmica que a CNTX produz em ratos. Além disto, foi demonstrado que estas alterações glicêmicas induzidas, por CNTX têm controle hormonal e não se manifestam em animais castrados (Pires-Barbosa e Ribeiro-Dasilva, 1989).

Em ratos tratados com CNTX, observa-se um aumento acentuado dos níveis de insulina circulante, além disso, a CNTX libera insulina de ilhotas pancreáticas isoladas de ratos. Esta liberação é dose-dependente e não citotóxica (Barja-Fidalgo e col., 1991). Esta hiperinsulinemia produzida por CNTX, é inibida pelo pré-tratamento dos animais com naloxone, naltrexone, atropina e hexametônio, sugerindo que este fenômeno é influenciado por opióides e depende da estimulação do sistema nervoso parassimpático (Ribeiro-DaSilva e Prado, 1993).

Dentro deste contexto, recentemente Zambelli em sua Tese de Mestrado (1994) demonstrou que as alterações glicêmicas produzidas por Con A são sexo-dependentes, além disso, estas alterações ocorrem conforme o esquema de tratamento usado. Assim ratos machos tratados cronicamente apresentam hiperglicemia, porém o tratamento agudo não produz alterações glicêmicas. Por outro lado, ratos fêmeas tratados agudamente apresentam hipoglicemia, não havendo alterações glicêmicas quando estes animais foram tratados cronicamente.

2. OBJETIVO

Os **objetivos** desta Tese foram realizar um estudo das alterações glicêmicas sexo-dependentes produzidas por Con A em ratos.

1. Os seguintes parâmetros foram analisados:

A. Dose e tempo dependência.

B. Envolvimento do Sistema Nervoso Autônomo.

C. Envolvimento de metabolitos do ácido araquidônico (AA).

2. Comparar estes resultados com os dados existentes na literatura sobre as alterações glicêmicas sexo-dependentes produzidas por CNTX no rato.

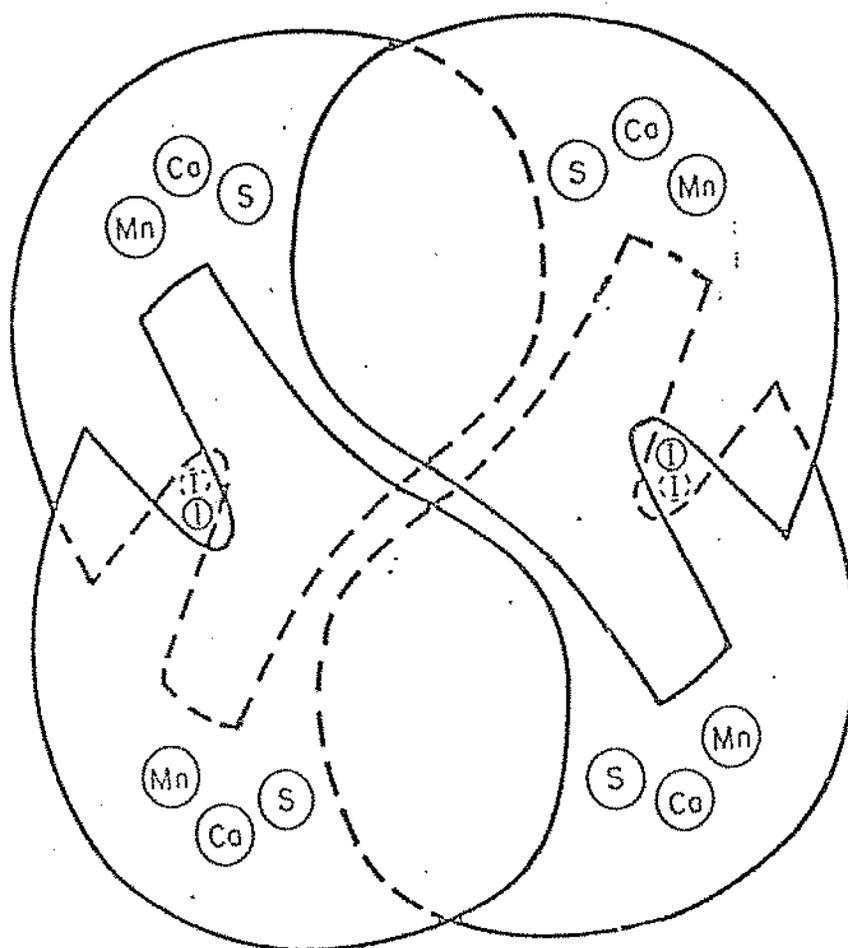


Figura 1. Representação esquemática da estrutura tetramérica da Con A (Edelman e col., 1972).

1 15 20
 ALA-ASP-THR-ILE-VAL-ALA-VAL-GLU-LEU-ASP-THR-TYR-PRO-ASN-THR-ASP-ILE-GLY-ASP-PRO-

21 30 40
 SER-TYR-PRO-HIS-ILE-GLY-ILE-ASP-ILE-LYS-SER-VAL-ARG-SER-LYS-LYS-THR-ALA-LYS-TRP-

41 50 60
 ASN-MET-GLN-ASP-GLY-LYS-VAL-GLY-THR-ALA-HIS-ILE-ILE-TYR-ASN-SER-VAL-ASP-LYS-ARG-

61 70 80
 LEU-SER-ALA-VAL-VAL-SER-TYR-PRO-ASN-ALA-ASP-ALA-THR-SER-VAL-SER-TYR-ASN-VAL-ASP-

81 90 100
 LEU-ASN-ASN-VAL-LEU-PRO-GLN-TRP-VAL-ARG-VAL-GLY-LEU-SER-ALA-SER-THR-GLY-LEU-TYR-

101 110 120
 LYS-GLU-THR-ASN-THR-ILE-LEU-SER-PHE-SER-TRP-THR-SER-LYS-LEU-LYS-SER-ASN-SER-THR-

121 130 140
 HIS-GLN-THR-ASN-ALA-LEU-HIS-PHE-MET-PHE-ASN-GLN-PHE-SER-LYS-ASP-GLN-LYS-ASP-LEU-

141 150 160
 ILE-LEU-GLN-GLY-ASP-ALA-THR-THR-GLY-THR-ASP-GLY-ASP-LEU-GLU-LEU-THR-ARG-VAL-SER-

161 170 180
 SER-ASN-GLY-SER-PRO-GLU-GLY-SER-SER-VAL-GLY-ARG-ALA-LEU-PHE-TYR-ALA-PRO-VAL-HIS-

181 190 200
 ILE-TRP-GLU-SER-SER-ALA-THR-ALA-SER-VAL-PHE-GLU-ALA-THR-PHE-THR-LEU-VAL-ILE-LYS-

201 210 220
 SER-PRO-ASP-SER-HIS-PRO-ALA-ASP-GLY-ILE-ALA-PHE-PHE-ILE-SER-ASP-ILE-ASN-SER-SER-

221 230
 ILE-PRO-SER-GLY-SER-THR-GLY-ARG-LEU-LEU-GLY-LEU-PHE-PRO-ASP-ALA-ASN-

Figura 2. Sequência de aminoácidos dos monômeros que constituem a Con A (Edelman e col., 1972).

3.MATERIAIS E MÉTODOS

1. MATERIAIS

1.1 Animais e esquema de alimentação

Foram usados ratos albinos, fêmeas e machos, da linhagem Wistar, pesando em torno de 200 a 250 g. Os animais eram procedentes do Biotério Central da UNICAMP e foram mantidos a temperatura 24 °C, com iluminação de 12 horas diárias no Biotério do nosso Departamento. Com objetivo de se evitar a competição alimentar e ter a certeza de que os animais estavam bem alimentados, estes foram isolados em gaiolas individuais, com água e alimentação *ad libitum*, pelo menos 24 horas antes dos experimentos.

1.2. Drogas

- ácido dehidronorguairético (Sigma, St. Louis,USA)

- atropina (Sigma, St. Louis, USA)

- BW 775C foi gentilmente cedida pela Profa Dra Célia Regina Carlini, Depto de Bioquímica, ICB da U.F.R.J.

- Concanavalina A (Sigma, St. Louis, USA)

- cloreto de sódio (Merck, Darmstadt, Germany)

- hexametôneo (**Sigma, St. Louis, USA**)

- hidrato de cloral (**Riedel -De Haen AG, Hannover, Germany**)

- ICI 118 554 foi gentilmente cedida pela Profa Dra Célia Regina Carlini, Depto de Bioquímica, ICB da U.F.R.J.

- indometacina (**Sigma, St. Louis, USA**)

- Kit para dosagem de glicose (**Sigma , St Louis, USA**)

- metoprolol (**Seloken*, Merrel Lepetit, Brasil**)

- prazosin (**Minipress*, Pfizer, Brasil**)

- propranolol (**Inderal*, Wyeth, Brasil**)

* Nomes comerciais dessas especialidades farmacêuticas.

2. MÉTODOS

2.1 Administração de Con A

A Con A foi dissolvida em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 (veículo). Para se evitar vários ciclos de descongelamento, a solução mãe da Con A foi armazenada a -20 °C sob formas de aliquotas.

Os animais dos grupos Controle receberam, ao invés da lectina, volumes equivalentes de veículo. A Con A (grupos Tratados) ou o veículo (grupos Controles) foram administrados tanto em ratos machos como em fêmeas, de acordo com dois esquemas diferentes, conforme descrito por Zambelli em 1994.

A. Ratos fêmeas (esquema agudo): a administração foi feita por via endovenosa (iv, veia da cauda) usando-se doses de Con A na faixa de 125-4000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Para o estudo da variação temporal foi usada a dose de 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e os seguintes tempos: 5, 10, 20, 30 e 60 min.

B. Ratos machos (esquema crônico): a administração de Con A foi feita por via subcutânea (sc), durante 3 dias, com intervalos de 24 h entre as doses usando-se doses de Con A na faixa de 180-500 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Para o estudo da variação temporal foi usada a dose de 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e as amostras de sangue obtidas após os seguintes tempos: 0,5, 1, 3, 6, 12, 24 e 48 h.

Cada grupo experimental foi constituído por doze animais, sendo que seis pertenciam ao grupo Tratado e seis ao grupo Controle.

2.2. Coleta de sangue

As amostras de sangue para dosagem de glicose foram obtidas por punção cardíaca; para isto, os animais foram previamente anestesiados com hidrato de cloral administrado por via intraperitonal (ip) na dose de 350 mg/kg .

