

JOSÉ ERNANI ZAMBELLI <sup>72</sup> / (A)

"ENVOLVIMENTO DE OPIÓIDES E DE HORMÔNIOS SEXUAIS NAS  
ALTERAÇÕES GLICÊMICAS INDUZIDAS POR CONCANAVALINA A EM  
RATOS"

ORIENTADOR: Profa. Dra. GLACI RIBEIRO DA SILVA \*

Tese apresentada à Faculdade de  
Ciências Médicas no Departamento  
de Farmacologia da Universidade  
Estadual de Campinas - UNICAMP  
para a obtenção do grau de  
Mestre em Farmacologia.

CAMPINAS  
1994

Z14e

21993/BC

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

"Aventurar-se causa ansiedade,  
mas deixar de arriscar-se é  
perder-se a si mesmo ...  
e aventurar-se no sentido mais  
elevado, é precisamente tomar  
consciência de si próprio."

(kierkegaard)

Este exemplar corresponde à versão final  
da tese de Mestrado, apresentada a Facul-  
dade de Ciências Médicas - UNICAMP, para  
obtenção do título de Mestre em Farmaco-  
logia do Biólogo **José Ernani Zambelli**.

Campinas, 18 de maio de 1994

  
Profa. Dra. Glaci Ribeiro da Silva  
- Orientadora -

À ANDREA, SEMPRE

## AGRADECIMENTOS

A DEUS,

pela minha existência...

... Um tributo aos meus Pais,  
que por vezes fui motivo  
de alegria, outras de  
preocupações; Porém sempre  
alvo de atenção maior ...

A vocês, valorosos e incansáveis  
Artífices, Dedico minha conquista.

Às minhas irmãs, Aline Juliana, Célia Regina,  
Cirlei de Fátima e Sidnéia, pelo apoio e incentivo  
constante.

"Por grande e digno que seja o  
ideal a que se aspira, só terá  
valor quando conseguido, se o  
foi de maneira honesta."

(Von Dongen)

À Profa. Dra. Glaci Ribeiro da Silva, pela grande orientação, incentivo e amizade; responsável por me introduzir no mundo científico.

"Ninguém tira do homem o que ele aprende,  
a verdade da vida está nos olhos de quem  
a vive, No coração de quem ama e  
Na cabeça de quem a compreende."

(Henfil)

Ao Prof. Dr. Aquiles Eugênio Piedrabuena, pelo auxílio prestado na parte estatística da Tese.

À Profa. Dra. Lireny Ap. Guaraldo Gonçalves, da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Tecnologia, Laboratório de óleos e gorduras, pela gentileza em ceder equipamentos e o laboratório e também pela orientação e sugestões durante o processo de purificação do óleo de aráquida.

Ao Dr. Stephen Hyslop, pela amizade e auxílio na elaboração dos textos em inglês.

À grande amiga Ivani Aparecida de Souza, sempre esteve presente apoiando, ajudando, sugerindo. É dona de um espírito solidário e fraterno, o que é tão raro em nossos dias.

" É preciso ter força  
É preciso ter raça  
É preciso ter sonho sempre  
Quem trás no corpo essa marca  
Possui a estranha mania de  
ter fé na vida."

(Milton Nascimento)

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

Aos demais funcionários do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, pela ajuda, atenção e sobretudo pela grande amizade que nos uniu ao longo do tempo.

"Se não houver frutos,  
valeu a beleza das flores,  
Se não houver flores,  
valeu a sombra das folhas,  
Se não houver folhas,  
valeu a intenção  
da semente..."

(Henfil)

Ao amigo e Biólogo Joaquim Francisco do Prado, pela colaboração técnica e incentivo constante.

Ao Sr. Miguel Borges da Silva, pela sua dedicação, e enorme boa vontade, nos cuidados com os animais utilizados nos experimentos.

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVO.....	08
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
Animais e Esquemas de Alimentação.....	11
Con A.....	11
Coleta de Sangue.....	12
Dosagem de Glicose Sangüínea.....	13
Tratamentos.....	13
A. Cirúrgico (Gonadectomia).....	14
B. Reposição hormonal.....	15
C. Tratamento com drogas.....	15
Controle Positivo com morfina.....	17
Protocolos Experimentais.....	18
Análise Estatística.....	19
Drogas e Reagentes.....	19
4. RESULTADOS.....	21
5. DISCUSSÃO.....	40
6. CONCLUSÕES.....	47
7. RESUMO.....	48
8. SUMMARY.....	50
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52



## 1. INTRODUÇÃO

A Concanavalina A (Con A) é uma lectina vegetal presente nas sementes da leguminosa *Canavalia ensiformis* que foi isolada e cristalizada por Sumner e Howell em 1936.

Lectinas (do latim *legere*, selecionar, escolher) foi o termo proposto por Boyd em 1963 para um grupo heterogêneo de proteínas que, embora não tenham semelhanças estruturais, são capazes de ligar-se seletivamente a carboidratos.

As lectinas são caracterizadas por três propriedades:

- 1<sup>a</sup>. ligação seletiva a carboidratos
- 2<sup>a</sup>. aglutinação de células
- 3<sup>a</sup>. estimulação de linfócitos

Destas propriedades citadas acima somente a primeira caracteriza realmente uma proteína como lectina. A descrição inicial do que se conhece hoje como lectina foi feita por Stillmark em 1889 que, em sua tese de Doutorado, descreveu a aglutinação de hemácias pelo extrato das sementes da mamona (*Ricinus communis*). Posteriormente, este fato foi descrito para outras sementes vegetais e, ao grupo de substâncias que produziam este evento foi dado o nome de aglutinina ou fitoaglutinina ou

hemoaglutinina. Atualmente sabe-se que as lectinas encontram-se amplamente difundidas na natureza estando presentes não somente em vegetais mas também em animais, tanto invertebrados como vertebrados. As lectinas ligam-se facilmente com as células através dos carboidratos da membrana celular. Esta interação das lectinas com as células ocorre através de uma ligação não covalente e sem alterações químicas. Cada lectina possui em sua molécula protéica pelo menos dois sítios de ligação com carboidratos, fato este, que explica sua propriedade citoaglutinante. As lectinas podem ser classificadas de acordo com os açúcares a que elas são capazes de se ligar. Algumas lectinas, como por exemplo a Con A, estimulam células do sistema imunológico - os linfócitos - a crescer, diferenciar e proliferar, ou seja, essas lectinas são substâncias mitogênicas. Os linfócitos estimulados por lectinas mitogênicas possuem as mesmas características daqueles estimulados por antígenos. Assim, os linfócitos tipo B se diferenciam em células produtoras de imunoglobulinas e, os do tipo T produzem linfocinas ( Sharon e Lis, 1972; Lis e Sharon, 1973; Sharon, 1977; Brown e Hunt, 1978; Goldstein e Hayes, 1978; Kocoureck, 1986; Klein, 1990).

A Con A tem sido uma das lectinas mais estudadas. Ela é considerada como um mitógeno específico para os linfócitos T e pertence 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 o 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 outro sítio para ions  $Ca^{2+}$  e  $Mn^{2+}$ , ions estes considerados indispensáveis para a 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 9 e 10 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, potencia 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 do fígado e da membrana 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 dessa lectina e os da insulina são mediados por um sistema efetor 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; Virgi e col., 1984).

Embora como relatamos acima, exista uma farta literatura sobre os efeitos insulinomiméticos 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 por Con A neste roedor é acompanhada de severa lesão hepática.

Nas sementes de plantas leguminosas é muito comum a ocorrência de proteínas tóxicas e de lectinas. Essa estreita associação tem sido verificada em várias sementes: *Ricinus communis* (Stillmark, 1889; Ishiguro e col., 1964); *Abrus precatorius* (Olenes e col., 1974a) ; *Glicina max* (Sambeth e col., 1967) e *Phaseolus vulgaris* (Hamaguchi e col., 1977). A toxicidade destas sementes foi, preliminarmente, atribuída às suas lectinas. Esta curiosa e sistemática associação entre lectinas e toxidez dificultou bastante a separação e o isolamento dos princípios ativos. 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 *glycine 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-se como distintas as moléculas protéicas dotadas de cada uma das duas propriedades biológicas. Assim é que Takahashi e col. (1962), demonstraram que a ricina, princípio protéico tóxico e hemaglutínante isolado a partir do extrato da mamona (*Ricinus communis*), consistia na realidade de uma mistura de duas proteínas, uma delas não hemaglutínante e extremamente tóxica, a ricina propriamente dita, e a outra, uma hemaglutínina atóxica, que passou a ser denominada aglutínina do *Ricinus communis* (Ishiguro e col., 1964; Nicolson e col., 1974; Olsne 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 aglutínina não tóxica (Olsnes e col., 1974; Wei e col., 1975). Fato idêntico a estes é observado em relação as sementes da leguminosa *Canavalia ensiformis* que abrigam tanto a lectina Con A como a canatoxina (CNTX), uma toxina protéica descrita em 1981 por Carlini e Guimarães.

De acordo com vários autores (Olsnes e col., 1974; Hamaguchi e col., 1977), frequentemente as lectinas e as

proteínas tóxicas que estão presentes em uma mesma semente compartilham algumas propriedades químicas e farmacológicas. Dessa forma, embora a CNTX e a 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; Benjamim 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, é inibida por hexametônio ou diazepam mas não se altera com o pré-tratamento dos animais com alfa ou beta adrenobloqueadores. A fêmea injetada com CNTX apresenta somente hipoglicemia que é bloqueada por hexametônio, atropina, naloxone ou naltrexone (Ribeiro-DaSilva e col., 1986; Collares e Ribeiro-DaSilva, 1988; Ribeiro-DaSilva e col., 1989a,b,c; Ribeiro-DaSilva e Prado, 1989, 1993). Portanto, a hipoglicemia é a principal alteração glicêmica

que a CNTX produz em ratos. Além disto, foi demonstrado que estas alterações glicêmicas produzidas por CNTX têm controle hormonal e não se manifestam em animais castrados (Pires-Barbosa e Ribeiro-DaSilva, 1989).

A administração de CNTX a ratos estressados, produz um aumento de gonadotrofinas e uma queda de prolactina sugerindo que a toxina tem um efeito anti-estresse que é, provavelmente modulado pelos opióides endógenos (Ribeiro-DaSilva e col., 1989b).

Em ratos tratados com CNTX observa-se um aumento acentuado nos níveis de insulina circulante. Por outro lado, a CNTX libera insulina de ilhotas pancreáticas isoladas de rato. 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, 1989, 1993).

Trabalhos preliminares (Melo-Lima e Ribeiro-DaSilva, 1993) sugerem que, do mesmo modo que a CNTX, a administração de Con A a ratos produz alterações glicêmicas que são sexo-dependentes.

Considerando os dados de literatura apresentados, parece-nos de grande importância estudar a possibilidade da Con A ser uma substância capaz de causar alterações glicêmicas hormônio-dependentes em ratos.

## 2.OBJETIVO

O objetivo desta Tese foi verificar o envolvimento de hormônios sexuais e de opióides nas alterações glicêmicas sexo-dependentes produzidas por Con A em ratos.



