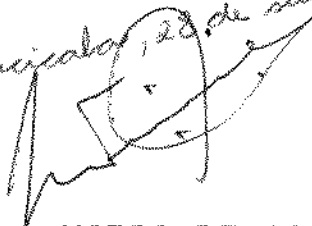


*Este exemplar foi devidamente
corrigido conforme resolução
CCPG 1036/83.*

Piracicaba, 22 de setembro de 1993.



MARIO DE OLIVEIRA BRANCO FILHO²³⁰

PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS DAS GLÂNDULAS
SUBMANDIBULARES E SUBLINGUAIS DE CAMUNDONGOS
MACHOS E FEMEAS, CASTRADOS, E SUAS INTERAÇÕES
COM TESTOSTERONA E ESTRADIOL.

Tese apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba
da UNICAMP, para obtenção do
grau de Mestre em Ciências-
Área de Fisiologia e Biofísica
do Sistema Estomatognático.

PIRACICABA - SP.

JUNHO - 1993

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

RECONHECIMENTO

No Curso de pós Graduação em Fisiologia e Biofísica do Sistema Estomatognático, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, encontrei um ambiente que proporciona a todos o que é chamado, no jargão da informática, "acesso amigável". Mestres que não ostentam sua sabedoria, em clima ameno, criam, com seu apoio irrestrito, condições de constante incentivo ao trabalho. Aprendi que ensinar num ambiente de amizade é educar. Aprendi que educar é mais que ensinar. Quero aqui expressar o meu reconhecimento.

Aos EDUCADORES

Prof. Dr. ALCIDES GUIMARÃES

Prof.Dr. DÉCIO TEIXEIRA

Prof. Dr. JOÃO LEONEL JOSÉ

Profª. Drª. MARIA CECÍLIA F. DE ARRUDA VEIGA

HOMENAGEM

Sinto-me feliz e honrado em
ter tido como orientador um
pioneiro, um empreendedor e,
mais que tudo, um

AMIGO

Os meus sinceros agradecimentos ao
Prof. Dr. DÉCIO TEIXEIRA

Sem a família a vida não tem sentido.
Sem os amigos a vida não tem sabor.
Peço licença à minha família, e aos
meus amigos, para dedicar este
trabalho

ao CLAUDIO,

ao MARCO JUN,

e ao KEY.

Espero um dia poder conversar, eles
capazes de entender, o que signi-
fica, e a quem se deve, um trabalho
como este.

À Sr^a. SHIRLEI ROSANA SBRAVATTI MORETO
e ao Sr. CARLOS ALBERTO APARECIDO FELICIANO,
pela competência, boa vontade e paciência com
que me atenderam neste período de curso, o meu

MUITO OBRIGADO.

CONTEUDO	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISTA DA LITERATURA	4
2.1. COMPONENTES PROTÉICOS DAS GLÂNDULAS SALIVARES	4
2.2. DIMORFISMO SEXUAL DAS GLANDULAS SUBMANDIBULARES DE CAMUNDONGOS	13
2.3. SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS DAS GLANDULAS SALIVARES	15
3. PROPOSIÇÃO	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
5. RESULTADOS	23
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSOES	51
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	53
9. RESUMO	76
10. SUMMARY	80

1. INTRODUÇÃO

Os manuais utilizados para o ensino da fisiologia humana invariavelmente enquadram as glândulas salivares no capítulo do aparelho digestivo e, quase sempre, limitam-se a citar suas ações lubrificante e amilolítica, acompanhadas da análise da regulação nervosa da secreção.

No entanto, desde a antiguidade, constata-se indícios de que as glândulas salivares exercem uma influência interna. CALZADA (1973) relata que Hipócrates, 460 anos A.C., já insinuava uma relação de "causa e efeito", que "explicava certos fatos", atribuídas a "veias que partindo das orelhas chegam até o testículo". Também relata ser universalmente conhecido o fato de que uma inflamação testicular ser seguida, com frequência, de uma parotidite.

HARDIN (1886) observou que a dor resultante da parotidite bilateral de uma paciente era atenuada toda vez que ela se encontrava em período de gestação. PHILLIPS (1931) confirmou esta observação, constatando que o fenômeno se prolongava durante o período de lactação.