2.3. Dosagem de glicose sanguínea

Os níveis de glicose sanguínea foram determinados por um método de glicose oxidase (Trinder, 1969). Os resultados foram expressos em milimol de glicose por litro de sangue (mmol/L).

2.4. Pré-tratamento com drogas

A dose de Con A usada foi de 250 µg/kg. Nas fêmeas a lectina era administrada de acordo com o esquema agudo (ver pag 9) e nos machos cronicamente conforme o descrito acima.

Os animais tratados com Con A ou veículo foram submetidos ao pré-tratamento com as seguintes drogas:

- Bloqueador ganglionar: hexametônio.
- Anti-Muscarínico: Atropina.
- Bloqueadores adrenérgicos:
 - Tipo Alfa: Prazosin.
 - Tipo Beta inespecífico: Propranolol.
 - Tipo Beta 1: Metoprolol.
 - Tipo Beta 2 : ICI 118.554,(Bilskie col.,1980).
- Inibidores do metabolismo do ácido araquidônico (AA):
 - Inibidor dual do metabolismo do AA: BW 755C.
 - Inibidor da ciclo-oxigenação do AA: Indometacina.
 - Inibidor da lipoxigenação do AA: Ácido dehidronorguairético.

Pré-tratamento com Hexametônio

O pré-tratamento com Hexametônio foi feito usando-se a dose de 2 mg/kg tanto para os machos como para as fêmeas; a droga era injetada *ip* 30 min antes da injeção de Con A ou veículo.

Pré-tratamento com atropina

O pré-tratamento com atropina foi feito usando-se a dose de 2 mg/kg somente em fêmeas; a droga era injetada *ip* 30 min antes da injeção de Con A ou veículo.

Pré-tratamento com bloqueadores adrenérgicos

Este pré-tratamento foi feito somente em machos.

A dose de prazosin usada foi de 2 mg/kg; a droga era injetada *ip* 10 min antes da injeção de Con A ou veículo.

Para o propranolol usou-se a dose de 1 mg/kg; a droga era injetada *ip* 10 min antes da injeção de Con A ou veículo.

O metoprolol na dose de 1 mg/kg foi injetado *ip* 10 min antes da injeção de Con A ou veículo.

A dose do ICI 118554 foi de 2,1 µg/kg; a droga era injetada *ip* 15 min antes da injeção de Con A ou veículo.

Em todos os pré-tratamentos descritos até agora as drogas eram dissolvidas em água destilada e as soluções feitas imediatamente antes do seu uso.

Pré-tratamento com inibidores do metabolismo do AA

Este pré-tratamento foi usado tanto para fêmeas como para machos.

A dose de BW 755C usada foi de 50 mg/kg; a droga foi administrada via oral 60 min antes da injeção de Con A ou Veículo. Esta substância era inicialmente dissolvida em um pequeno volume de etanol absoluto e em seguida o volume era convenientemente ajustado com água destilada.

A dose de indometacina usada foi de 5 mg/kg; a droga foi administrada *ip* 60 min antes da injeção de Con A ou veículo. Esta substância era inicialmente dissolvida em um

pequeno volume de carbonato de sodio a 5 % e em seguida completou o volume com água destilada e ajustou-se o pH.

A dose do ácido dehidronorguircético usada foi de 125 mg/kg; a droga foi administrada *ip* 60 min antes da injeção de Con A ou veículo. Esta substância foi solubilizada com ajuda de 1 a 2 gotas de Na OH 1 M sendo, em seguida, o volume completado com água destilada.

3. Protocolos Experimentais

Os animais foram divididos em oito grupos experimentais conforme esquema abaixo:

Grupo A. Curva dose-efeito em ratos fêmeas tratadas agudamente com Con A.

Grupo B. Variação temporal em ratos fêmeas tratadas agudamente com Con A.

Grupo C. Curva dose-efeito em ratos machos tratados cronicamente com Con A.

Grupo D. Variação temporal em ratos machos tratados cronicamente Con A

Grupo E. Ratos fêmeas pré-tratadas com Hexametônio ou Atropina.

Grupo F. Ratos machos pré-tratados com Hexametônio ou bloqueadores adrenérgicos.

Grupo G. Ratos fêmeas pré-tratadas com inibidores do metabolismo do AA.

Grupo H. Ratos machos pré-tratados com inibidores do metabolismo do AA.

4. Análise estatística

Os dados estão expressos como média \pm erro padrão médio ($\bar{x} \pm SEM$).

Os resultados absolutos foram analisados pelo teste não paramétrico "t" Student e os percentuais de variação, pelo teste de Kruskal-Wallis (Lowell Wine, 1966; Siegel, 1979). Em ambos os testes a hipótese alternativa foi definida como bicaudal e o nível de significância considerado foi de 5%.

4. RESULTADOS

Nossos resultados mostraram que a Con A, quando injetada agudamente em ratos fêmeas, produziu uma queda significativa dos níveis de glicose circulante.

Esta hipoglicemia produzida por Con A nestes animais não se mostrou dose-dependente na faixa de 250 a 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. No entanto, este fenômeno desapareceu quando utilizamos a dose de 4000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Con A. (Figura 3).

Analisando-se a variação no tempo deste fenômeno, podemos observar que esta queda significativa dos níveis de glicose circulante produzida por 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Con A em ratos fêmeas também não se mostrou tempo-dependente, no intervalo de 10 a 30 minutos (Figura 4). Ainda na Figura 4 podemos observar, que este fenômeno deixou de ser significativo, 30 minutos após a administração de Con A, pois os níveis glicêmicos dos animais tratados com esta lectina foram praticamente idênticos aos dos animais Controle.

Em relação aos animais machos a administração crônica de Con A produziu um aumento dos níveis de glicose circulante.

Fizemos em seguida um estudo da dose e tempo dependência desta hiperglicemia produzida em ratos machos pela Con A. Estes dados estão ilustrados na Figura 5 onde podemos observar que quando utilizamos a lectina na faixa de 180 a 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, o efeito hiperglicêmico somente se manifestou significativamente para a dose de 250 e 350 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Isto sugere que o fenômeno hiperglicêmico induzido por Con A em ratos machos, também não é dose-dependente.

Fato idêntico a este foi observado no estudo da variação temporal desta hiperglicemia produzida por Con A. Usando-se a dose de 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Con A, e variando o tempo de 0,5 a 48 h, notamos que as alterações glicêmicas induzidas por esta lectina, somente se manifestaram de uma maneira significativa 6 h após a sua administração. Além

disto, foi observado também que esta hiperglicemia se manteve até 24 h desaparecendo 48 h após (Figura 6).

Diante dos fatos descritos acima, fizemos então o pré-tratamento com drogas inibidoras do parassimpático em ratos fêmeas, usando-se para isto um bloqueador glaglionar, o hexametônio e um anti-muscarínico, a atropina. Na Figura 7 podemos verificar que ambos bloqueam significativamente a queda dos níveis glicêmicos causada pela Con A em ratos fêmeas (hexametônio: $-2 \pm 2\%$; atropina; $-7 \pm 7\%$).

Esta hipoglicemia observada em ratos fêmeas tratadas agudamente com Con A parece envolver os metabólitos AA. Esta colocação se deve ao fato de que, quando pré-tratamos estes animais com um inibidor dual tanto da ciclooxigenação como da lipoxigenação do AA, o BW755C, ocorreu uma inibição desta hipoglicemia, levando os níveis de glicose circulante destes animais para valores próximos do normal ($-2 \pm 3\%$).

O pré-tratamento com Indometacina, um inibidor específico da ciclooxigenase, também foi capaz de causar uma inibição significante desta queda dos níveis de glicose circulante observada em ratos fêmeas após o tratamento com Con A ($-10 \pm 3\%$) (Figura 8).

A Figura 8 também ilustra os resultados que obtivemos com o uso de um inibidor específico da via lipoxigenase, o ácido dehidronorguairético. E podemos verificar que este pré-tratamento não foi eficaz em inibir esta hipoglicemia ($-16 \pm 3\%*$).

Com relação a hiperglicemia induzida por Con A em animais machos, realizamos o pré-tratamento com um bloqueador ganglionar, o hexametônio, um bloqueador alfa, o prazosin, um bloqueador beta inespecífico, o propranolol, um bloqueador beta 1, metoprolol e um bloqueador beta 2, ICI 118.554, e constatamos que todas estas drogas inibiram significativamente o aumento de glicose circulante. O hexametônio ($+2 \pm 4\%$), prazosin ($+9 \pm 3\%$), propranolol ($+1 \pm 3\%$), metoprolol ($-7 \pm 4\%$) e ICI 118.554 ($+8 \pm 5\%$) (Figura 9).

Na Figura 10 ilustra os dados obtidos com o uso de inibidores da metabolização do AA, em ratos machos. O pré-tratamento com BW755C inibiu esta hiperglicemia ($+8 \pm 4\%$).

Ainda nesta Figura podemos observar que houve uma inibição desta hiperglicemia, quando estes animais foram pré-tratados com inibidor da ciclooxigenase, a indometacina

($+2 \pm 2\%$), e o mesmo não ocorreu quando estes animais foram pré-tratados com inibidor da lipoxigenase, o ácido dehidronorguarético ($+20 \pm 3\%*$).