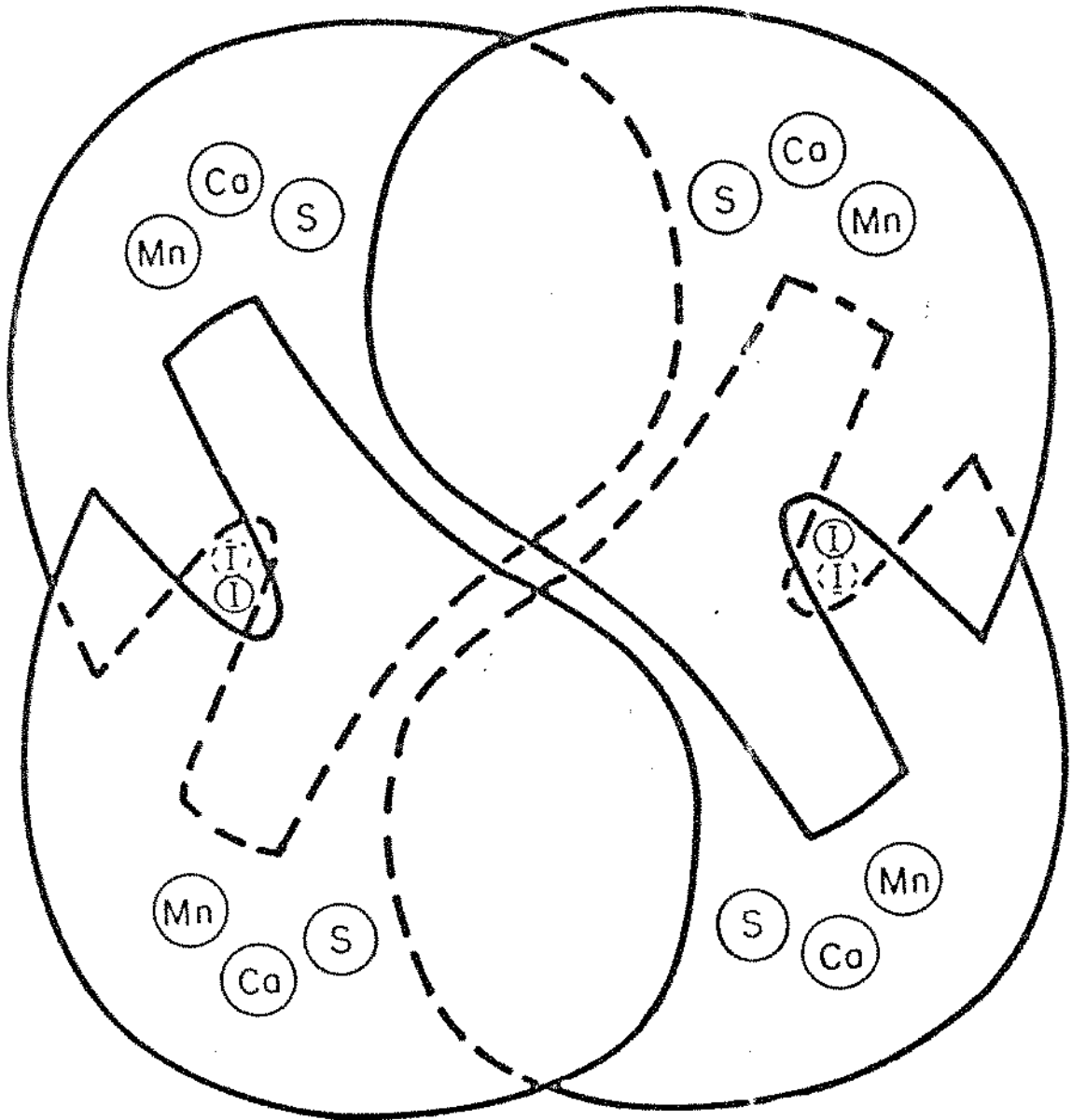


Figura 1. Representação esquemática da estrutura tetramérica da Con A (Edelman e col., 1972).



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 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 no biotério do nosso departamento a uma temperatura de 24°C e com iluminação de 12 horas diárias. Com o objetivo de se evitar a competição alimentar e ter a certeza de que os animais estavam bem alimentados, estes foram isolados pelo menos 24 h antes dos experimentos em gaiolas individuais contendo água e alimentação *ad libitum*.

#### 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  $-20^{\circ}\text{C}$  sob forma de aliquotas.

A dose de Con A usada foi de 250 ug/kg. 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:

A. Esquema AGUDO: a administração foi feita por via endovenosa (ix - veia da cauda) e as amostras de sangue foram obtidas 20 minutos após.

B. Esquema CRÔNICO: a administração foi feita por via subcutânea (sc), durante 3 dias, com intervalos de 24 h entre as doses; as amostras de sangue foram obtidas 24 h após o último tratamento com a lectina ou o veículo.

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

#### 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 intraperitoneal (ip) e na dose de 350 mg/kg.

#### Dosagem de Glicose Sangüínea

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

#### Tratamentos

Os animais tratados com Con A ou veículo foram submetidos aos seguintes tipos de tratamentos:

- A. Cirúrgico
- B. Reposição hormonal
- C. Pré-tratamento com drogas

### A. Cirúrgico (Gonadectomia)

Tanto as fêmeas como os machos foram anestesiados com cloral hidratado (350 mg/kg - i.p.) e mantidos aquecidos sob lâmpada de 60 watts até o término do efeito anestésico, evitando-se com isso uma possível hipotermia decorrente da anestesia.

Ovariectomia (OVX): Os ovários foram localizados e extirpados através de incisões dorsais à direita e à esquerda da coluna vertebral, cerca de 10 mm abaixo da última costela. A seguir, procedeu-se o fechamento da parede por planos.

Orquiectomia (OQX): Os testículos foram localizados e submetidos a exérese, através de uma incisão na parte inferior da bolsa escrotal, ligando-se previamente os canais deferentes e os vasos sanguíneos. Em seguida, procedeu-se a sutura da ferida cirúrgica.

Em ambos os casos, o tratamento com Con A ou veículo era iniciado vinte e um dias após a castração.

## B. Reposição hormonal

Utilizou-se o esquema de Pomerantz e col. (1980) com hormônios sexuais de absorção lenta (tipo "depo"). As fêmeas e os machos castrados recebiam a cada 72 h por via intramuscular (im), quatro doses de 0,5 ml/kg de estradiol ( $OE_{21}$  = 100 ug/kg) ou testosterona (T = 10 mg/kg) respectivamente. Esta reposição hormonal era feita sempre às 15 h e foi iniciada vinte e um dias após a castração. O tratamento com a lectina ou veículo iniciou-se após o oitavo dia da suplementação com os esteróides gonadais.

## C. Pré-tratamento com drogas

Foram usadas as seguintes drogas:

Testosterona (T), estradiol ( $OE_{21}$ ), gonadotrofina coriônica humana (hCG), naloxone (NLX) e naltrexone (NTX).

### Pré-tratamento com hormônios esteróides sexuais

Neste pré-tratamento, as fêmeas intactas recebiam T e os machos intactos OE<sub>2</sub>. O esquema de tratamento usado foi o de Pomerantz e col. (1980) conforme descrito anteriormente no item Reposição hormonal (pag.15).

Tanto a T como o OE<sub>2</sub> foram diluídos no dia dos experimentos em óleo de aráquida purificado.

### Pré-tratamento com hCG

No dia do experimento, a hCG liofilizada era inicialmente reconstituída em 1 ml de solução salina (NaCl 0,9 %), obtendo-se assim, uma solução-mãe de 500 UI/ml. As diluições subsequentes eram feitas em salina a partir desta solução-mãe.

O esquema de pré-tratamento usado foi o descrito por Reich e col. (1985). Os animais intactos eram pré-tratados com hCG 40 UI/kg, por via im, 6 h antes da administração de Con A ou veículo.



### Pré-tratamento com Antagonistas Opióides

Como antagonistas opióides foram utilizados o NLX na dose de 1 mg/kg ou o NTX na dose de 5 mg/kg. Estas substâncias foram dissolvidas imediatamente antes de seu uso em água destilada estéril.

Tanto o NLX como o NTX foram administrados por via *sc.*, 20 minutos antes do tratamento com a lectina ou veículo.

### Controle Positivo com Morfina

Como na literatura os esquemas de pré-tratamento com NLX e NTX são conflitantes (Morley, 1981; Frohman, 1983), os pré-tratamentos com estas drogas foram acompanhados de um controle positivo com morfina. A administração de morfina foi feita de acordo com o esquema descrito por Johansen e col. (1992). Tanto os ratos fêmeas como os machos intactos receberam morfina por via *ip.*, na dose de 10 mg/kg (grupo Tratado) ou água destilada estéril (grupo Controle). As amostras de sangue para dosagem de glicose foram obtidas 30 minutos após.

## Protocolos Experimentais

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

GRUPO A. Fêmeas e Machos Intactos Tratados Agudamente com Con A

GRUPO B. Fêmeas e Machos Intactos Tratados Crônicamente com Con A

GRUPO C. Fêmeas e Machos Gonadectomizados tratados com Con A

GRUPO D. Fêmeas e Machos Intactos Pré-Tratados com hCG

GRUPO E. Fêmeas e Machos Intactos Pré-tratados com Hormônios Esteróides Sexuais

GRUPO F. Fêmeas e Machos Castrados submetidos à Terapêutica de Reposição com Hormônios Esteróides Sexuais

GRUPO G. Fêmeas e Machos Intactos Pré-tratados com Antagonistas Opióides.

- Controle Positivo com Morfina em Ratos Fêmeas

- Controle Positivo com Morfina em Ratos Machos

### Análise Estatística

Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão médio ( $X \pm SEM$ ).

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, a hipótese alternativa foi definida como bicaudal e o nível de significância foi considerado como 5 %.

### Drogas e Reagentes

- ácido clorídico (Merck, Darmstadt, Germany)
- cloreto de sódio (Merck, Darmstadt, Germany)
- concanavalina A (Sigma, St. Louis, U.S.A.)
- decanoato de testosterona (Durateston\*, Organon, São

Paulo, Brasil)

- fosfato dibásico de sódio (Baker , São Paulo , Brasil)
- fosfato monobásico de sódio (Baker , São Paulo , Brasil)
- glicose (Merck, Darmstadt, Germany)
- gonadotrofina coriônica humana (Profasi HP\*, Serono, São Paulo, Brasil)
- hexahidrobenczoato de estradiol (Benzo-ginoestril ap\*, Roussel, Rio de Janeiro, Brasil)
- hidrato de cloral (Riedel -De Haen AG, Hannover, Germany)
- hidróxido de sódio (Merck, Darmstadt, Germany)
- kit para dosagem de glicose (Sigma, St. Louis, U.S.A.)
- naloxone (Sigma, St. Louis, U.S.A.)
- naltrexone (Sigma, St. Louis, U.S.A.)
- óleo de aráquida (Purificado a partir do óleo bruto, sob orientação da Profa. Dra. Lireny Ap. Guaraldo Gonçalves, da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Depto. de Tecnologia, Laboratório de óleos e Gorduras, UNICAMP.)
- sulfato de morfina (Dimorf\*, Cristália, São Paulo, Brazil)

Todos os reagentes e drogas utilizados possuíam grau analítico.

\* Nomes comerciais dessas especialidades farmacêuticas.

#### 4. RESULTADOS

Como mostra a Figura 3, a Con A (250 ug/kg) administrada CRONICAMENTE a ratos MACHOS produziu um aumento significativo dos níveis de glicose circulante ( $+28 \pm 6\%$  \*, Controle = 100%). Surpreendentemente no entanto, usando-se condições idênticas ratos FÊMEAS não tiveram seus níveis glicêmicos significativamente alterados ( $-2 \pm 10\%$ ; Controle = 100%).

Desde que em fêmeas, por motivos que desconhecemos, o tratamento CRÔNICO com Con A não produziu alterações glicêmicas significantes, resolvemos submeter os animais, tanto machos como fêmeas, a um tratamento AGUDO com Con A. Os resultados que obtivemos foram outra vez bizarros pois, neste caso como ilustra a Figura 4, não foram observados alterações glicêmicas significantes nos ratos MACHOS ( $+5 \pm 7,5\%$ , Controle = 100%), enquanto nos ratos FÊMEAS, a Con A produziu agora uma queda significativa dos níveis de glicose circulantes ( $-31 \pm 5\%$  \*\*, Controle = 100%).

Diante dos fatos descritos acima fizemos, então, a hipótese de que os hormônios sexuais pudessem estar envolvidos também nestes eventos. Para elucidar isto, machos e fêmeas foram castrados e o tratamento com a lectina foi invertido, ou seja, MACHOS foram tratados com o esquema AGUDO e FÊMEAS com o esquema CRÔNICO. Verificamos então que,

em ambos os casos, não foram detectadas alterações glicêmicas significantes (MACHO intacto + tratamento AGUDO +  $5 \pm 7,5$  %, MACHO castrado + tratamento AGUDO:  $-8 \pm 4$  % ; Controle = 100%; FÊMEA intacta + tratamento CRÔNICO:  $-2 \pm 10$  %, FÊMEA castrada + tratamento CRÔNICO:  $-12 \pm 5$  %; Controle = 100%).

Este resultado colocou-nos perante a seguinte situação: em relação a Con A, os ratos MACHOS apresentaram alterações glicêmicas apenas com tratamento CRÔNICO enquanto que nos ratos FÊMEAS estas alterações foram observadas somente com o tratamento AGUDO.

Como nosso objetivo era verificar o envolvimento de hormônios sexuais nas alterações glicêmicas induzidas por Con A, adotamos racionalmente o seguinte esquema submeter os ratos MACHOS ao tratamento CRÔNICO e as FÊMEAS ao tratamento AGUDO e usando, em ambos os casos, a mesma dose da lectina.

Dando prosseguimento ao nosso objetivo inicial sobre o envolvimento de hormônios sexuais nas alterações glicêmicas induzidas por Con A em ratos, tanto os machos como as fêmeas foram castrados e tratados com Con A (250 ug/kg), de acordo com o esquema definido acima. Como pode ser observado nas Figuras 5 e 6, a castração inibiu significativamente tanto a hipoglicemia observada anteriormente nos ratos FÊMEAS intactos (FÊMEAS intactas:  $-31 \pm 5$  % ; FÊMEAS castradas:  $-7 \pm 5$  %), como a hiperglicemia

de ratos MACHOS intactos ( machos intactos: +  $28 \pm 6 \%$  ; machos castrados: -  $25 \pm 2 \%$  \*). Além disto, é interessante observar que os ratos machos castrados apresentaram, como os ratos fêmeas intactos, um efeito hipoglicêmico com a Con A (machos castrados: -  $25 \pm 2 \%$ ; fêmeas intactas: -  $31 \pm 5 \%$ ).