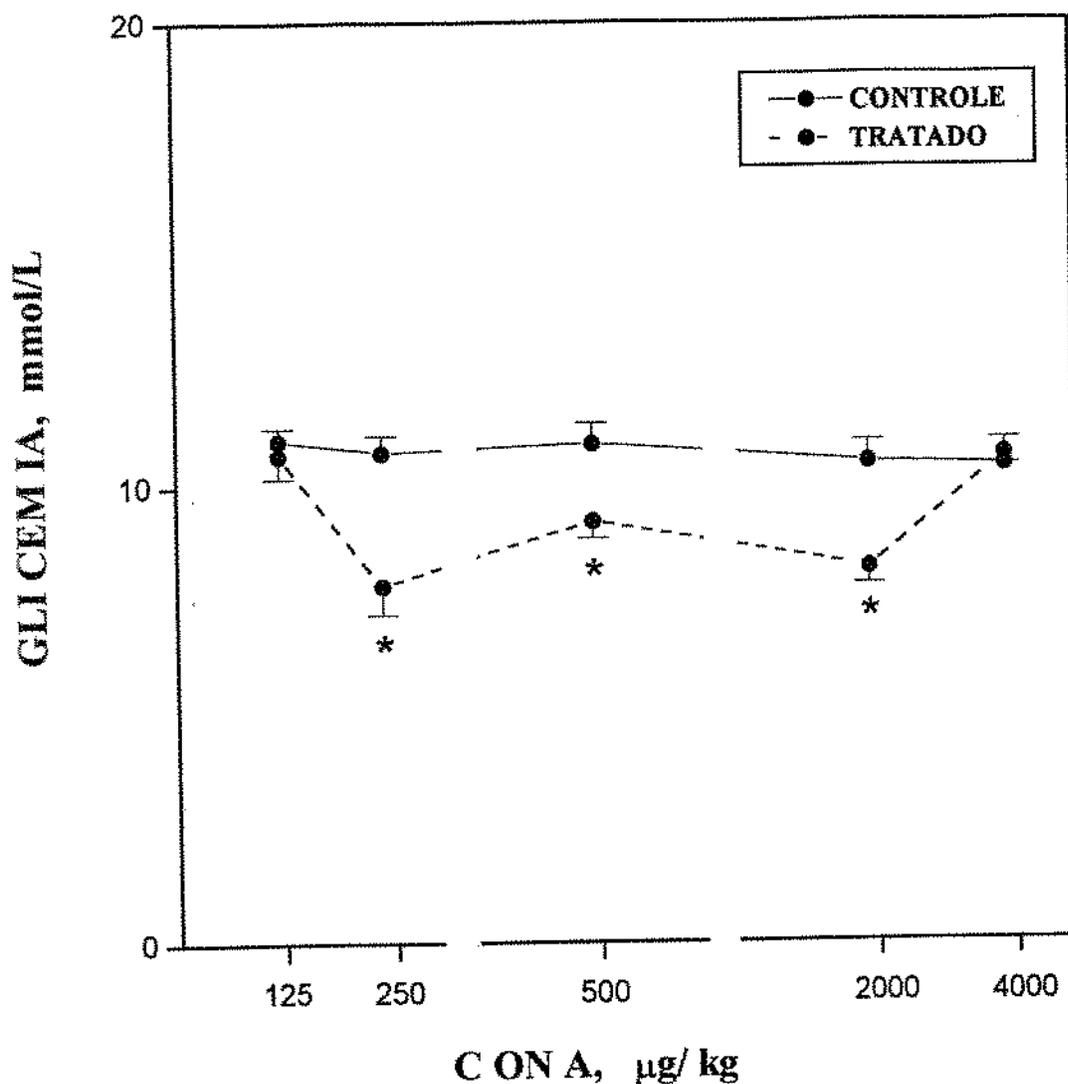


Figura 3 - Curva dose-efeito da hipoglicemia produzida por Con A em ratos fêmeas. A Con A foi injetada *iv* (veia da cauda), nas doses indicadas. Os animais dos grupos Controle receberam, ao invés da lectina, volumes equivalentes de veículo. A glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por punção cardíaca 20 minutos após o tratamento. Os pontos e as barras verticais representam a média \pm SEM da glicemia dos grupos Controle e Tratado. N = 6 por grupo; * $p < 0,05$, em relação ao grupo Controle (teste "t" Student não pareado).

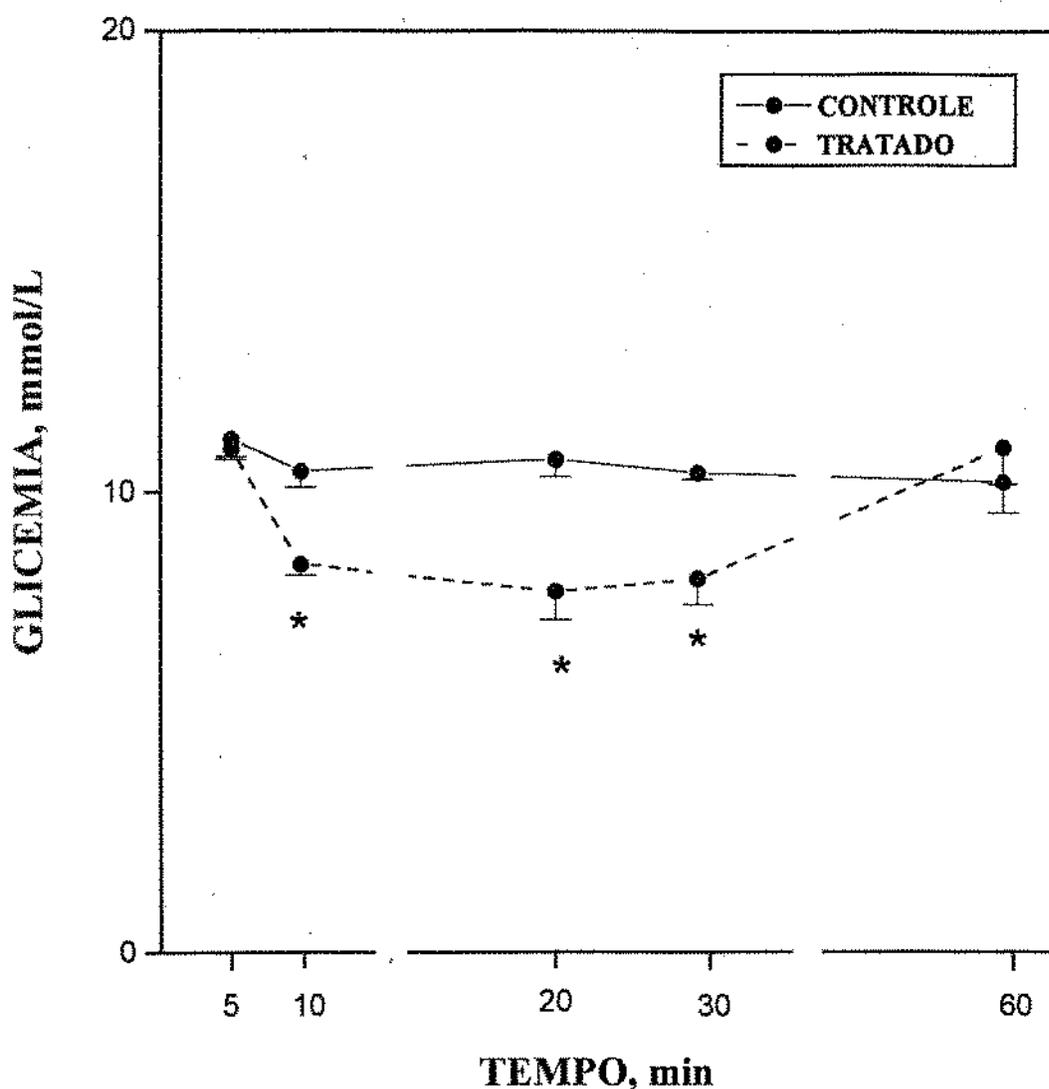


Figura 4 - Variação temporal de hipoglicemia produzida por Con A em ratos fêmeas. A Con A (250 ug/kg) foi injetada *iv.* A (veia da cauda); os animais dos grupos Controles receberam, ao invés da lectina, volumes equivalentes de veículo. A glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por punção cardíaca nos tempos indicados. Os pontos e as barras verticais representam a média \pm SEM da glicemia dos grupos Controle e Tratado. N = 6 por grupo; * $p < 0,05$; em relação ao Controle (teste "t" Student não pareado).

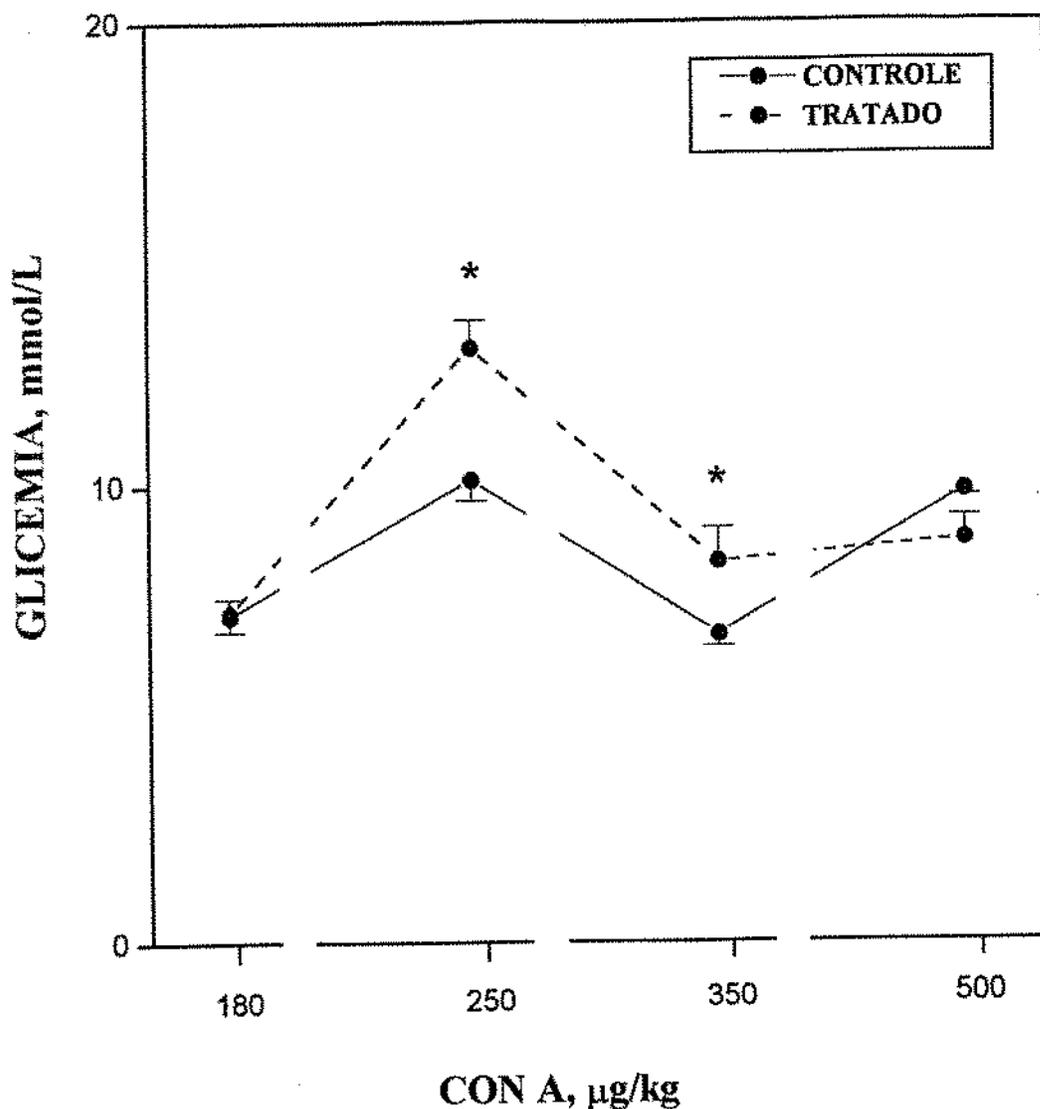


Figura 5- Curva dose-efeito da hiperglicemia produzida por Con A em ratos machos. A Con A foi injetada *sc* ou volumes equivalentes de veículo (grupo Controle) foram injetadas durante três dias seguidos a cada 24 h, nas doses indicadas. A glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por punção cardíaca 24 h após o último injeção de Con A ou veículo. Os pontos e as barras verticais representam a média \pm SEM da glicemia dos animais Controle e Tratado. N=6 por grupo, * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle (teste "t" Student não pareado).

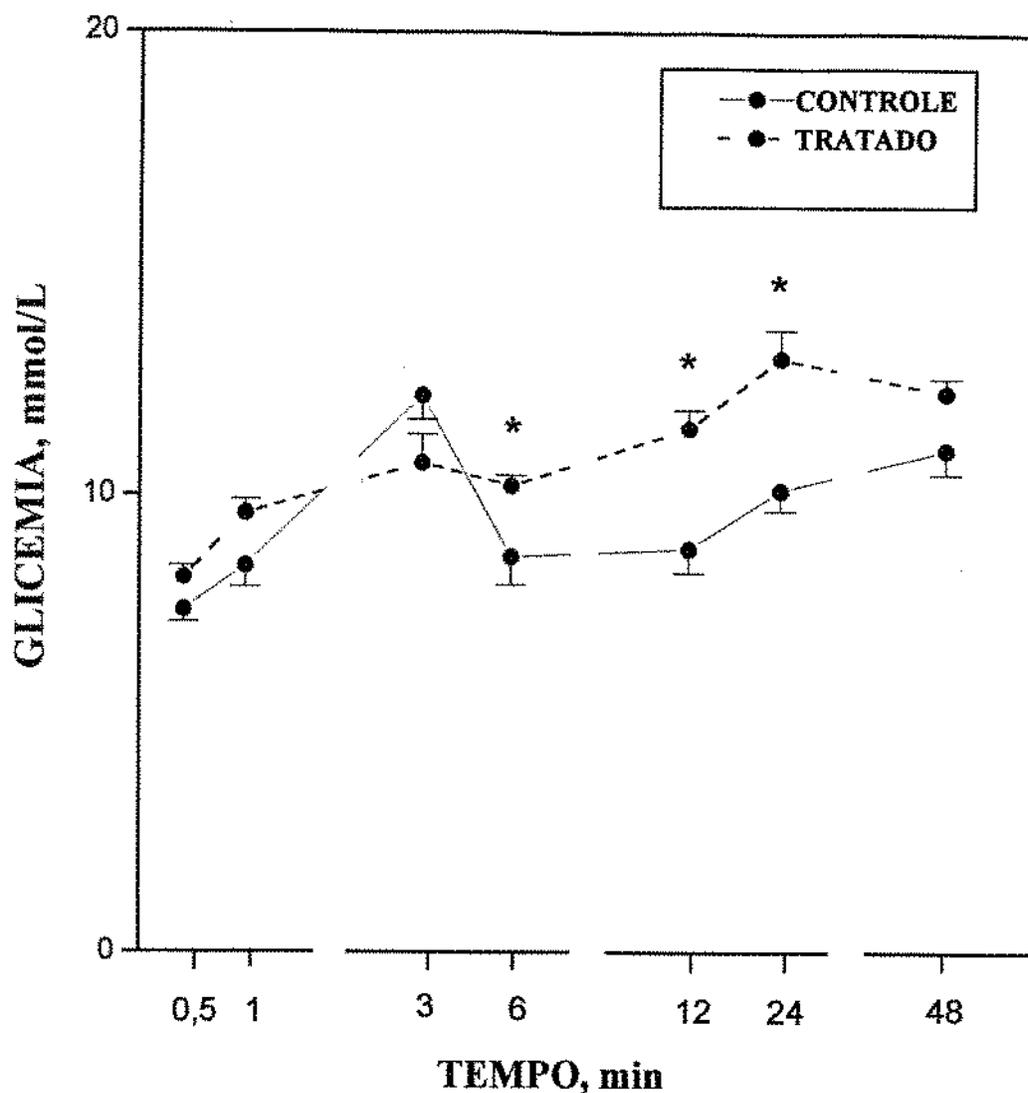


Figura 6 - Variação temporal da hiperglicemia produzida por Con A em ratos machos. A Con A (250 ug/kg, *sc*) ou volumes equivalentes de veículo (grupo controle) foram injetadas durante três dias seguidos a cada 24 h, nos tempos indicados. A glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por punção cardíaca. Os pontos e as barras verticais representam a média \pm SEM da glicemia dos animais Controle e Tratado. N=6 por grupo, * $p < 0,05$; em relação ao Controle (teste "t" Student não pareado).

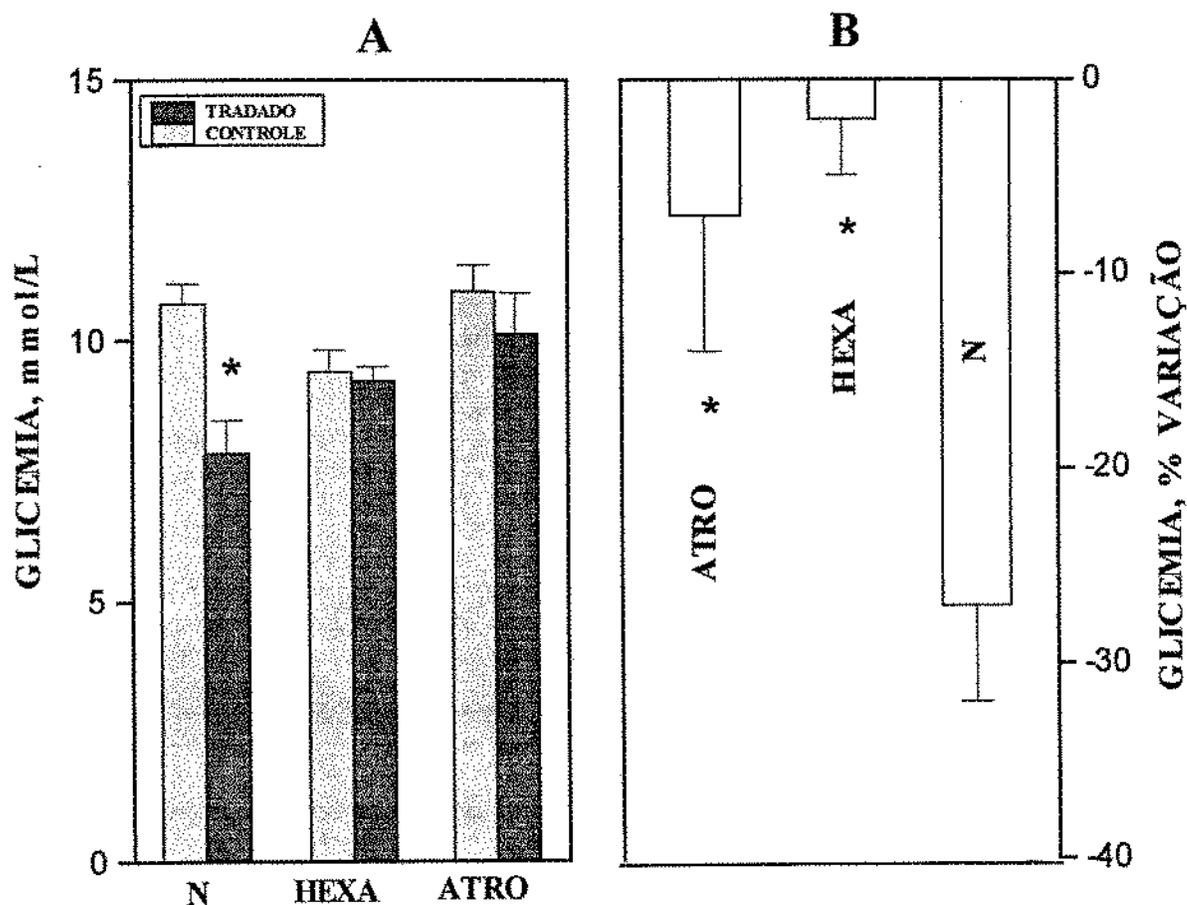


Figura 7 - Influência do parassimpático sobre a hipoglicemia produzida por Con A em ratos fêmeas. O hexametônio (Hexa, 2 mg/kg,ip) ou atropina (Atro, 2 mg/kg,ip) foi injetada 30 min antes do tratamento com Con A (250 ug/kg, iv). Os animais dos grupos Controle receberam, ao invés da lectina, volumes equivalentes de veículo. A glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por punção cardíaca 20 minutos após o tratamento com a lectina ou veículo. No painel A, estão representados os valores médios da glicemia (mmol/L) dos animais sem pré-tratamento (N) e dos pré-tratados com Hexa ou Atro nos grupos Controle e Tratado. No painel B, estes mesmos dados são mostrados como percentual de variação em relação ao grupo sem pré-tratamento considerando como 100%. Cada barra representa a média \pm SEM de 6 animais. No painel A, * $p < 0,05$, em relação ao Controle (teste "t" Student não pareado). No painel B, * $p < 0,05$, em relação aos animais sem pré-tratamento (teste de Kruskal-Wallis).