Como a castração, liberando o eixo hipotálamo-pituitário, faz aumentar os níveis circulantes de gonadotrofinas (Kuret e Murad, 1990), ratos fêmeas e ratos machos intactos foram pré-tratados com hCG 40 UI/kg - im, recebendo então Con A (250 ug/kg) de acordo com o esquema de tratamento AGUDO (fêmeas) ou CRÔNICO (machos). Conforme pode-se observar nas Figuras 7 e 8, este pré-tratamento com hCG reproduziu, de uma maneira muito fiel, os fatos anteriormente observados com os animais castrados (FÊMEAS castradas: -  $7 \pm 5 \%$ , FÊMEAS pré-tratadas com hCG: -  $4 \pm 9 \%$  ; MACHOS castrados: -  $25 \pm 2 \%$ , MACHOS pré-tratados com hCG : -  $27 \pm 4 \%$ ).

A Figura 9 ilustra os resultados que obtivemos sobre a hipoglicemia induzida por Con A em ratos FÊMEAS intactos, quando estes animais são pré-tratados com T. Assim, pode ser observado nesta Figura que a T inibiu significativamente este fenômeno (FÊMEAS intactas: -  $31 \pm 5 \%$ , FÊMEAS pré-tratadas com T: -  $2 \pm 5 \%$ \*). Na Figura 10, mostramos que um fato análogo a este foi também observado com a hiperglicemia exibida pelos ratos MACHOS intactos pré-

tratados com  $OE_{22}$  (MACHOS intactos:  $+ 28 \pm 6 \%$ , MACHOS pré-tratados com  $OE_{22}$ :  $0,0 \pm 6 \%$ ).

As Figuras 11 e 12 mostram o efeito da Con A em ratos fêmeas e machos castrados e suplementados respectivamente com  $OE_{22}$  e com T. Como pode ser observado na Figura 11, a inibição pela castração das alterações glicêmicas produzidas por Con A em FÊMEAS não se alterou significativamente com esta reposição hormonal (FÊMEAS castradas:  $- 7 \pm 5 \%$ , FÊMEAS castradas +  $OE_{22}$ :  $+ 8 \pm 7\%$ ). No entanto, nos ratos MACHOS castrados o tratamento hormonal se mostrou muito eficiente pois, não só foi capaz de fazer desaparecer a hipoglicemia induzida pela castração como, também, causou uma hiperglicemia semelhante a dos animais intactos. A Figura 12 ilustra estes resultados: (MACHOS castrados:  $- 25 \pm 2 \%$ , MACHOS castrados + T:  $+ 29 \pm 4 \%$ ; MACHOS intactos:  $+ 28 \pm 6 \%$ ).

As Figura 13 e 14 ilustram o efeito do pré-tratamento com antagonistas opióides (NLX e NTX) sobre estas alterações glicêmicas em ratos FÊMEAS e MACHOS intactos. A Figura 13 mostra que tanto NLX como NTX foram capazes de inibir de maneira significante esse fenômeno (FÊMEAS intactas:  $- 31 \pm 5 \%$ , FÊMEAS pré-tratadas com NLX:  $- 5 \pm 3 \%$  ou FÊMEAS pré-tratadas com NTX:  $- 1 \pm 7 \%$ ).

Da mesma forma, verificamos também que o pré-tratamento com NLX ou NTX em ratos MACHOS intactos foi capaz de inibir a hiperglicemia que estes animais



apresentavam com Con A. Estes dados estão ilustrados na Figura 14 (MACHOS intactos :  $+ 28 \pm 6 \%$  , MACHOS pré-tratados com NLX :  $+ 6 \pm 3 \%$  ou MACHOS pré-tratados com NTX:  $+ 13 \pm 8 \%$ ).

As Figuras 15 e 16 mostram, de modo claro, que o esquema de pré-tratamento que usamos para o NLX e o NTX foi eficiente, pois essas drogas inibiram o efeito hiperglicemiante da morfina tanto em machos como em fêmeas intactos (MACHOS:  $+ 75 \pm 18 \%$ ; MACHOS pré-tratados com NLX :  $+ 5 \pm 3 \%$  ; MACHOS intactos pré-tratados com NTX :  $- 3 \pm 6 \%$ , Controle = 100% ; FÊMEAS intactas :  $+ 57 \pm 11\%$  ; FÊMEAS intactas pré-tratadas com NLX :  $- 11 \pm 4\%$  ; FÊMEAS intactas pré-tratadas com NTX :  $- 9 \pm \%$ , Controle = 100% ).

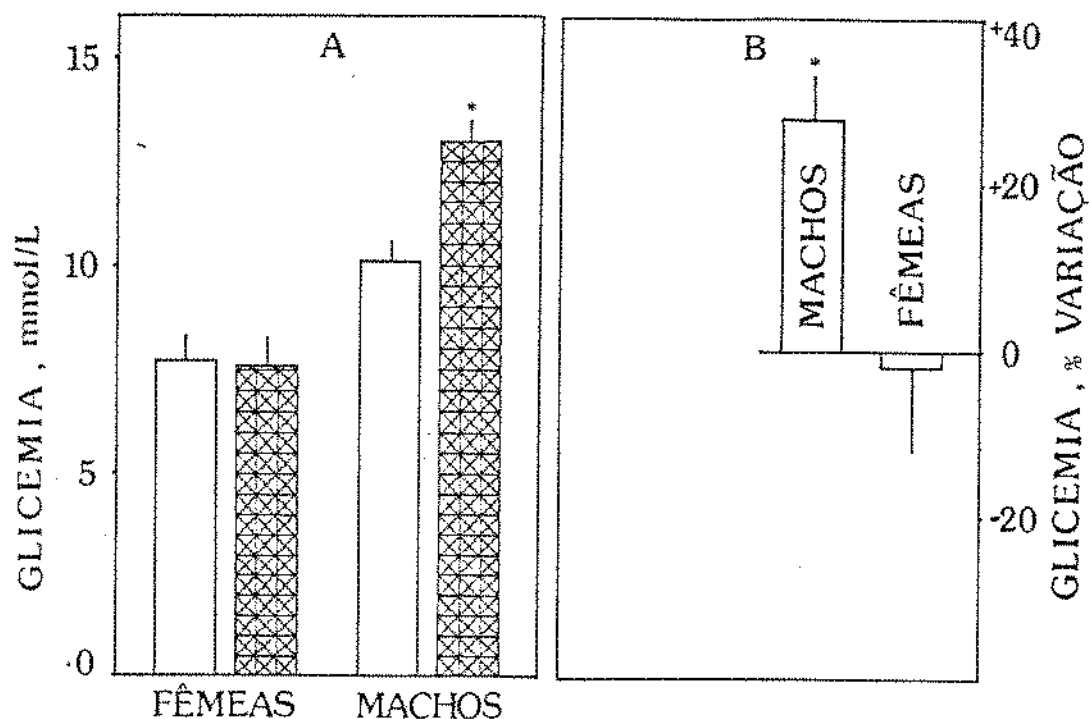


Figura 3. EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM CON A SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE SANGUÍNEA EM RATOS FÊMEAS E MACHOS INTACTOS - A Con A (250 ug/kg) foi injetada por via sc durante três dias, com intervalos de 24 h. Os animais dos grupos Controle receberam, ao invés da lectina, volumes equivalentes de veículo. A glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por punção cardíaca, 24 h após o último tratamento. No painel A, estão representados os valores médios da glicemia (mmol/L) das fêmeas e machos dos grupos CONTROLE (□) e TRATADO (⊠). No painel B, estes mesmos dados são mostrados como percentual de variação considerando-se os valores dos respectivos Controles como 100%. As barras verticais em cada coluna correspondem ao SEM N= 6 animais por grupo; \* p<0,05, em relação ao Controle (teste "t" Student não pareado).

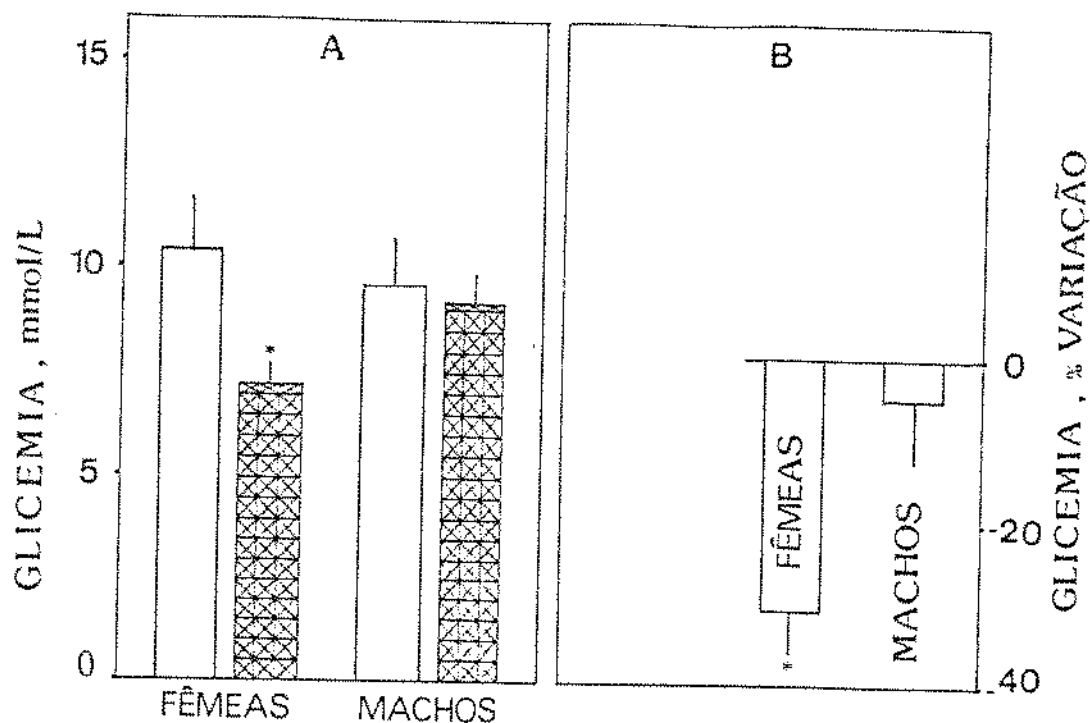


Figura 4. EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO COM CON A SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE SANGUÍNEA EM RATOS FÊMEAS E MACHOS INTACTOS - A Con A (250 ug/kg) foi injetada iv (veia da cauda); os animais dos grupos Controles receberam, ao invés da lectina, volumes equivalentes de veículo. A glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por punção cardíaca 20 minutos após o tratamento. No painel A, as colunas representam os valores médios da glicemia (mmol/L) de fêmeas e machos dos grupos CONTROLE (□) e TRATADO (▣). No painel B, estes mesmos dados são mostrados como percentual de variação considerando-se os valores dos respectivos Controles como 100%. As barras verticais em cada coluna correspondem ao SEM; N= 6 animais por grupo; \* p<0,05, em relação ao Controle (teste "t" Student não pareado).