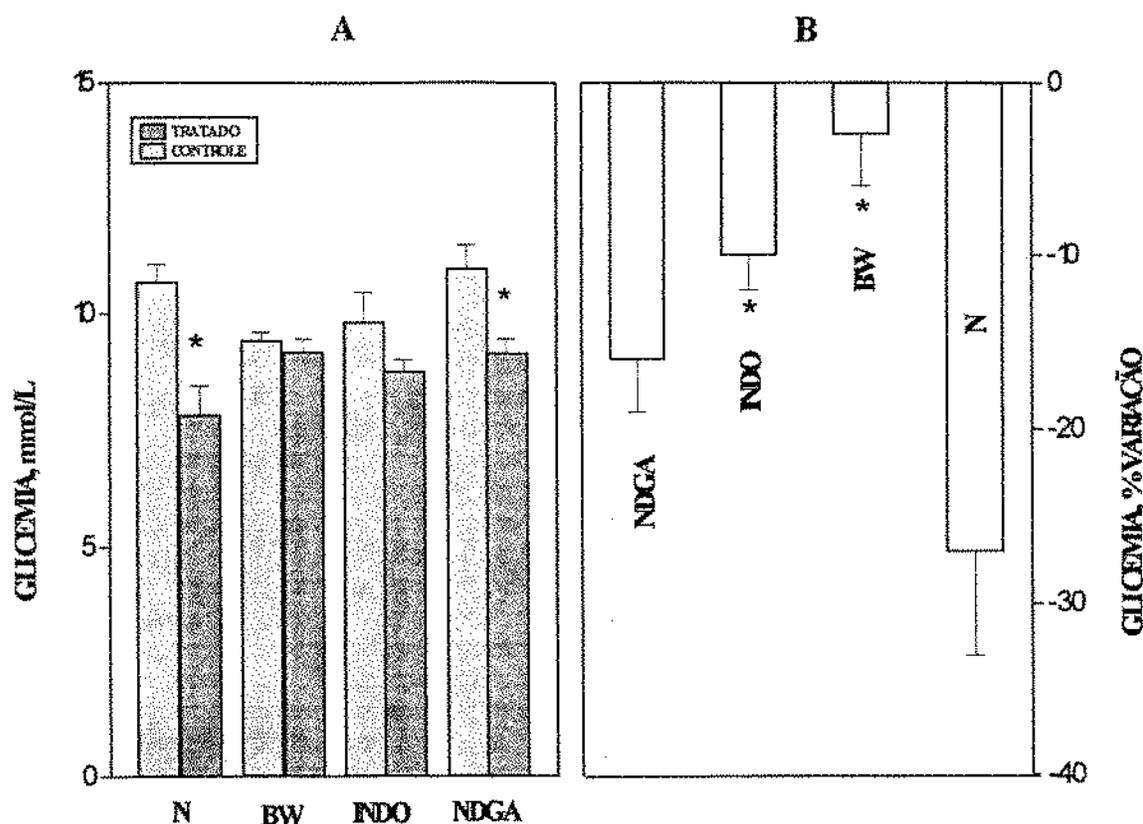


Figura 8 - Efeito de inibidores do metabolismo do ácido araquidônico sobre a hipoglicemia produzida por Con A em ratos fêmeas. O ácido dehidronorguairético (NDGA, 125 mg/kg,ip) ou indometacina (INDO, 5 mg/kg,ip) ou BW755C (BW, 50 mg/kg,vo) foi injetado 60 minutos antes do tratamento com Con A (250 ug/kg,iv). Os animais dos grupos Controle receberam, ao invés da lectina, volumes equivalentes de veículo. A glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por punção cardíaca 20 minutos após o tratamento com lectina ou veículo. No painel A, estão representados os valores médios da glicemia (mmol/L) dos animais sem pré-tratamento (N) e dos pré-tratados com NDGA, INDO, BW, nos grupos Controle e Tratado. No painel B, estes mesmos dados são mostrados como percentual de variação em relação ao grupo sem pré-tratamento considerando como 100 %. Cada barra representa a média \pm SEM de 6 animais. No painel, A * $p < 0,05$, em relação ao Controle (teste "t" Student não pareado). No painel B, * $p < 0,05$ em relação aos animais sem pré-tratamento (teste de Kruskal-Wallis).

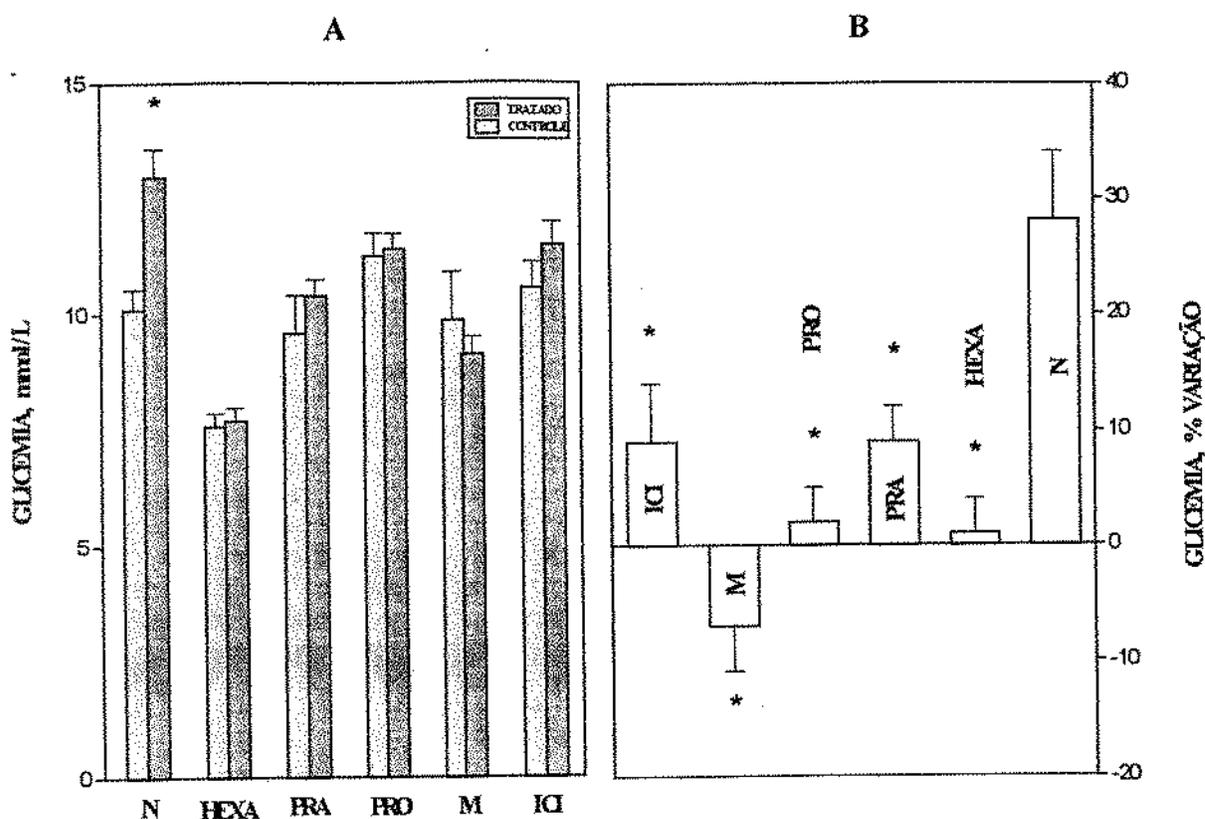


Figura 9 - Influência de um bloqueador ganglionar ou de bloqueadores adrenérgicos sobre hiperglicemia produzida por Con A em ratos machos. A Con A (250 ug/kg, *sc*) ou volumes equivalentes de veículo (grupo Controle) foram injetadas durante três dias seguidos a cada 24 h. 60 minutos antes deste tratamento, os animais receberam hexametônio (Hexa, 2 mg/kg, *ip*) ou prazosin (PRA, 2 mg/kg, *ip*) ou metoprolol (M, 1mg/kg, *ip*) ou ICI 118.554 (ICI, 2.1 ug/kg *ip*) ou propranolol (PRO, 1 mg/kg, *ip*). A glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por punção cardíaca 24 h após a última injeção de Con A ou veículo. No painel A, estão representados os valores da glicemia (mmol/L) dos animais sem pré-tratamento (N) e dos pré-tratados com Hexa, PRA, M, ICI ou PRO nos grupos Controle e Tratado. No painel B, estes mesmos dados são mostrados como percentual de variação em relação ao grupo sem pré-tratamento considerando como 100%. Cada barra representa a média \pm SEM de 6 animais. No painel A, * $p < 0,05$ em relação ao Controle (teste "t" Student não pareado). No painel B, * $p < 0,05$ em relação aos animais sem pré-tratamento (teste de Kruskal-Wallis).

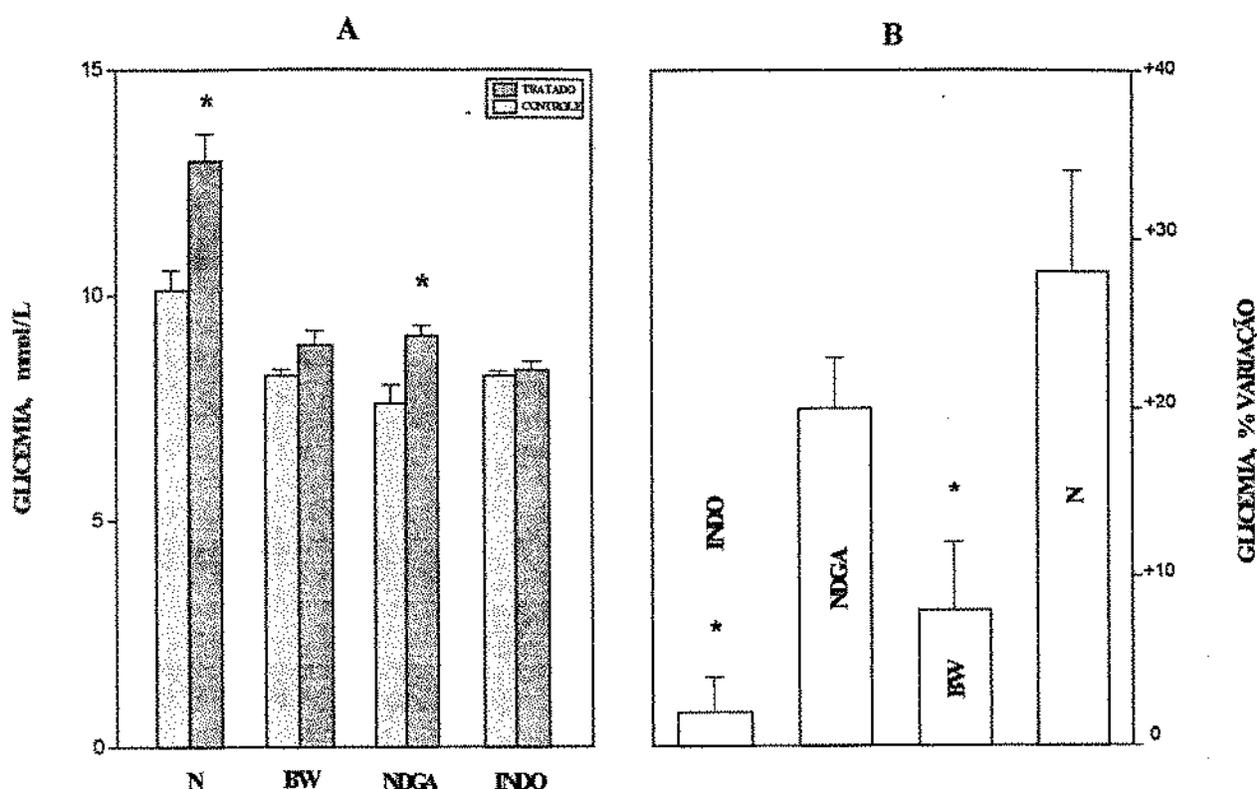


Figura 10 - Efeito de inibidores do metabolismo do ácido araquidônico sobre a hiperglicemia produzida por Con A em ratos machos. A Con A (250 ug/kg,sc) ou volumes equivalentes de veículo (grupo Controle) foram injetadas durante três dias seguidos a cada 24 h. 60 minutos antes deste tratamento, os animais receberam ácido dehidronorguairético (NDGA, 125 mg/kg, ip) ou indometacina (INDO, 5 mg/kg,ip) ou BW755C (BW, 50 mg/kg,vo). A glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por punção cardíaca 24 h após a última injeção de Con A ou veículo. No painel A, estão representados os valores medios da glicemia (mmol/L) dos animais sem pré-tratamento (N) e dos pré-tratados com NDGA, INDO ou BW nos grupos Controle e Tratado. No painel B, estes mesmos dados são mostrados como percentual de variação em relação ao grupo sem pré-tratamento considerando como 100%. Cada barra representa a média \pm SEM de 6 animais. No painel A, * $p < 0,05$ em relação ao Controle (teste "t" Student não pareado). No painel B, * $p < 0,05$ em relação aos animais sem pré-tratamento, (teste de Kruskal-Wallis).

5. DISCUSSÃO

Nossos dados mostraram que as alterações glicêmicas sexo-dependentes produzidas por Con A em ratos não foram proporcionais as doses da lectina injetada nos animais nem ao tempo decorrido após essa administração. Além disso, mostramos também que estas alterações glicêmicas foram moduladas pelo Sistema Nervoso Autônomo e por produtos da metabolização do AA.

Em relação aos parâmetros estudados nesta Tese, várias diferenças puderam ser observadas entre as alterações glicêmicas sexo-dependentes produzidas pela Con A e pela CNTX. Essas diferenças foram detectadas em relação ao rato macho e ao rato fêmea e foram tanto qualitativas como quantitativas.

O rato fêmea tratado agudamente com dose única endovenosa de CNTX (Ribeiro DaSilva e col., 1989a) ou de Con A (figura 3) apresenta hipoglicemia. No entanto, a Con A foi cerca de 400 vezes menos potente do que a CNTX para baixar os níveis de glicose circulante dos animais. Assim, 20 min após o injeção endovenosa de 250 ug/kg de Con A os níveis glicêmicos das fêmeas foram reduzidos em cerca de 30 % (Figura 4) enquanto que com a CNTX, nestas mesmas condições, bastam 0,6 ug/kg para produzir uma hipoglicemia equivalente (Ribeiro-DaSilva e Prado 1993). Além disso, conforme ilustra a Figura 3 doses altas de Con A inibiram a hipoglicemia que esta lectina foi capaz de induzir nos ratos fêmeas fato este que acontece com a CNTX (Ribeiro-DaSilva e Prado 1993).

Uma hipoglicemia indica que a saída de glicose da circulação está sendo maior do que a entrada. Existem várias causas para explicar esse fenômeno e elas estão relacionadas aos diferentes mecanismos existentes no organismo dos mamíferos responsáveis pela manutenção da homeostasia da glicose. Esses mecanismos regulatórios envolvem fatores hormonais, neurais e autoreguladores (Migliorini, 1991; Malnic, 1991; Cryer, 1985).

O mecanismo regulador hormonal envolve a insulina, o glucagon, a epinefrina e o hormônio de crescimento. A insulina suprime a produção de glicose endógena e estimula a sua utilização baixando portanto, a concentração plasmática de glicose. O glucagon, a epinefrina e o hormônio de crescimento são chamados hormônios contrarreguladores pois promovem aumento da glicemia. O glucagon é um potente ativador da glicogenólise e da gliconeogênese. O efeito hiperglicêmico da epinefrina é mais complexo e envolve tanto os receptores alfa como os beta adrenérgicos. O hormônio de crescimento limita o transporte de glicose para dentro da célula produzindo um fenômeno de resistência a insulina.

A glicorregulação neural é exercida pelo efeito hiperglicêmico da norepinefrina liberada nas terminações pó-ganglionares do Sistema Nervoso Simpático. O mecanismo de ação da norepinefrina na glicorregulação é semelhante ao da epinefrina já mencionado acima.

O mecanismo de autorregulação dos níveis circulantes de glicose é independente dos fatores hormonais e neurais. Ele é acionado pelos os níveis de glicose circulante e favorece o depósito de glicogênio hepático. É um mecanismo importante pois é acionado rapidamente. Ele envolve a maior ou menor captação de glicose pelas células hepáticas garantindo assim a manutenção de um nível adequado e constante de glicemia.

A hipoglicemia produzida pela CNTX em ratos está relacionada com o mecanismo autorregulador hormonal de homeostasia da glicose pois foi demonstrado que esta proteína tóxica é capaz de induzir o aumento de secreção de insulina tanto *in vivo* (Ribeiro-DaSilva e Prado, 1989;1993) como *in vitro* (Barja Fidalgo e col., 1991). No entanto, isto parece não acontecer com a Con A pois temos observações preliminares (Melo-Lima e Ribeiro Da-Silva, dados não publicados) mostrando que nas doses e condições em que a Con A produziu hipoglicemia em ratos fêmeas (tratamento agudo e doses na faixa de 250 a 2000 ug/kg) a lectina foi incapaz de alterar os níveis de insulina circulante dos animais. Como a ação das lectinas se dá principalmente na membrana celular (Sharon e Lis, 1972) é possível que a hipoglicemia produzida pela Con A esteja relacionada com um aumento da captação de glicose circulante pelas células, fato este que, sabido, envolve a membrana celular (Cryer,

1985). Se levarmos esta hipótese em consideração, a hipoglicemia produzida pela Con A poderia estar relacionada com o mecanismo autorreguladores da homeostasia de glicose. Neste contexto, é importante lembrar que a Con A possui vários efeitos insulínicos (Cuatrecasas, 1973; Cuatrecasas e Tell, 1973; Maier e col., 1975; Blackard e col., 1980; Caro e Amatruda, 1980; Katzen e col., 1981; Suya e col., 1982; Sorimachi e Yasumura, 1984; Virji e col., 1984) e que a insulina interioriza glicose agindo na membrana celular (Cryer, 1985). O fato de termos mostrado que a hipoglicemia produzida por Con A independe da dose de lectina administrada e do tempo decorrido após essa administração (figura 3 e 4) parece dar apoio a esta hipótese.

A maioria dos efeitos já descritos para a CNTX, inclusive a hipoglicemia, são modulados pelos metabolitos da lipoxigenação do ácido araquidônico (Carlini e Guimarães, 1991; Ribeiro-DaSilva e Prado, 1989). Isto parece não acontecer com a hipoglicemia induzida pela Con A, pois nossos dados mostraram que este fenômeno não se alterou quando os animais foram pré-tratados com o ácido dehidronorguairético, um inibidor de lipoxigenase (Figura 8). Por outro lado, a hipoglicemia que a Con A produz foi inibida pela indometacina (Figura 8) sugerindo que este fenômeno estão envolvidos os produtos da via da ciclooxigenase.

É interessante notar que, apesar de todas as diferenças assinaladas até então, existe uma modulação pelo parassimpático tanto nas alterações glicêmicas produzidas pela CNTX (Ribeiro-DaSilva e col., 1989b) como nas que estamos descrevendo para a Con A (Figura 7).

Conforme detalhamos na Introdução (ver pg 4), a alteração glicêmica produzida por CNTX no macho é bifásica (Ribeiro-DaSilva e col., 1986; 1989a) enquanto nossos dados mostraram que a Con A produz nestes animais uma resposta monofásica de hiperglicemia (figura 5).

O efeito hiperglicêmico da Con A no rato macho só se manifesta quando o animal é tratado cronicamente com a lectina (Zambelli, 1994); isto diverge frontalmente do que acontece com a CNTX pois a administração endovenosa de uma única dose da proteína

tóxica já é capaz de induzir no rato macho um aumento significativo dos níveis de glicose circulante (Ribeiro-DaSilva e col., 1986;1989a).

A CNTX produz em ratos convulsões letais precedidas por intensos distúrbios respiratórios que se exteriorizam através através de dispnéia acentuado acompanhada de cianose (Carlini e col., 1984). Além disso, a CNTX produz hipóxia em ratos e isto esta intimamente relacionado com o efeito convulsivante da toxina (Ribeiro-DaSilva e col,1989a,b). Estes autores mostraram também que a hiperglicemia que a CNTX provoca em ratos machos é uma manifestação metabólica desta hipóxia (Ribeiro-DaSilva e col., 1989b).

Em relação a Con A, no entanto, mesmo utilizando-se doses muitas altas de lectina como aquelas usadas em nossos experimentos (125-4000 ug/kg) em nenhuma ocasião pudemos observar distúrbios respiratórios ou convulsivos nos animais que pudessem justificar a hiperglicemia que estamos relatando.

A hiperglicemia produzida pela CNTX nos ratos machos está relacionada com os opióides mas não depende do Sistema Nervoso Simpático (Ribeiro-DaSilva e col., 1986). Já o aumento de glicose circulante que a Con A produz nestes animais embora envolva também os opióides (Zambelli, 1994), está nitidamente relacionado com uma ativação do Sistema Nervoso Simpático pois o fenômeno deixou de se manifestar nos animais pré-tratados com bloqueadores adrenérgicos (Figura 9).

Outra diferença básica na hiperglicemia produzida pela CNTX e pela Con A é que, enquanto no caso da toxina o evento é lipoxigenase-dependente (Ribeiro-DaSilva e col., 1989c), o aumento dos níveis glicêmicos induzidos pela Con A foi inibido por indometacina (Figura 10) o que indica um envolvimento dos metabólitos da ciclooxigenação do AA.