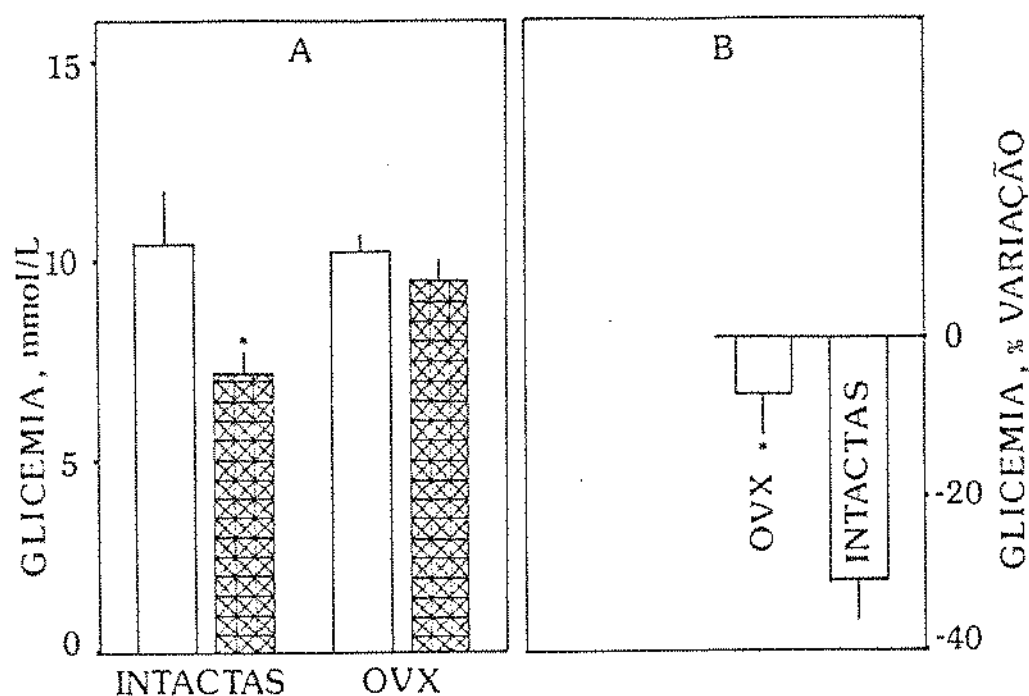


Figura 5. EFEITO DA OVARIECTOMIA SOBRE A HIPOGLICEMIA PRODUZIDA PELA CON A EM RATOS - Os animais castrados foram usados somente 21 dias após a cirurgia. A Con A (250 ug/kg) foi injetada por via *ix* (veia da cauda); os animais dos grupos Controles receberam, ao invés da lectina, volumes equivalentes de veículo. A glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por punção cardíaca 20 minutos após o tratamento com lectina ou veículo. No painel A, estão representados os valores médios da glicemia (mmol/L) das fêmeas castradas nos grupos CONTROLE (□) e TRATADO (⊗). No painel B, estes mesmos dados são mostrados como percentual de variação, em relação ao grupo sem pré-tratamento (N) considerado 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 as fêmeas intactas (teste de Kruskal-Wallis).

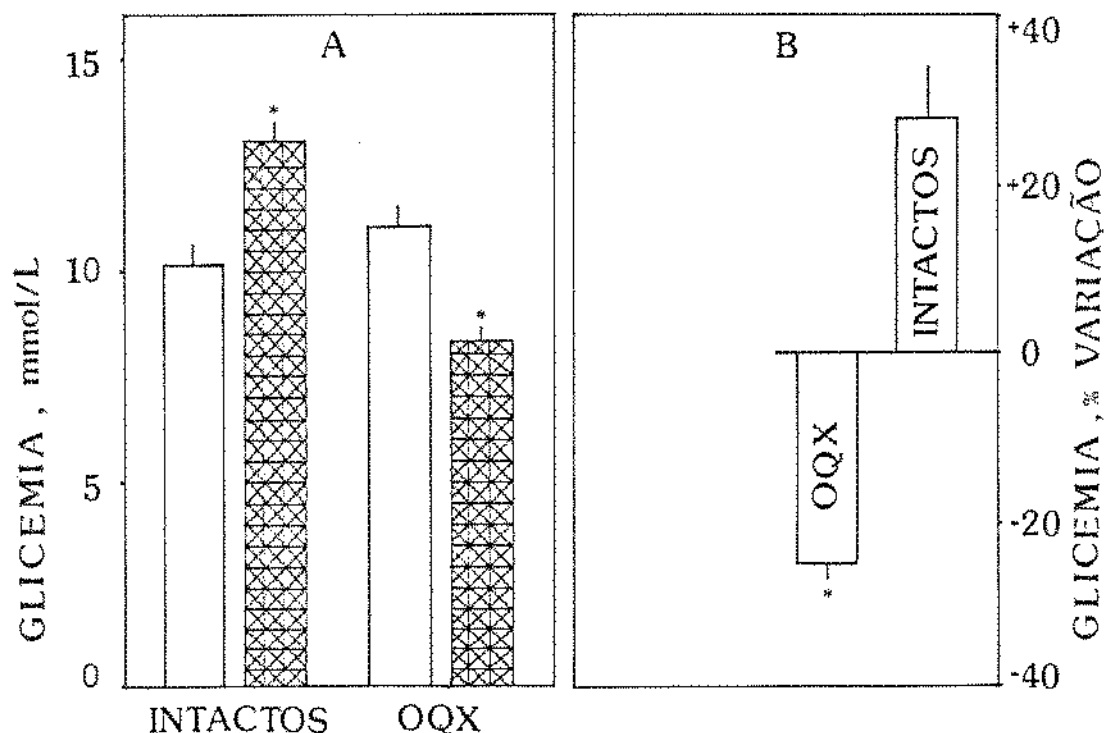


Figura 6. EFEITO DA ORQUIECTOMIA SOBRE A HIPERGLICEMIA PRODUZIDA PELA CON A EM RATOS - Os animais castrados foram usados somente 21 dias após a cirurgia. A Con A (250 ug/kg, sc) foi injetada durante três dias com intervalos de 24 h entre as doses. Os animais dos grupos Controles receberam, ao invés da lectina, volumes equivalentes de veículo. A glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por punção cardíaca 24 h após o último tratamento com a lectina ou veículo. No painel A, estão representados os valores médios da glicemia (mmol/L) dos machos intactos e machos castrados nos grupos CONTROLE (□) e TRATADO (⊠). No painel B, estes mesmos dados são mostrados como percentual de variação em relação ao grupo sem pré-tratamento (N) considerado 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 machos intactos (teste de Kruskal-Wallis).

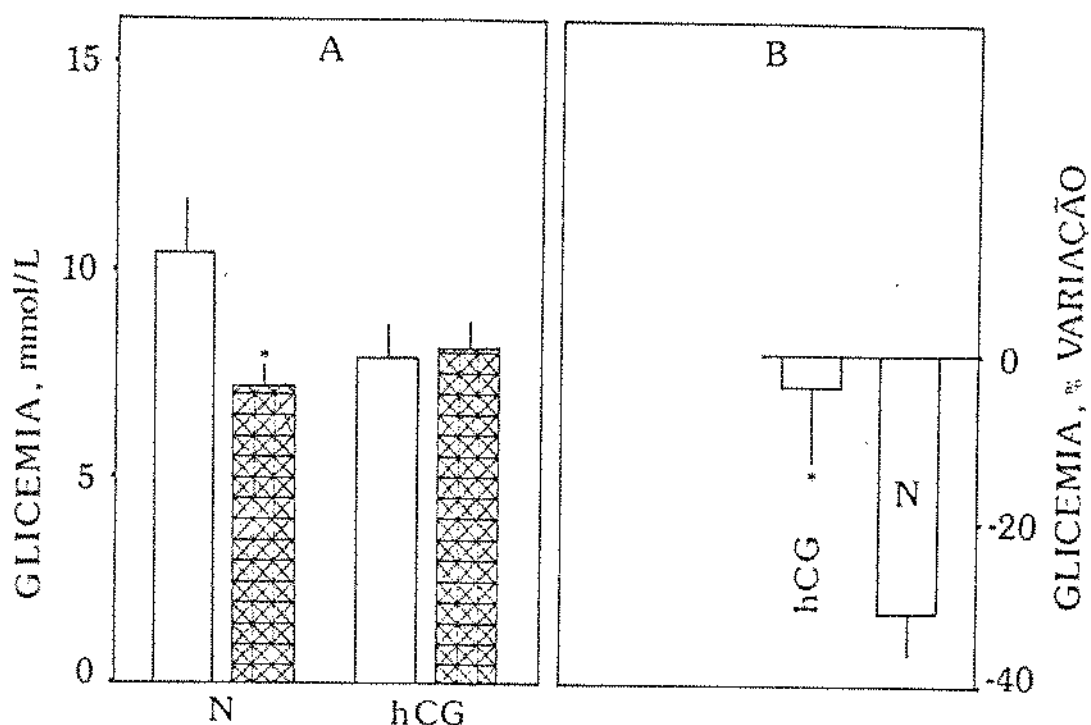


Figura 7. INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM GONADOTROFINA CORIÔNICA SOBRE A HIPOGLICEMIA PRODUZIDA POR CON A EM RATOS FEMEAS INTACTOS - A Gonadotrofina Coriônica (hCG) (40 UI/kg, *im*) foi injetada 6 h antes do tratamento com Con A (250  $\mu$ g/kg, *iv*). Os animais dos grupos Controle receberam, ao 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 hCG nos grupos CONTROLE ( $\square$ ) e TRATADO ( $\boxtimes$ ). No painel B, estes mesmos dados são mostrados como percentual de variação em relação ao grupo sem pré-tratamento considerado 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).

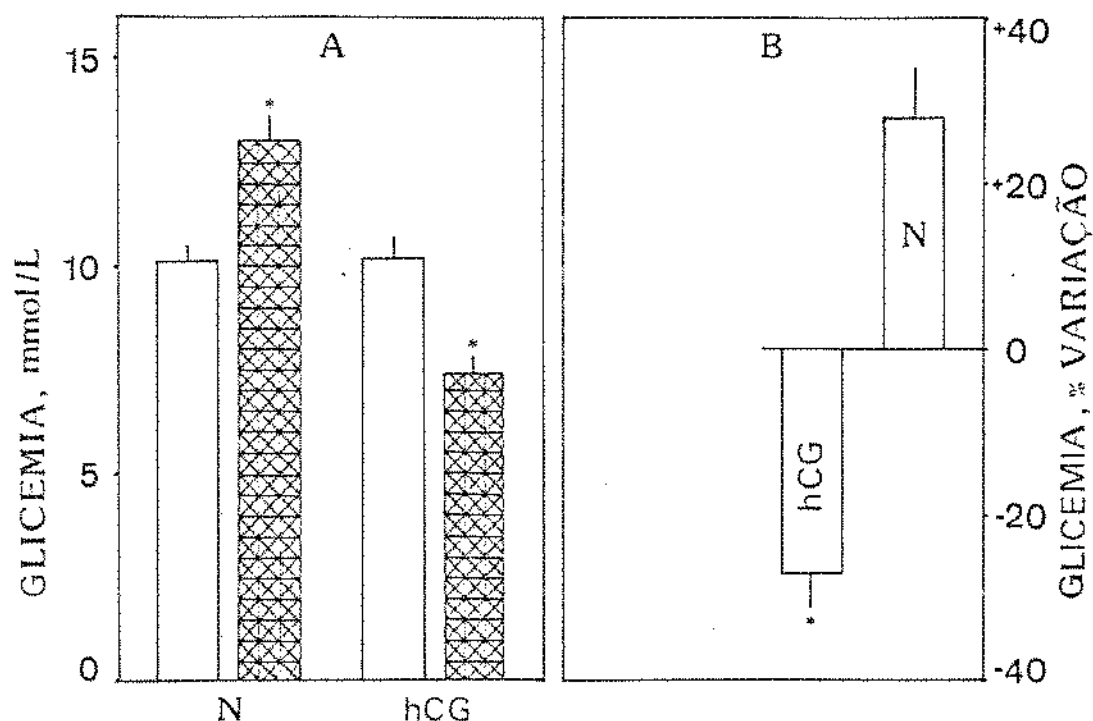


Figura 8. INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM GONADOTROFINA CORIÔNICA SOBRE A HIPERGLICEMIA PRODUZIDA POR CON A EM RATOS MACHOS INTACTOS - A Con A (250 ug/kg, sc) ou volumes equivalentes de veículo (grupo Controle) foram injetadas durante três dias seguidos a cada 24 h. Seis horas antes deste tratamento, os animais receberam gonadotrofina coriônica (hCG 40 UI/kg, im). 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 médios da glicemia (mmol/L) dos animais sem pré-tratamento (N) e dos pré-tratados com hCG nos grupos CONTROLE (□) e TRATADO (⊠). No painel B, estes mesmos dados são mostrados como percentual de variação em relação ao grupo sem pré-tratamento considerado 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 ao animais sem pré-tratamento (teste de Kruskal-Wallis).

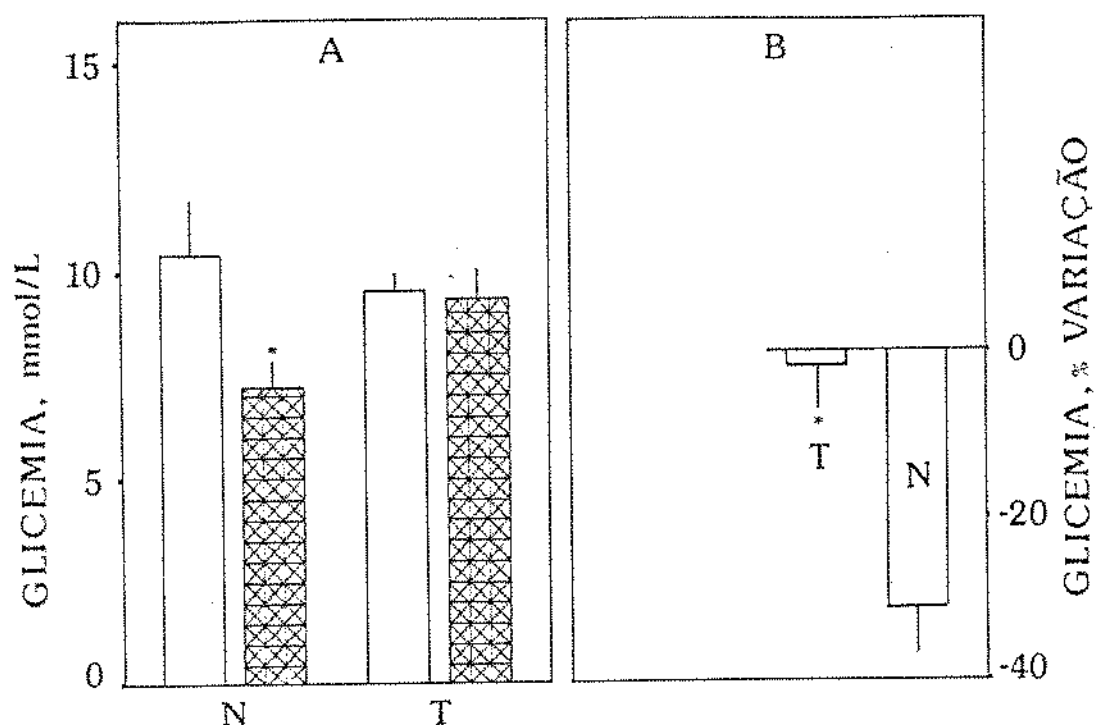


Figura 9. EFEITO DO TRATAMENTO COM TESTOSTERONA SOBRE A ALTERAÇÃO GLICÊMICA PRODUZIDA POR CON A EM RATOS FÊMEAS INTACTOS - A testosterona (T 10 mg/kg, im) foi injetada durante dez dias a cada 72 h. A Con A (250 ug/kg, iv) foi administrada no último dia do tratamento hormonal. Os animais dos grupos Controle receberam, ao invés da lectina, volumes equivalentes de veículo. A glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por punção cardíaca 20 minutos após a última injeção 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 T nos grupos CONTROLE (□) e TRATADO (⊠). No painel B, estes mesmos dados são mostrados como percentual de variação em relação ao grupo sem pré-tratamento considerado 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).



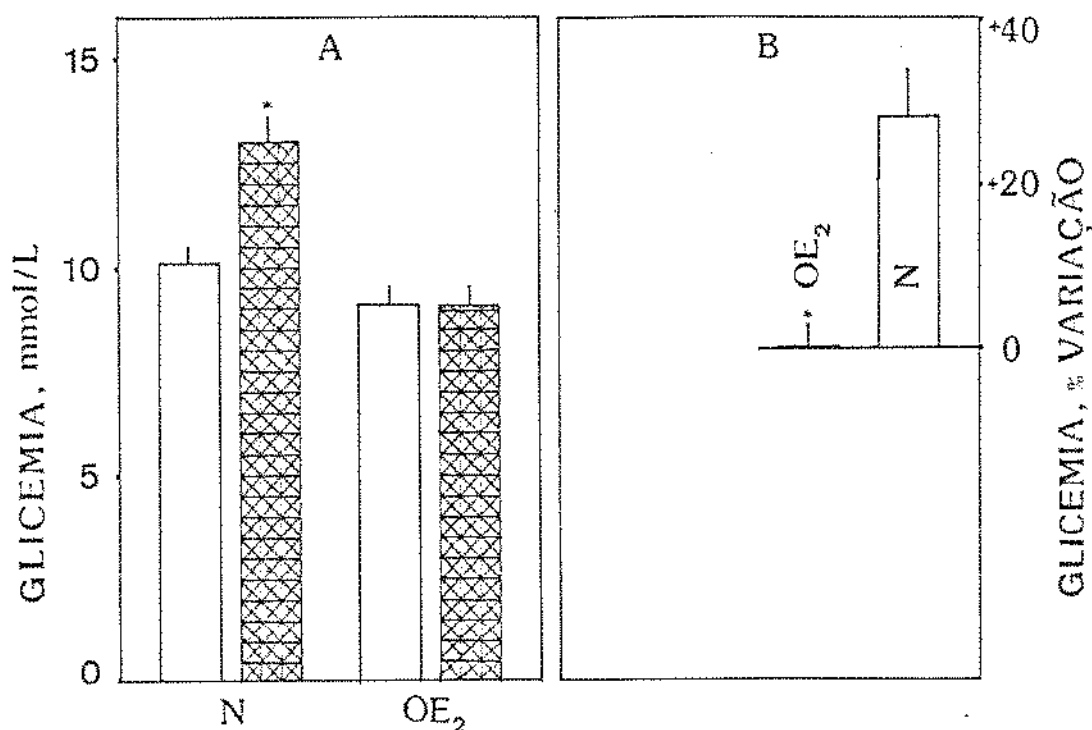


Figura 10. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ESTRADIOL SOBRE O EFEITO GLICÊMICO PRODUZIDO POR CON A EM RATOS MACHOS INTACTOS - O estradiol (OE<sub>2</sub> 100 ug/kg, im) foi injetado durante dez dias a cada 72 h. A Con A (250 ug/kg, sc) ou volumes equivalentes de veículo (grupo Controle) foram administrados nos últimos três dias do tratamento hormonal com intervalos de 24 h entre as doses. A glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por punção cardíaca 24 h após a última injeção de lectina ou veículo. No painel A, estão representados os valores médios da glicemia (mmol/L) dos animais sem pré-tratamento (N) e dos pre-tratados com OE<sub>2</sub> nos grupos CONTROLE (□) e TRATADOS (⊠). No painel B, estes mesmos dados são mostrados como percentual de variação em relação ao grupo sem pré-tratamento que foi considerado como 100%. Cada barra representa a média ± 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).

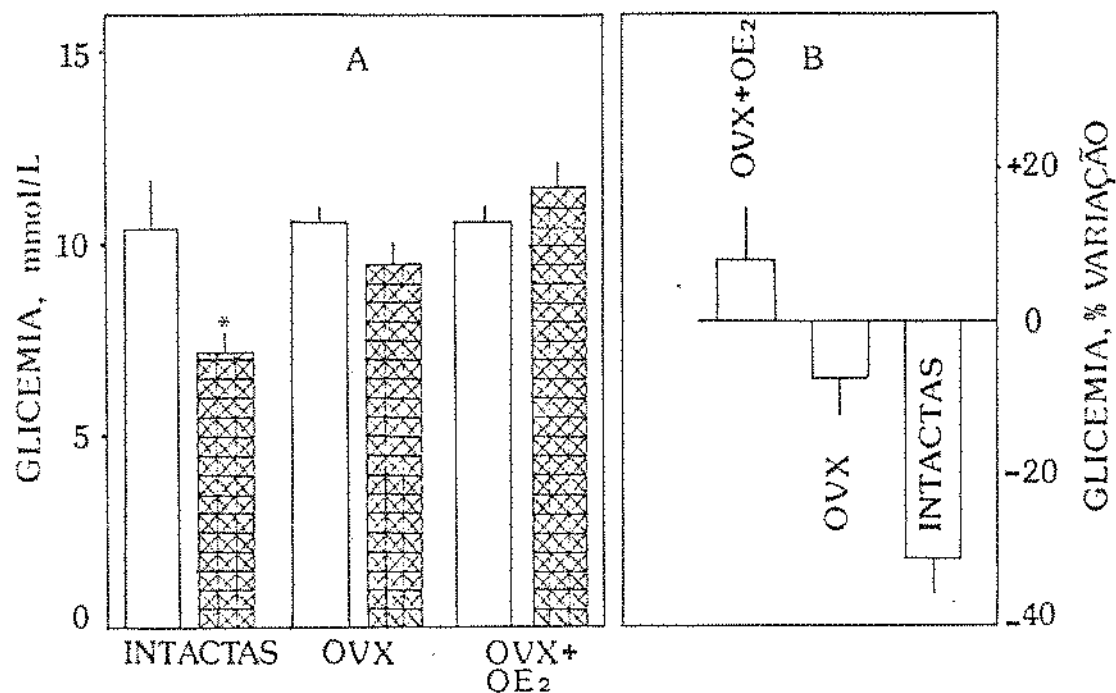


Figura 11. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO HORMONAL COM ESTRADIOL SOBRE A ALTERAÇÃO GLICÊMICA PRODUZIDA POR CON A EM RATOS FÊMEAS OVARIETOMIZADAS - Os animais castrados foram usados somente 21 dias após a cirurgia. O estradiol (OE<sub>2</sub> 100 ug/kg, im) foi injetado durante dez dias a cada 72 h. A Con A (250 ug/kg, iv) foi administrada no último dia do tratamento hormonal. 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 a injeção com a lectina ou veículo. No painel A, estão representados os valores médios da glicemia (mmol/L) das fêmeas intactas; fêmeas castradas e fêmeas castradas com reposição hormonal nos grupos CONTROLE (□) e TRATADO (⊠). No painel B, estes mesmos dados são mostrados como percentual de variação em relação ao grupo (fêmeas intactas) considerado como 100%. Cada barra representa a média ± 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 as fêmeas intactas (teste de Kruskal-Wallis).

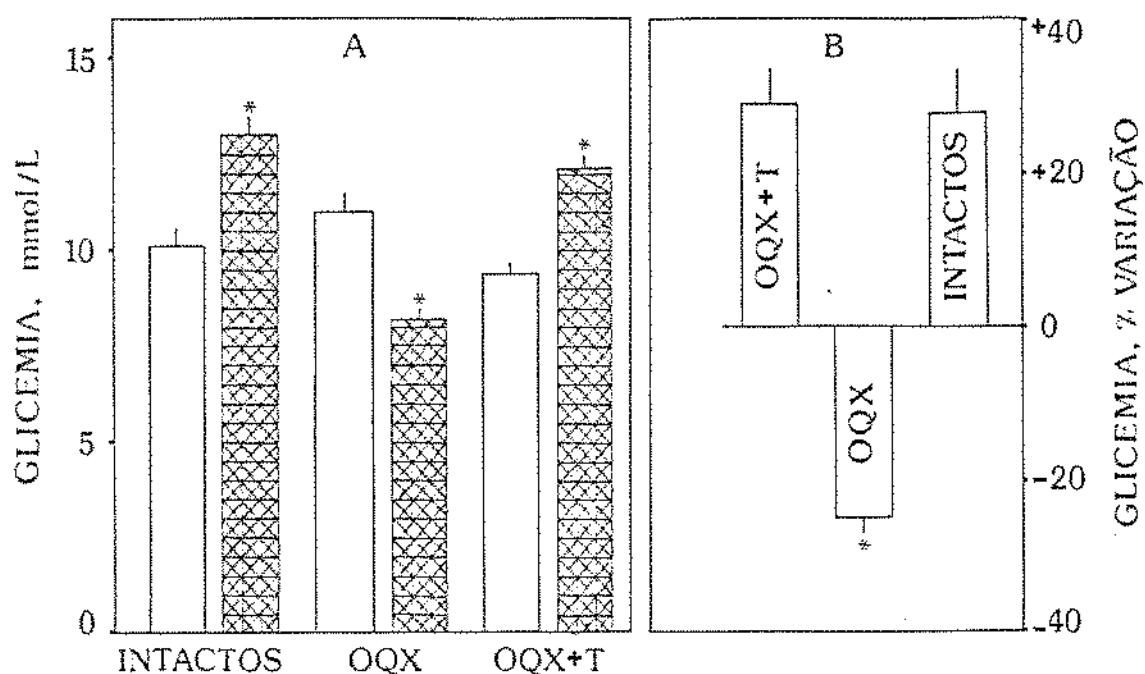


Figura 12. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO HORMONAL COM TESTOSTERONA SOBRE A ALTERAÇÃO GLICÊMICA PRODUZIDA POR CON A EM RATOS MACHOS ORQUIECTOMIZADOS - Os animais castrados foram usados somente 21 dias após a castração. A testosterona (T 10 mg/kg, im) foi injetada durante dez dias a cada 72 h. A Con A (250 µg/kg, sc) ou volumes equivalentes de veículo (grupo Controle) foram administradas nos últimos três dias do tratamento hormonal com intervalos de 24 h entre as doses. A glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por punção cardíaca 24 h após a última injeção de lectina ou veículo. No painel A, estão representados os valores médios de glicemia (mmol/L) dos machos intactos, machos castrados e machos castrados com reposição hormonal nos grupos CONTROLE (□) e TRATADO (⊗). No painel B, estes mesmos dados são mostrados como percentual de variação em relação ao grupo (machos intactos) considerado como 100%. Cada barra representa a média ± 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 machos intactos (teste de Kruskal-Wallis).