Finalmente ,como decorrência dos vários fatos expostos nesta Discussão podemos concluir dizendo que, embora existam alguns fatores em comum entre as alterações glicêmicas sexo-dependentes promovidas em ratos tanto pela Con A como pela CNTX elas, muito provavelmente, ocorrem devido a mecanismos de ação diferentes.

6. CONCLUSÕES

1. A hipoglicemia induzida pela Con A em ratos fêmeas não foi dose e tempo-dependente; sendo que este fenômeno foi modulado pelo parassimpático e pelos produtos provenientes da ciclooxygenação do AA.

Em relação a hiperglicemia induzida por Con A em ratos machos, observou-se que este fenômeno também não foi dose e tempo-dependente, porém foi modulado pelo simpático e pelos produtos provenientes da ciclooxygenação do AA.

2. Dados descritos na literatura sobre a CNTX permite-nos concluir que, as alterações glicêmicas sexo-dependentes induzidas por estas proteínas em ratos, possivelmente não possuem mecanismo de ação em comum.

7. RESUMO

1. As alterações glicêmicas sexo-dependentes produzidas pela Con A em ratos tiveram as seguintes características:

A. O fenômeno hipoglicêmico produzido pela lectina (250 ug/kg *iv*) em ratos fêmeas não foi dose e tempo-dependente. O pré-tratamento com hexametônio (2 mg/kg,*ip*) ou atropina (2 mg/kg,*ip*) ou BW755C (50 mg/kg,*vo*) ou indometacina (5 mg/kg,*ip*) aboliu a queda dos níveis glicose circulante produzidos pela Con A nestes animais, enquanto que o pré-tratamento com ácido dehidronorguairético (125 mg/kg,*ip*) foi incapaz de alterar este fenômeno.

B. A hiperglicemia produzida pela Con A (250 ug/kg) em Ratos machos não foi dose e tempo-dependente. O pré-tratamento com hexametônio (2 mg/kg,*ip*) ou prazosin (2 mg/kg,*ip*) ou propranolol (1 mg/kg,*ip*) ou metoprolol (1 mg/kg,*ip*) ou ICI 118.554 (2,1 ug/kg,*ip*) ou BW 755C (50 mg/kg, *vo*) ou indometacina (5 mg/kg,*ip*), aboliu o aumento dos níveis glicêmicos induzidos pela Con A, porém o pré-tratamento com ácido dehidronorguairético (125 mg/kg,*ip*) não foi capaz de abolir esta hiperglicemia.

2.A Con A e CNTX produzem alterações glicêmicas sexo-dependentes em ratos. Comparando o nosso estudo com aqueles relatados na literatura para CNTX podemos observar que:

A. Tanto a Con A como a CNTX induz a uma hipoglicemia em ratos fêmeas e uma hiperglicemia em ratos machos, porém estas alterações glicêmicas produzidas pela CNTX é dose e tempo-dependente.

B. A hipoglicemia induzida pela Con A ou pela CNTX em ratos fêmeas é inibida por bloqueadores do parassimpático, entretanto esta hipoglicemia induzida pela CNTX é abolida por inibidores dos produtos da lipoxigenase do AA

C. A hiperglicemia induzida pela CNTX em ratos machos não é inibida por bloqueadores adrenérgicos, mas com hexametônio e diazepam. Esta hiperglicemia foi abolida por inibidores dos produtos da lipoxigenase do AA.

8. SUMMARY

1. The sex-dependent glyceemic changes produced by Con A in rats had the following characteristics:

A: The hypoglycemia produced by the lectin (250 μ g/kg, i.v.) in female rats was neither dose nor time-dependent. Pre-treatment with hexamethonium (2 mg/kg, i.p.), atropine (2 mg/kg i.p.) or BW 755 C (50 mg/kg, orally) abolished the fall in circulatory glucose levels while pre-treatment with NDGA (125 mg/kg, i.p.) was incapable of altering this response.

B: The hyperglycemia produced by Con A (250 μ g/kg, s.c) in male rats was also neither dose nor time-dependent. Pre-treatment with hexamethonium (2 mg/kg, i.p.), prazosin (2 mg/kg, i.p.), propranolol (1 mg/kg, i.p.), metaprolol (1 mg/kg, i.p.), ICI 118.554 (2.1 μ g/kg, i.p.), BW 755C (50 mg/kg, orally) or indomethacin (5 mg/kg, i.p.) abolished the increase in blood glucose levels while NDGA (125 mg/kg, i.p.) had no effect on the response.

2. Con A and CNTX produced sex-dependent glyceemic changes in rats.

A: Both Con A and CNTX caused hypoglycemia in female rats and hyperglycemia in male rats. The glyceemic changes produced by CNTX were dose- and time-dependent.

B: The hypoglycemia induced by Con A or CNTX in female rats was inhibited by parasympathetic blockers. The response to CNTX was also abolished by lipoxygenase inhibitors.

C: The hyperglycemia induced by CNTX in male rats was not inhibited by adrenergic blockers but was abolished by hexamethonium, dizepan and lipoxygenase inhibitors.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARJA-FIDALGO, C. ; CARLINI, C.R. ; GUIMARÃES, J.A. ; FLORES, C.A. ; CUNHA, F.Q. ; FERREIRA, S.H. -Role of resident macrophages in canatoxin induced *in vivo* neutrophil migration. **Inflammation**, 16: 1-12, 1992.

BARJA-FIDALGO, C. ; GUIMARÃES, J.A. ; CARLINI, C.R. -Canatoxin, a plant protein, induces insulin realease from isolated pancreatic islets. **Endocrinology**, 128: 675-82, 1991.

BARJA-FIDALGO, C. ; GUIMARÃES, J.A. ; CARLINI, C.R. -The secretory effect of canatoxin on rat brain synaptosomes involves a lipoxigenase-mediated, pathway. **Braz J Med Biol Res.**, 21: 549-552, 1988.

BELLVILE, J.S. ; WILLIAN, B.F. ; GARY, L. -A method for investigating the role of calcium in the shape change aggregation and serotonin release of rat platelets. **J Physiol.**, 297: 289-96,1979.

BENTO, C.A.M. ; CAVADA, B.S. ; OLIVEIRA, J.T.A. ; MOREIRA, R.A. ; BARJA-FIDALGO, C. -Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. **Agents Actions**, 38: 48-54, 1993.

- BILSKI, A.; DORRIES, S. ; FITZGERALD, J. D. ; JESSUP, R. ; TUCKER, H. ; WALE, J.-ICII18.551: a potent beta 2 adrenoceptor antagonist. **Br j pharmacol**,69: 293,1980.
- BLACKARD, W. G. ; SMALL, E. ; LUDERMAN, C. -Inhibition of insulin binding by concanavalin A. **Metabolism**, 29: 691-97, 1980.
- BROWN, J.C. & HUNT, R.C. -Lectins. **Int. Rev. Cytol.**, 52: 277-349, 1978.
- CARLINI, C.R. & GUIMARÃES, J. A. -Isolation and charecterization of a toxic protein from *canavalia ensiformes* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. **Toxicon**, 19 (5) : 667-675, 1981.
- CARLINI, C.R. & GUIMARÃES, J.A. -Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. **Toxicon**, 19 (5):667-75, 1981.
- CARLINI, C.R. & GUIMARÃES, J.A. -Plant and microbial toxic proteins as hemilectins: emphasis on canatoxin. **Toxicon**, 29: 791-806, 1991.
- CARLINI, C.R. ; BARCELLOS, G.B.S. ; BAETA-NEVES, A.D.V. ; GUIMARÃES, J.A. - Immunoreactivity for canatoxin and concanavalin A among proteins of leguminous seeds. **Phytochemistry**, 27: 25-30, 1988.
- CARLINI, C.R. ; GUIMARÃES, J.A. ; RIBEIRO, J.M.C. -Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of the platelet lipoxygenase pathway. **Br J Pharmacol.**, 84: 551-560,1985.

- CARLINI, C.R.; GOMES, C.; GUIMARÃES, J.A.; MARKUS, R.P.; SATO, H.; TROLIN, G. -Central nervous effects of the convulsant protein canatoxin. **Acta Pharmacol. et Toxicol.**, **54**:161-166,1984.
- CARO, J. F. & AMATRÚDA, J.M. -Insulin receptors in hepatocytes postreceptor events mediate down regulation. **Science**, **210**: 1029-1031, 1980.
- COLLARES, C.B. & RIBEIRO-DA SILVA, G. -Involvement of lipoxygenase and cyclooxygenase pathways in hypoxia and metabolic alkalosis produced by canatoxin in rats. **Braz J Med Biol Res.**, **21**:107-110, 1988.
- CRYER, P.E. -Glucose homeostases and hypoglycemia. in: WILSON & FOSTER--Williams **Text book of Endocrinology**. 7 ed. Philadelphia 1985. p. 989-1017.
- CUATRECASAS, P. & TELL, G.P.E. -Insulin-like activity of concanavalin A wheat germ agglutinin - Direct interactions with insulin receptors. **Proc Natl Acad Sci USA**, **70**: 485-489, 1973.
- CUATRECASAS, P. -Interaction of concanavalin A and wheat germ agglutinin with the insulin receptor of fat cells and liver. **J Biol Chem.**, **248**: 3528-3534, 1973.
- CZECH, M. P. ; LAWRENCE, J. C. Jr. ; LYNN, W. S. -Activation of hexose transport by concanavalin A in isolated brown fat cells. **J Biol Chem.**, **249**; 7499-7505, 1974.
- EDELMAN, G.M. ; CUNNINGHAM, B. A. ; REEKE, J. R. ; BECKER, J. W. ; WAXDAL, M. J. ; WANG, J. L. -The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. **Proc Natl Acad Sci USA** , **69**: 2580-2584, 1972.