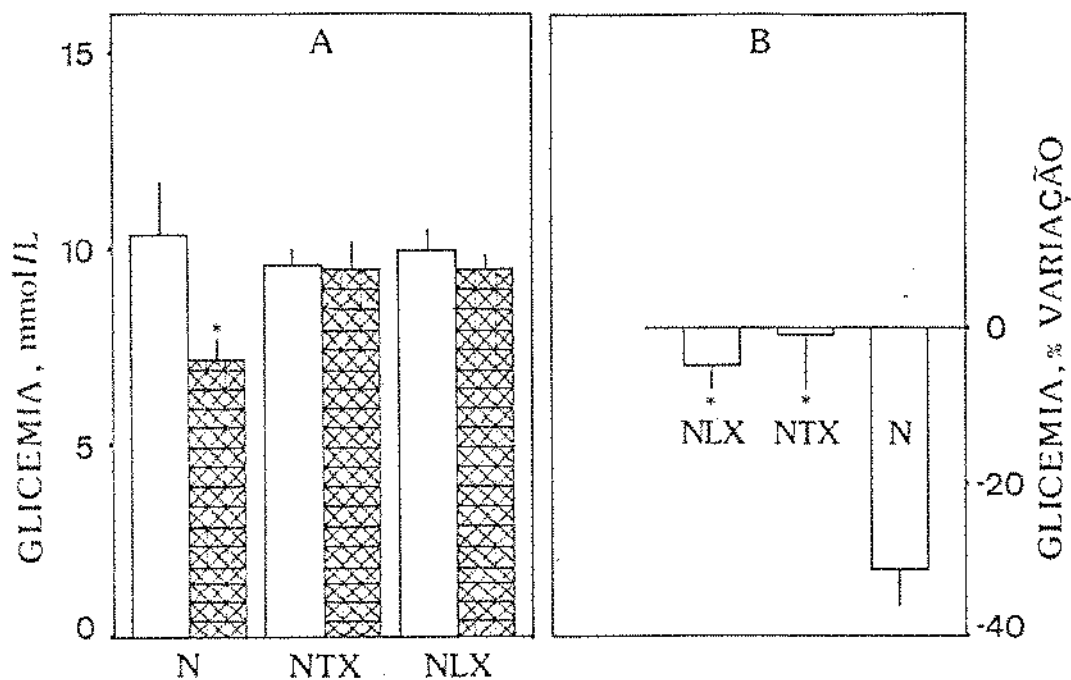


Figura 13. INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM ANTAGONISTAS OPIÓIDES SOBRE A HIPOGLICEMIA PRODUZIDA POR CON A EM RATOS FÊMEAS INTACTOS - O naloxone (NLX 1 mg/kg, sc) ou naltrexone (5 mg/kg, sc) foram injetados 20 minutos antes da Con A (250 µg/kg, iv) ou veiculo. A glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por punção cardíaca 20 minutos após este tratamento. No painel A, estão representados os valores médios da glicemia (mmol/L) dos animais sem pré-tratamento (N) e dos pré-tratados com NLX ou NTX nos grupos CONTROLADO (□) e TRATADO (⊗). No painel B, estes mesmos dados são mostrados como percentual de variação em relação ao grupo sem pré-tratamento considerado 100%. Cada barra representa a média ± 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).

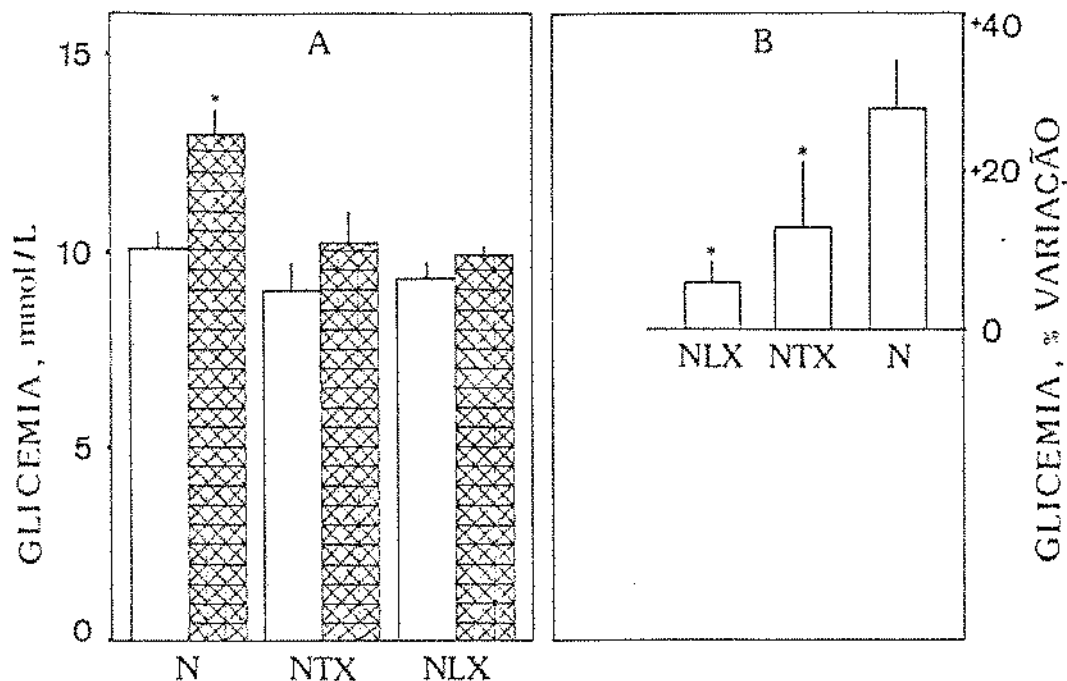


Figura 14. INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM ANTAGONISTAS OPIÓIDES SOBRE A HIPERGLICEMIA PRODUZIDA POR CON A EM RATOS MACHOS - A Con A (250 ug/kg,  $\pm$ SE) ou volumes equivalentes de veículo (grupo Controle) foram administradas durante três dias seguidos a cada 24 h, 20 minutos antes de cada dose de Con A ou veículo os animais receberam naloxone (NLX 1 mg/kg,  $\pm$ SE) ou naltrexone (NTX 5 mg/kg,  $\pm$ SE). A glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por punção cardíaca 24 h após a última injeção de 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 NLX ou NTX nos grupos CONTROLE (□) e TRATADO (⊗). No painel B, estes mesmos dados são mostrados como percentual de variação em relação ao grupo sem pré-tratamento considerado 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).

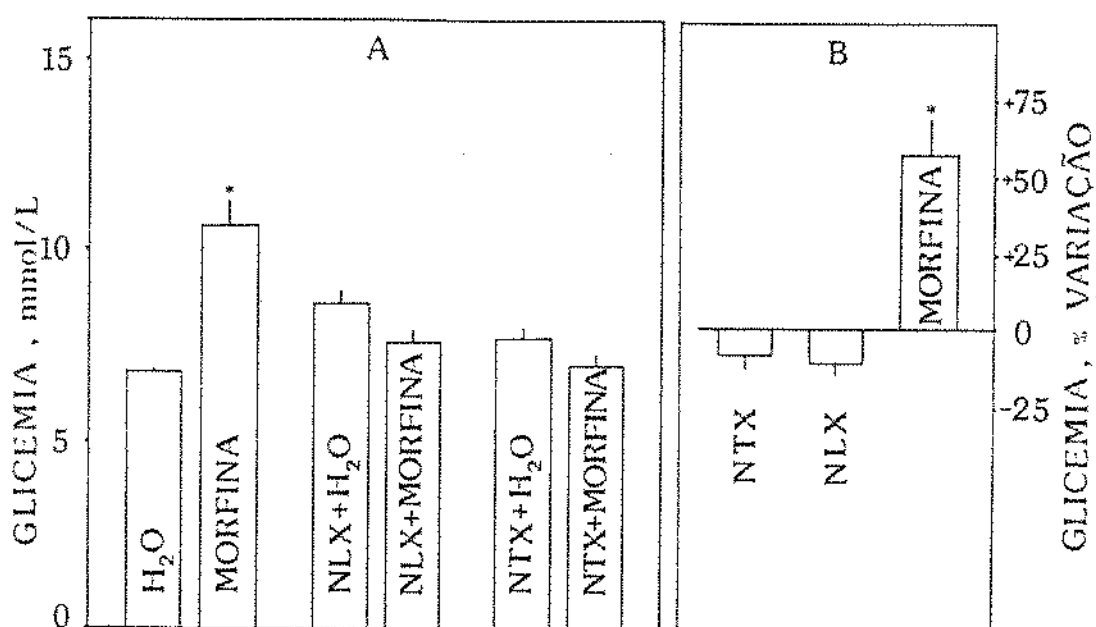


Figura 15. CONTROLE POSITIVO COM MORFINA EM RATOS FÊMEAS - A morfina (10 mg/kg) foi injetada *ip.* Os animais do grupo Controle receberam, ao invés da morfina, volumes equivalentes de veículo (H<sub>2</sub>O dest. estéril). O naloxone (NLX 1 mg/kg, *sc.*) ou naltrexone (NTX 5 mg/kg, *sc.*) foram injetados 20 minutos antes da morfina ou veículo. A glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por punção cardíaca 30 minutos após o tratamento com a morfina ou veículo. No painel A, estão representados os valores médios da glicemia destes animais expressos como valores absolutos em (mmol/L). No painel B, estes mesmos valores são mostrados como percentual de variação em relação ao grupo tratado com morfina considerado 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 tratados com morfina (teste de Kruskal-Wallis).

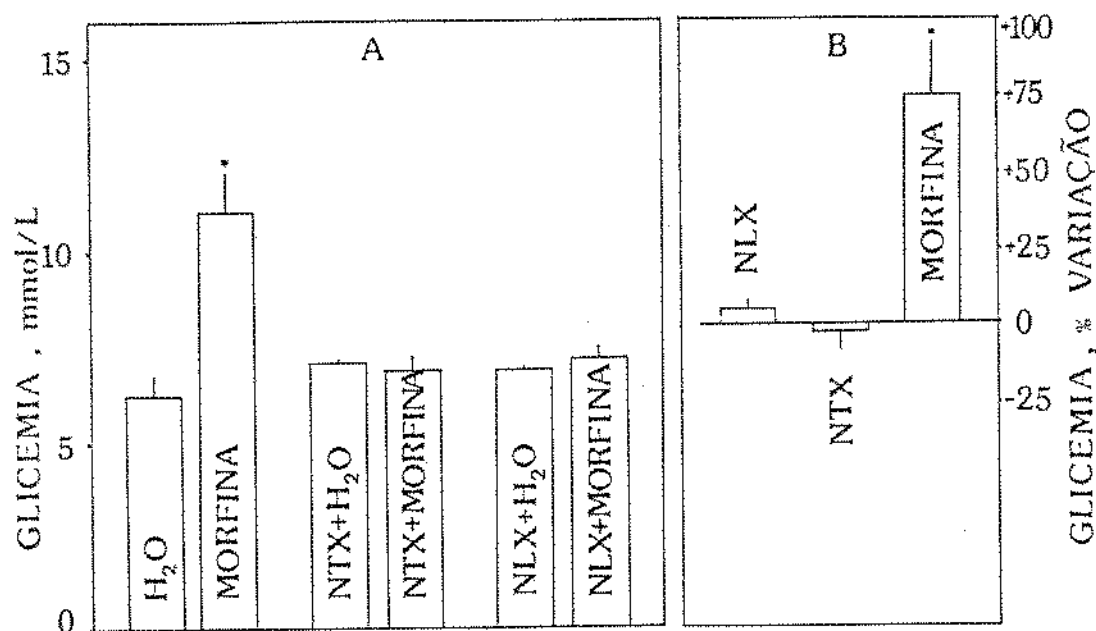


Figura 16. CONTROLE POSITIVO COM MORFINA EM RATOS MACHOS - A morfina (10 mg/kg) foi injetada ip. Os animais do grupo Controle receberam, ao invés da morfina, volumes equivalentes de veículo (H<sub>2</sub>O dest. estéril). O naloxone (NLX 1 mg/kg, sc) ou naltrexone (NTX 5 mg/kg, sc) foram injetados 20 minutos antes da morfina ou veículo. A glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por punção cardíaca 30 minutos após o tratamento com morfina ou veículo. No painel A, estão representados os valores médios da glicemia destes animais expressos como valores absolutos em (mmol/L). No painel B, estes mesmos valores são mostrados como percentuais de variação em relação ao grupo tratado com morfina considerado 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 tratados com morfina (teste de Kruskal-Wallis).

## 5. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que as alterações glicêmicas observadas em machos e fêmeas intactos tratados com Con A não se manifestaram nos animais gonadectomizados, indicando que os hormônios sexuais têm um papel importante nestas alterações. Demonstramos, também, o bloqueio deste fenômeno por NLX ou NTX o que sugere um envolvimento de opióides nestas alterações.

Nossa tentativa de usar o tratamento crônico para acentuar as alterações glicêmicas sexo-dependentes já observadas com Con A anteriormente (Melo-Lima e Ribeiro-DaSilva, 1993) produziu resultados inesperados, que parecem envolver a farmacocinética da lectina. Por outro lado, estes resultados, embora sejam sexo-dependentes, parecem não envolver os hormônios sexuais e independem do fato de termos usado vias de administração diferentes no macho *sc* e na fêmea *ix* pois, conforme mostram os nossos dados descritos na pg 24, não observamos variações glicêmicas, tanto nos machos castrados que receberam Con A *ix* como nas fêmeas ovariectomizadas tratadas com Con A por via *sc*.

Não existem na literatura dados muito concretos sobre a farmacocinética da Con A, pois a grande maioria dos



estudos com esta lectina têm sido feitos *in vitro* por bioquímicos, biólogos celulares e imunologistas. Alguns autores como Nirmul e col. (1972, 1976) e Nopanitaya e col. (1976), preocupados em avaliar no camundongo *in vivo* os efeitos imunossupressores e a toxicidade da Con A, estudaram secundariamente a distribuição da lectina em vários órgãos e tecidos administrando-a em doses únicas e altas através de diferentes vias. Estes autores verificaram que, após a injeção *ix* de Con A marcada com  $I^{125}$  detectava-se muito rapidamente altas concentrações da lectina no sangue, fígado, nódulos linfáticos, timo e baço. Por via *ip* ou *sc*, a lectina foi encontrada nestes mesmos órgãos, embora sua distribuição tenha sido mais lenta e as concentrações encontradas, mais baixas. Além de uma nítida lesão hepática, como referimos na Introdução (ver pg. 4), esses autores encontraram também nesses animais com Con A sinais evidentes de toxicidade nos nódulos linfáticos e baço, porém o timo parece ter sido poupado. Contudo, estes trabalhos foram feitos somente em animais machos e, portanto, não foi possível encontrarmos neles uma explicação plausível para esta sexo-diferença na farmacocinética da Con A sugerido pelos nossos dados.

Além do elenco de efeitos que a Con A e a CNTX possuem em comum como citamos na Introdução desta Tese, os resultados obtidos em nossos experimentos mostraram que ambas produzem no rato alterações glicêmicas

sexo-dependentes bastante semelhantes. Assim, do mesmo modo como foi descrito para a CNTX por Fiores-Barbosa e Ribeiro-DaSilva (1989), nossos resultados mostraram que a castração de ratos machos ou fêmeas afeta nitidamente essas alterações glicêmicas sexo-dependentes (Fig. 5 e 6). Fato idêntico a este ocorreu quando demonstramos que houve um bloqueio dessas alterações induzidas por Con A em ratos machos e fêmeas intactos previamente tratados com hCG (Fig. 7 e 8). A hipoglicemia induzida por CNTX em ratos fêmeas intactos é inibida por T e não se manifesta nos animais prenhes pois, como mostraram Warsaw e col. (1986) a placenta destes animais secreta este hormônio androgênico (Fiores-Barbosa e Ribeiro-DaSilva, 1989). Como os resultados obtidos em nossos experimentos mostraram que a T também inibiu a hipoglicemia induzida por Con A em ratos fêmeas intactos (Fig. 9), esta foi outra semelhança que pudemos detectar no envolvimento de hormônios sexuais sobre as alterações produzidas por Con A e CNTX nos níveis de glicose circulante. Finalmente, a existência de um paralelismo entre os efeitos glicêmicos produzidos por estas duas substâncias foi também evidenciada quando mostramos que antagonistas opióides, como NLX e o NTX, bloquearam estas alterações (Fig. 13 e 14), da mesma forma como já demonstrado anteriormente para a CNTX por Ribeiro-DaSilva e Prado, (1993).

Como a CNTX foi descrita há pouco tempo, as informações sobre sua estrutura e sua farmacocinética são muito escassas (Carlini e Guimarães, 1994). Todavia, a grande diversidade de efeitos que esta toxina induz *in vivo* (Ribeiro-DaSilva e col., 1986; Collares e Ribeiro-DaSilva, 1988; Ribeiro-DaSilva e col., 1989a,b,c; Ribeiro-DaSilva e Prado, 1989; Pires-Barbosa e Ribeiro-DaSilva, 1989; Ribeiro-DaSilva e col., 1992; Ribeiro-DaSilva e Prado, 1993) sugere que eles sejam produzidos por um ou mais dos seus metabólitos. A CNTX e a Con A parecem ter semelhanças estruturais sendo ambas metaloproteínas compostas de sub-unidades (Carlini e col., 1990; Edelman e col., 1972). Considerando-se este fato, é possível que estas duas substâncias possuam também algum(ns) metabólito(s) em comum. Portanto, isto poderia explicar mais esta semelhança que estamos descrevendo entre os efeitos dessas duas proteínas.

A hiperglicemia induzida pela morfina era classicamente atribuída a liberação de catecolaminas da medula adrenal (Feldberg e Shaligram, 1972). Recentemente porém, Ipp e col. (1978, 1980) demonstraram que a morfina e a beta-endorfina são estímulos poderosos para a secreção de glucagon e insulina. Esses autores aventaram a possibilidade da existência de receptores opióides nas ilhotas de Langerhans, fato este, reforçado pelos trabalhos de vários outros pesquisadores (Beaumont e Hughes, 1979; Heites e col., 1979; Alder, 1981; Reid e Yen, 1981; Green e

Tadagyon, 1988). As concentrações de beta-endorfina do plasma e da hipófise anterior em ratos de ambos os sexos são significativamente reduzidas três semanas após a gonadectomia (Petraglia e col., 1982; Wardlaw e col., 1982; Sarker e Yen, 1985). Como nossos dados mostraram que as alterações da glicose sanguínea desapareceram completamente nos animais castrados que três semanas após foram tratados com Con A, isto sugere fortemente que este poderia ser um fenômeno relacionado com beta-endorfina. Além disso, de acordo com vários autores, os efeitos dos opióides endógenos são também sexo-dependentes (Morley, 1981; Frohman, 1983). Por esta razão, isto poderia explicar a discrepância nos níveis de glicose sanguínea que nós obtivemos em ratos machos e fêmeas tratados com Con A pois, de acordo com nossos dados, os efeitos glicêmicos sexo-dependentes da Con A parecem ser também mediados por opióides pois foram inibidos por NLX e NTX (Fig. 13 e 14).

A castração aumenta os níveis circulantes de gonadotrofinas tanto em animais machos como em fêmeas (McCann, 1974). Este fato poderia explicar a acentuada inibição das mudanças de níveis glicêmicos induzidas por Con A que nós observamos tanto nos ratos machos como nas fêmeas previamente tratadas com hCG. Portanto, as alterações produzidas por Con A parecem ser, também, moduladas por gonadotrofinas.

Os esteróides gonadais influenciam fortemente a

secreção de gonadotrofinas e a terapia de reposição hormonal com estes esteróides pode normalizar o aumento de gonadotrofinas observado em animais castrados (McCann, 1974). Nossos dados mostram um nítido bloqueio das alterações glicêmicas induzidas por Con A pela castração de de ratos machos, este bloqueio foi revertido pela reposição de T, isto reforça a probabilidade de que realmente as gonadotrofinas estejam envolvidas nestas alterações. No entanto, este mesmo fato deixou de ser observado nas fêmeas castradas submetidas a reposição com  $OE_{22}$ ; isto porém, não invalida a nossa hipótese pois poderia estar somente relacionado com o esquema que usamos para reposição deste esteróide. Todavia, é interessante observar que em animais INTACTOS, tanto a hiperglicemia do macho como a hipoglicemia da fêmea foram bloqueadas usando-se as mesmas doses e esquemas de tratamento com  $OE_{22}$  e T, respectivamente (Fig. 9 e 10). Também não deixa de ser intrigante verificar que a T usada neste mesmo esquema hormonal não foi eficiente em animais castrados tratados com CNTX (Fires-Barbosa e Ribeiro-DaSilva, 1989). É possível portanto que, em relação a Con A, a T tenha um papel ainda mais relevante.

Em camundongos machos a Con A produz hipoglicemia (Nirmul e col., 1976) porém, nossos dados mostraram uma resposta hiperglicêmica em ratos machos tratados com Con A (Fig. 3). Este fato poderia ser apenas explicado como uma variação deste fenômeno relacionada com o uso de espécies

animais diferentes. Estes autores trabalharam porém, com doses de Con A muito altas (cerca de 13 mg/kg, ou seja, doses 52 vezes maiores do que a usada em nossos experimentos) o que produziu no animal uma lesão hepática severa identificada por eles tanto por exame histológico como por um aumento muito grande da SGOT (transaminase glutâmico oxalacético). Desde que uma lesão hepática como esta leva a uma queda dos níveis circulantes de glicose (Cryer, 1985), é bem possível que esta hipoglicemia relatada por Nirmul e col. (1976) em camundongos machos tratados com Con A seja somente um reflexo de uma hepatotoxicidade devido ao uso de doses muito altas da lectina.

A Con A e várias outras lectinas possuem atividade insulino-miméticas (Cuatrecasas e Tell, 1973; Czech e col., 1974; Katzen e col., 1981). A T parece dificultar a secreção de insulina (Renaud e Suerdlik, 1975), enquanto os estrógenos (Costrini e Kalkhoff, 1971) e a progesterona (Ashby e col., 1978) potenciam a resposta secretora das células beta. Isto poderia explicar porque somente os ratos fêmeas tratados com Con A tiveram hipoglicemia. Além disso, a hipoglicemia induzida por Con A em ratos fêmeas intactos foi atenuada quando os animais foram previamente tratados com T (Fig. 9).

Diante dos resultados obtidos nesta Tese nós concluímos que os hormônios sexuais e, muito provavelmente, os opióides estão envolvidos com as alterações glicêmicas sexo-dependentes produzidas por Con A no rato.

## 6. CONCLUSÕES

Nossos dados sugerem que as alterações glicêmicas induzidas por Con A em ratos têm controle hormonal e, são provavelmente moduladas por opióides endógenos.

## 6. RESUMO

- A Con A administrada em ratos induziu alterações glicêmicas sexo-dependentes.

- Estas alterações variaram de acordo com o esquema de administração usado. No esquema AGUDO ratos FÊMEAS apresentaram hipoglicemia, enquanto que no esquema CRÔNICO ratos MACHOS apresentaram hiperglicemia.

- A castração de ratos FÊMEAS bloqueou de forma eficiente a hipoglicemia observada anteriormente.

- O pré-tratamento de ratos FÊMEAS ou MACHOS intactos com hCG reproduziu resultados semelhantes aqueles obtidos com animais gonadectomizados.

- A castração de ratos MACHOS inverteu o efeito hiperglicêmico induzido anteriormente por Con A, esses dados denotam uma hipoglicemia que é semelhante à resposta de machos pré-tratados com hCG.

- O pré-tratamento de ratos FÊMEAS intactos com T inibiu a hipoglicemia produzida por Con A.



- O tratamento de ratos MACHOS intactos com  $OE_{2a}$  inibiu a hiperglicemia produzida por Con A.

- O nítido bloqueio da hiperglicemia produzida por Con A no MACHO castrado foi revertido pela reposição de T, no entanto este mesmo fato não foi observado em FÊMEAS castradas com reposição de  $OE_{2a}$ .

- O pré-tratamento de ratos FÊMEAS com NLX ou NTX foi capaz de inibir a hipoglicemia que esses animais apresentavam quando tratados AGUDAMENTE com Con A.

- O pré-tratamento de ratos MACHOS intactos com NLX ou NTX inibiu a hiperglicemia que esses animais apresentavam quando tratados CRONICAMENTE com Con A.

## 8. SUMMARY

- Con A administration in rats produced sex-dependent glycaemic changes which varied according to the protocol employed. Following acute treatment with Con A, female rats developed hypoglycaemia while chronic treatment resulted in male animals which were hyperglycaemic.

-In ovariectomized rats, the hypoglycaemic response was effectively abolished while the treatment of non-ovariectomized females with hCG reproduced the effect observed in castrated females.

- Castration in males inverted the hypoglycaemic response induced by Con A to a hypoglycaemia while was similar to that seen in non-castrated males treated with hCG.

- Pretreatment of non-castrated females with T inhibited the hypoglycaemia induced by Con A. T was also able to reverse the inhibition of Con A-induced hypoglycaemia in castrated males.

- In non-castrated males  $OE_{21}$  inhibited the hyperglycemia produced by Con A, but in castrated females  $OE_{21}$  was unable to restore the hypoglycemic response.