- FROHMAN, L.A. Glucoregulation. In: Krieger, D.T.; BROWNSTEIN, M. J. ; MARTIN, J.B. (Editors), **Brain peptides**. John Wiley & Sons, New York, 281-299, 1983.
- GHAZALEH, F.A. ; ARAÚJO, C. F. ; BARJA-FIDALGO, C. ; CARLINI, C. R. -
Canatoxin induces activation on mice peritoneal macrophages. **Braz. j. Med. Biol. Res.**, **25**: 1033-1035, 1992.
- GOLDSTEIN, I. J. & PORETZ, R.D. -Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: LIENER, I. E. ; SHARON, N. ; GOLDSTEIN, I. J. Academic Press. **The Lectins Properties, functions and applications in biology and medicine**, Orlando, 1986. p 35-244.
- GOLDSTEIN, I.J. & HAYES, C. E. -The lectins carbohydrate-binding proteins of plants and animals. **Adv Carbohydr Chem Biochem.**, **35**: 127-340, 1978.
- GRASSI, D.M. & RIBEIRO-DA SILVA, G. -Studies on the histamine secretion produced by canatoxin in rats. In: **Sino Symposium on chemistry and pharmacology of Natural Products**. Rio de Janeiro-Brasil, 1989. **Abstracts of the Brazilian**, pg 272.(Abstracts,205).
- GRASSI-KASSISSE, D.M. & RIBEIRO-DA SILVA, G. -Canatoxin triggers histamine secretion from rat peritoneal mast cells. **Agents Actions**, **37**: 204-209, 1992.
- HAMAGUCHI, Y. ; YAGI, N. ; NISHINO, A. ; MOCHIZUKI, T. ; MIYOSHI, M. -The isolation and characterization of a lethal protein from kintoki beans (*Phaseolus vulgaris*). **J Nutr Sci Vitaminol.**, **23**: 525-534, 1977.

- ISHIGURO, M. ; TAKAHASHI, T. ; FUNATSU, K. ; FUNATSU, M. -Biochemical studies on Ricin, I Purification of ricin. **J Biochem.**, **55**: 587-592, 1964.
- KATZEN, H.M. ; VICARIO, P.P. ; MUNFORD, R.A. ; GREEN, B. -Evidence that insulin-like activities of concanavalin A and insulin are mediated by a common insulin receptor linked effector system. **Biochemistry**, **20**: 5800-5809, 1981.
- KLEIN, J. -Antigens and other lymphocyte-activating substances. **In: Immunology, USA** (ed) ;1990. p 269-293.
- LIS, H. & SHARON, N. -The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). **Ann. Rev. Biochem.**, **42**: 541-574, 1973.
- LOWELL WINE, R. -Analysis of variance-one-way classification. **In: _____**-Statistics for scientistis & engineers. USA, Prentice-Hall of India, 1966. p.311-365.
- MAIER, V. ; SCHNEIDER, C. ; SCHATZ, H. ; PFEIFFER, E.E. -Interactions of concanavalin A with isolated pancreatic islets. **Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.**, **356**: 887-894, 1975.
- MALNIC, G. Homeostase, Regulação e Controle em Fisiologia. **In: MELLO AIRES, M.** Guanabara Koogan. Fisiologia, Rio de Janeiro, 1991. p 7-16.
- MIGLIORINI, R. H. O pâncreas Endócrino. **In: MELLO AIRES, M.** Guanabara Koogan. Fisiologia, Rio de Janeiro, 1991. p 716-724.

- NICOLSON, G. L. ; BLAUSTEIN, J. ; ETZLER, M. -Characterization of two plant lectins from *Ricinis communis* and their quantitative interaction with a murine lymphoma. **Biochemistry**, **13**: 196-204,1974.
- NIRMUL, G. ; SEVERIN, C. ; TAUB, R. N. -In vivo effects of concanavalin A. II. Distribution, Histopathologic changes, and toxicity. **Mount Sinai J. Med.**, **43**: 238-247, 1976.
- OLSNES, S. & PIHL, A. -Different biological properties of the two constituent peptide chain of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. **Biochemistry**, **12**: 3121-3126, 1973.
- OLSNES, S. ; SALTVEDT, E. ; PIHL, A. -Isolation and comparison of galactose-binding lectins from *Abrus precatorius* and *Ricinus communis*. **J Biol Chem.**, **249**: 803-810,1974 .
- PETRAGLIA, F. ; PENALVA, A. ; LOGATELLI, V. ; COCCHI, D. ; PANARAI, A. ; GENEZZANI, A. R. ; MULLER, E.E. -Effect of gonadectomy and gonadal steroid replacement on pituitary and plasma beta-endorphin levels in the rat. **Endocrinology**, **111**: 1224-1229, 1982.
- PIRES-BARBOSA, R. & RIBEIRO-DA SILVA, G. -Sex-related canatoxin-induced blood glucose alterations in the rat. **Braz J Med Biol Res.**, **22**: 1507-1513,1989.
- REEKE, G. N.; BECKER, J. W.; CUNNINGHAM, B. A.; GUNTHER, G. R.; WANG, J. L.; EDELMAN, G. M. -Relationships between the structure and activities of concanavalin A. **Ann N Y Acad Sci**, **234**: 369-382, 1974.

- RIBEIRO-DA SILVA, G. & PRADO, J.F. -Hypoglycemia and lipoxygenase-dependent insulin secretion produced by canatoxin in rats. **Toxicon**, **27**:73-74, 1989.
- RIBEIRO-DA SILVA, G. & PRADO, J.F. -Increased insulin circulating levels induced by canatoxin in rats. **Toxicon**, **31**:1131-1136, 1993.
- RIBEIRO-DA SILVA, G. ; CARLINI, C.R. ; PIRES-BARBOSA, R. ; GUIMARÃES, J.A. - Blood glucose alterations induced in rats by canatoxin - a protein isolated from jack bean (*Canavalia ensiformis*) seeds. **Toxicon**, **24**:775-782, 1986.
- RIBEIRO-DA SILVA, G. ; PIRES-BARBOSA, R. ; PRADO, J.F. ; CARLINI, C.R. - Convulsions induced by canatoxin in rats are probably a consequence of hypoxia. **Braz J Med Biol Res.**, **22**:877-880, 1989a.
- RIBEIRO-DA SILVA, G. ; COLLARES, C.B. ; GRASSI, D.M. ; PRADO, J.F. ; ZAPPELINI, A. ; CARLINI, C.R. -Alterations in rat carbohydrate metabolism induced by canatoxin as a probable consequence of primary hypoxia. **Braz j Med Biol Res.**, **22**:1405-1413, 1989b.
- RIBEIRO-DA SILVA, G. ; PRADO, J.F. ; COLLARES, C. B. ; SISTE-CAMPOS, M. - Further studies on the hypoxia produced by canatoxin in rats. **Braz.J. Med. Biol. Res.**, **25**: 849-852, 1992.
- SAMBETH, W. ; NESHEIM, M. C. ; SERAFIN J. A. -Separation of soybean whey into fractions with different biological activities for chicks and rats. **J. Nutr.**, **92**: 479-485, 1967.

- SARKAR, D. K. & YEN, S.S.C. -Changes in beta-endorphin-like immunoreactivity in pituitary portal blood during the estrous cycle and after ovariectomy in rats. **Endocrinology.**, 116: 2075-2079, 1985.
- SHARON , N. & LIS, H. -Lectins cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, 177 (4053): 949-959,1972.
- SHARON , N. -Lectins. **Sci Am.**, 236: 108-119, 1977.
- SHIER, W. T. -Concanavalin A induced inflammation. **Adv Exp Biol Med.**, 55: 347-348,1975.
- SHORES, A.J. & MONGAR, J.L. -Modulation of histamine secretion from Con A - activated rat mast cells by phosphatidylserine, calcium, cAMP, pH and metabolic inhibitors. **Agents Actions**, 10:131-137, 1980.
- SIEGAL, S. -Estatística não paramétrica. rio de Janeiro, McGraw-Hill do Brasil-LTDA,1979.p.302-305.
- SORIMACHI, K. & YASUMURA, Y. -Concanavalin A can trap insulin and increase insulin internalization into cells cultured in monolayer. **Biochem Biophys Res Commun.**, 122:204-211, 1984.
- STEAD, R. H. ; DE MUELENAERE, H. J. H. ; QUICKE, G. V. -Trypsin inhibition, hemagglutination and intraperitoneal toxicity in extracts of *Phaseolus vulgaris* and *Glicina max*. **Arch Biochem Biophys.**, 113: 703-709, 1966.

- STILLMARK, H. -Ueber Ricin, ein giftiges Ferment aus dem Samen von *Ricinus comm.* L. und einigen anderen Euphorbiacen. **Arb Pharmak Inst. Dorpat.**, **3**: 59, 1889.
- SULLIVAN, T.J. ; GREENE, W.C. ; PARKER, C. W. -Concanavalin A induced histamine release from normal rat mast cells. **J Immunol.**, **115**:278-282,1975.
- SUMNER, J.B. & HOWELL, S.F. -Identification of the hemagglutinin of jack bean with Concanavalin A. **J Bacteriol.**, **32**: 227-237, 1936.
- SUYA, H. ; ABE Y ; TANAKA, I.; ISHIL, S. ; ITAYA, K. -Insulin-like activity of photochemically obtained monovalent monomeric Concanavalin A in the presence of anti-concanavalin A antibodies: dependence of multivalence for stimulation of glucose oxidation on rat fat cells. **J Biochem.**, **92**: 1251-1257,1982.
- TAKAHASHI, T. ; FUNATSU, G. ; M. -Biochemical studies on Castor bean hemagglutinin. II. Hemagglutinin separated from crystalline ricin and its molecular weight. **J Biochem.**, **52**: 50-53, 1962.
- TRINDER, P. -Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Ann Clin Biochem.**, **6**: 24 - 30, 1969.
- VIRJI, M. ; STEFFES, M.W. ; ESTENSEN, R.D. -Concanavalin A and alloxan interactions on glucose induced secretion and biosynthesis from islets of Langerhans. **Diabetes**,**33**: 164-169, 1984.
- WARDLAW, S.L. ; WEHRENBURG, W.B. ; FERIN, M. ; ANTUNES, J.L. ; FRANTZ, A. G. -Effect of sex steroids on beta-endorphin in hypophyseal portal blood. **J Clin Endocrinol Metab.**, **55**: 877-881, 1982.

WEI, C. H. ; HARTMAN, F.C. ; PFUDERER, P. ; YANG, W. K. -Purification and characterization of two major toxic proteins from seeds of *Abrus precatorius*. **J. Biol. Chem.**, 249: 3061-3067, 1974.

ZAMBELLI, J. E.-Envolvimento de opióides e de hormônios sexuais nas alterações glicêmicas induzidas por Concanavalina A em ratos. Campinas, 1994.(Tese - Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).

AS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS FORAM ORGANIZADAS DE ACORDO COM
A ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABTN)- NBR 6023,
AGOSTO, 1989.