- Pretreatment of female rats with NLX and NTX was able to inhibit the hypoglycemia observed following acute treatment with Con A. Likewise, NLX and NTX were able to inhibit the hyperglycemia in males after chronic treatment with Con A.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, M.W. Opioid peptides. *Life Sciences*, 24: 497-510, 1980.
- ASHBY, J.F.; AMIRCI, D.; BAIRD, J.D. Effect of progesterone on insulin secretion in the rat. *J. Endocrinol.*, 24: 479-486, 1978.
- BARJA-FIDALGO, C.; CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Role of resident macrophages in canatoxin induces *in vivo* neutrophil migration. *Inflammation*, 14: 1-16, 1992.
- BARJA-FIDALGO, C.; GUIMARÃES, J.A.; CARLINI, C.R. Canatoxin, a plant protein, induces insulin release from rat isolated pancreatic islets. *Endocrinology*, 128: 675-682, 1991.
- BEAUMONT, A.; HUGHES, J. Biology of opioid peptides. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 12: 245-267, 1979.

BELLVILLE, J.S.; WILLIAM, B.F.; GARY, F. A method for investigating the role of calcium in the shape change aggregation and serotonin release of rat platelets. *J. Physiol. (Lodon)*, 292: 289-296, 1979.

BENJAMIN, C.F.; CARLINI, C.R.; BARJA-FIDALGO, C. Pharmacological characterization of rat paw edema induced by canatoxin, the toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds. *Toxicon*, 32: 879-885, 1992.

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.

BLACKARD, W.; SMALL, E.; LUDERMAN, C. Inhibition of insulin binding by concanavalin A. *Metabolism*, 22: 691-697, 1980.

BOYD, W.C. The lectins: Their present status. *Vox Sang.*, 8: 1-32, 1963.

BROWN, J.C.; HUNT, R.C. Lectins. *Int. Rev. Cytol.*, 52: 277-349, 1978.

CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A. Isolation and characterization of a toxic protein protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon*, 12(5): 667-675, 1981.

CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A.; RIBEIRO, J.M.C. Platelet 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.; BARCELLOS, G.R.S.; BEATA-NEVES, A.D.U.; GUIMARÃES, J.A. Immunoreactivity for canatoxin and concanavalin A among proteins of leguminous seeds. *Phytochemistry*, 22: 25-30, 1988.

CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A. Plant and microbial toxic proteins as hemilectins: emphasis on canatoxin. *Toxicon*, 22: 791-806, 1991.

CARO, J.F.; AMATRUDA, J.M. Insulin receptors in hepatocytes postreceptor events mediate down regulation. *Science*, 210: 1029-1031, 1980.

COLLARES, C.B.; RIBEIRO-DeSILVA, B. Involvement of lipoxygenase and cyclo-oxygenase pathways in hypoxia and metabolic alkalosis produced by canatoxin in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 21: 107-110, 1988.

COSTRINI, N.V.; KALKHOFF, R.K. Relative effect of pregnancy, estradiol and progesterone on plasma insulin and pancreatic islet insulin secretion. *J. Clin. Invest.*, 52: 992-999, 1971.

DRYER, P.E. Glucose homeostasis and hypoglycemia. In: WILSON, J.P. & FOSTER, W.B. (Editors), *Williams textbook glucose levels after glucose or insulin*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 12: 335-340, 1985.

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.

CUATRECASAS, P.; TELL, G.F.E. Insulin-like activity of concanavalin A wheat germ agglutinin - Direct interactions with insulin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 70: 485-489, 1973.

CZECH, M.P.; LANRENCE, J.C.Jr.; LYNN, W.S. Activation of hexose transport by concanavalin A in isolated brown fat cells. *J. Biol. Chem.*, 242: 7499-7505, 1974.

EDELMAN, G.M.; CUNNINGHAM, B.A.; REEKE, J.R.; BECKER, J.W.; WAXDAL, N.J.; WANG, J.L. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)*, 62: 2580-2584, 1972.

FELDBERG, W.; SNALIGRAM, S.V. The hiperglycaemic effect of morphine. *Br. J. Pharmacol.*, 45: 602-618, 1972.

FROHMAN, L.A. Glucorregulation. In: Krieger, D.T.; BROWNSTEIN, M.J.; MARTIN, J.B. (Editors), *Brain Peptides*. John Wiley & Sons, New York, 281-299, 1980.

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.; HAYES, C.E. The lectins carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 35: 127-340, 1978.



GOLDSTEIN, I.J.; PORETZ, R.D. Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: LIENER, I.E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I.J. The Lectins, Properties, functions and applications in biology and medicine, Academic Press, Orlando, 1986. p 35-244.

GRASSI-KASSISSE, D.M.; RIBEIRO-DaSILVA, G. Canatoxin triggers histamine secretion from rat peritoneal mast cells. Agents Actions, 32: 204-209, 1992.

GREEN, I.C.; TADAYYON, M. Opiate-Prostaglandin interactions in the regulation of insulin secretion from rat islets of Langerhans *in vivo*. Life Sciences, 42: 2123-2130, 1988.

HAMAGUCHI, Y.; YAGI, N.; NISHINO, A.; KOCHIZUKI, T.; MIYOSHI, M. The isolation and characterization of a lethal protein from kintoki beans (*Phaseolus vulgaris*). J. Nutr. Sci. Vitam., 23: 525-534, 1977.

IFP, E.; DOBBS, R.; UNGER, R.H. Morphine and beta-endorphin influence the secretion of the endocrine pancreas. Nature, 226: 190-191, 1970.

IPP, E.; SCHUSDZIARRA, V.; HARRIS, V.; UNGER, R.H.

Morphine-induced hyperglycemia: Role of insulin and glucagon. *Endocrinology*, **102**: 461-463, 1980.

ISHIGURO, K.; TAKAHASHI, T.; FUNATSU, K.; FUNATSU, K.

Biochemical studies on Ricin , I Purification of ricin. *J. Biochem.*, **45**: 587 - 592, 1964.

JOJANSEN, D.; TONNESEN, T.; JENSEN, T.; JORDE, R.;

BURHOL, P.G; REIKERAS, O. Increments in glucose, glucagon and insulin after morphine in rats, and naloxone blocking of this effect. *Life Sciences*, **51**: 1237-1242, 1992.

KATZEN, H.M.; VICARIO, P.P.; MUMFORD, 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); Boston, 1990. p 269-293.

KOCOUREK, J. Historical background. In: The Lectins, Properties functions, and applications in biology and medicine. (Editors). Academic Press, INC, New York, USA., 1986. p 1-32.

KURET, J.A.; MURED, F. Hormônios da adeno-hipófise e substâncias correlatas. In: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. GOODMAN & GILMAN. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan SA (ed), 1990. p 889-905.

LOWELL WINE, R. Analysis of varience - one-way classification. In: Statistics for scientists & engineers. USA, Prentice-Hall of India (Private) LTD (ed), 1966. p 311-365.

MAIER, V.; SCHNEIDER, C.; SCHATZ, H.; PFEIFFER, E.E. Interactions of concanavalin A with isolated pancreatic islets. Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie, 354: 887-894, 1975.

KcANN, S.M.; Endocrinology. In: Greep, R.O. and ASTWOOD, E.B. (Editors), Handbook of Physiology. Williams and Wilkins, Baltimore, p 711-731, 1974.

MEITES, J.; BRUNI, J.F.; VAN VOGT, D.A.; SMITH, A.F.

Relation of endogenous opioid peptides and morphine to neuroendocrine functions. *Life Sciences*, 24: 1325-1336, 1979.

HELO-LINA, M.H.; RIBEIRO-DASILVA, G. Comparative studies

on the alterations of rat carbohydrate metabolism produced by concanavalin A and canatoxin. *Toxicol*, 31:151-152, 1993.

MORLEY, J.E. The endocrinology of the opiates and opioid peptides. *Metabolism*, 30: 195-209, 1981.

NICOLSON, G. L.; BLAUSTEIN, J.; ETZLER, M.

Characterization of two plant lectins from *Nicotiana glauca* and their quantitative interaction with a murine lymphoma. *Biochemistry*, 13: 196-204.

NIRMUL, G.; SEVERIN, C.; TAUB, R.N. In vivo effects of concanavalin A. *Transplantation*, 14: 91-95, 1972.

NIRMUL, G.; SEVERIN, C.; TAUB, R.N. In vivo effects of Concanavalin A. II. Distribution, Histopathologic changes, and toxicity. *Mount Sinai J. Med.*, 42: 238-247, 1976.

NOPANITAYA, W.; HANKER, J.; TYAN, H. Concanavalin A toxicity: Histological studies. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 153: 213-219, 1976.

OLSNES, S.; SALTVEDT, E.; PIHL, A. Isolation and comparison of galactose-binding lectins from *Aorus p recatorius* and *Ricinus communis*. J. Biol. Chem. 242: 803 - 810, 1974 a.

OLSNES, S.; REFSNES, K.; PIHL, A. Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. Nature, 242: 627-631, 1974 b.

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.

PETRAGLIA, F.; PENALVA, A.; LOCATELLI, V.; COCCHI, D.; PANERAI, A.E.; 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-DASILVA, G. Sex-related canatoxin-induced blood glucose alterations in the rat. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **22**: 1507-1513, 1989.
- POMERANTZ, K.; MADDOX, Y.; MAGGI, F.; RAMEY, E.; RAKWELL, P. Sex and hormonal modification of 6-keto-PGF<sub>1+2</sub> release by rat aorta. *Life Sciences*, **22**: 1233-1236, 1980.
- REEKE, G.N. Relationships between the structure and activities of concanavalin A. *Ann. N. Y. Aca. Sci.*, **234**: 369-382, 1974.
- REICH, R.; KOHEN, F.; SLAGER, R.; TSAFRIRI, A. Ovarian lipoxigenase activity and its regulation by gonadotropin in rat. *Prostaglandins*, **20**: 581-590, 1985.
- REID, R.L.; YEN, S.S.C.  $\beta$ -endorfina stimulates the secretion of insulin and glucagon in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, **52**: 592-594, 1981.
- RENAULD, A.; SUERDLIK, R.C. Blood sugar, serum insulin and free fatty acid levels in normal dogs. Sex differences. *Acta. Physiol. Latinoamer.*, **25**: 458-461, 1975.

RIBEIRO-DA SILVA, G. PRADO, J.F.; COLLARES, C.B.; SISTE-CAMPOS, M. Further studies on the hypoxia produced canatoxin in rats. Braz. J. Med. Biol. Res., 24: 849-852, 1992.

RIBEIRO-DA SILVA, G.; CARLINI, C.R.; PIRES-BARBOSA, R.; GUIKARÃES, 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.; 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, 1989a.

RIBEIRO-DA SILVA, G.; PIRES-BARBOSA, R.; CARLINI, C.R. Effect of canatoxin on the circulating levels of gonadotropins and prolactin in rats. Braz. J. Med. Biol. Res., 22: 387-395, 1989b.

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, 1989c.

RIBEIRO-DA SILVA, G.; PRADO, J.F. Hypoglycemia and lipooxygenase-dependent insulin secretion produced by canatoxin in rats. *Toxicon*, 22: 73-74, 1989.

RIBEIRO-DA SILVA, G.; PRADO, J.F. Increased insulin circulating levels induced by canatoxin in rats. *Toxicon*, 31: 1131-1136, 1993.

SAMBETH, W.; NESHEIK, M. C.; SERAFIN J. A. Separation of soybean whey into fractions with different biological activities for chicks and rats. *J. Nutrition*, 22: 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*, 114: 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, 1973.

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*, **12**: 131-137, 1980.

SIEGEL, S. In: *Estatística não paramétrica*. Rio de Janeiro, McGraw-Hill do Brasil-LYDA (ed). 1979. p 302-305.

SORINACHI, 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 *Glycine Max*. *Arch. Biophys. Biochem.* **113**: 703-709, 1966.

STILLMARK, H. Ueber Ricin, ein giftiges Ferment aus dem Samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen. Arb. Pharmak. Inst. Dorpat., 2: 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.

SUNNER, J.B.; HOWELL, S.F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. J. Bacteriol., 32(2): 227-237, 1936.

SUYA, H.; ABE, Y.; TANAKA, I. 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.; FUNATSU, M. Biochemical studies on castor bean hemagglutinin. II. Hemagglutinin separated from crystalline ricin and its molecular weight. J. Biochem., (Tokyo) 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.; WEHREBERG, W.B.; FERIN, M.; ANTUNES, J.L.; FRANTZ, A.G. Effect of sex steroids on beta-endorphin in hypophyseal portal blood. *J. Clin. Endocrin. Metabol.*, 53: 877-881, 1982.

WARSHAW, M.L.; JOHNSON, D.C.; KHAN, I.; ECKSTEIN, B.; GIBORI, G. Placental secretion of androgens in the rat. *Endocrinology*, 112: 2642-2648, 1986.

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.