A primeira afirmação, sustentada por evidências controladas, de que as glândulas salivares, parótidas e submaxilares, desempenham função endócrina deve-se a OGATA (1934). Os trabalhos que permitiram esta assertiva começaram com a pesquisa

de uma possível função endócrina das glândulas salivares, relacionadas com as secreções internas, no diabetes (HIKI, 1929, 1930 e 1934 e OGATA, 1931).

WERLE e RODEN, em 1936, descobriram na saliva a calicreína, e desencadearam uma extensa série de trabalhos, que levaram ao isolamento e identificação de diversas substâncias biologicamente ativas, tanto na saliva humana, como nas de diferentes espécies animais.

Estas pesquisas prosseguem ainda hoje e atualmente contabiliza-se cerca de 30 substâncias com ação biológica, isoladas de glândulas salivares de diferentes espécies animais. Estes princípios ativos têm, em sua maioria, natureza protéica (BARKA, 1980).

No estudo das glândulas salivares verificou-se que diversas espécies, notadamente os roedores, apresentam dimorfismo sexual, que condiciona as diferenças nos princípios ativos secretados. O dimorfismo sexual é especialmente notável nas glândulas submandibulares dos camundongos, como demonstrou LACASSAGNE (1940a): as submandibulares dos machos têm a porção tubular mais desenvolvida que as fêmeas. No mesmo ano LACASSAGNE (1940b e 1940c) e LACASSAGNE e CHAMORRO (1940) conseguiram demonstrar que o dimorfismo é dependente dos hormônios gonadais.

Como as substâncias biologicamente ativas secretadas pelas glândulas salivares têm, geralmente, natureza protéica, a separação eletroforética é utilizada com frequência para seu estudo.

O primeiro trabalho registrado de uso de eletroforese, para o estudo de saliva, parece ser o de KINERSLY

(1953), que trabalhou em papel. Como secreção biológica a saliva carrega componentes séricos, notados desde os primeiros trabalhos: GELLER, HAMES e ROVELSTAD (1959) identificaram em saliva total humana, as frações mucóide, albumina, alfa-globulina, beta-globulina, gama-globulina e lisozima.

Com o aprimoramento das técnicas eletroforéticas, a separação foi se tornando mais eficaz: SHIBA, SHIBA e SUZUKI (1985), utilizando gel de dodecil sulfato sódico de poliacrilamida em camadas, conseguiram identificar na saliva humana total, 22 frações de natureza protéica.

2. REVISTA DA LITERATURA

2.1. Componentes protéicos das glândulas salivares.

A comprovação de que as glândulas salivares detêm funções endócrinas começaram com os trabalhos de HIKI (1929, 1930 e 1934) e OGATA (1931) e desencadearam intensa atividade de pesquisas a respeito do assunto. No Ocidente WERLE e RODEN (1936) isolaram altas concentrações de calicreína de diversas espécies animais. A ação desta protease como mediador na vasodilatação funcional está reconhecida há longo tempo, mas o completo conhecimento de seu papel fisiológico ainda não foi conseguido (GAUTVIK, BERG-ORSTAVIK e NUSTAD, 1974).

No Japão um grupo de pesquisadores, coordenados por OGATA (1944 e 1945), isolou de glândulas salivares de bovinos, uma substância protéica, denominada parotina, que mais tarde ITO (1960) demonstrou ter funções estimulantes sobre o sistema retículo endotelial, órgãos hematopoiéticos, cartilagens e tecido conjuntivo.

Em 1949 RAYNAUD e REBEYROTTE mostraram que a amilase, o mais evidente dos componentes enzimáticos exógenos da secreção salivar, nos camundongos têm maior concentração nas submandibulares dos machos que das fêmeas. A relação da síntese de amilase salivar com hormônios androgênicos foi melhor estudada por SWIGART e colaboradores (1965) e SHEAR e colaboradores (1979). A orquiectomia, seguida de tratamento por andrógenos, não provoca tão grandes diferenças na síntese da amilase, como acontece com a renina, com o Fator de Crescimento Nervoso ou o Fator de Crescimento Epidermal (BARKA, 1980). Talvez isso se deva ao fato de que a síntese de amilase, nesses animais, seja estimulada pela tiroxina (RAYNAUD, 1950).

No Brasil, JUNQUEIRA e colaboradores (1949) demonstraram histologicamente, nos grânulos secretórios dos dutos granulosos das glândulas submandibulares de camundongos, a atividade de uma fosfatase ácida. Mostrou, no mesmo trabalho, que as glândulas dos machos contêm cerca de 2,5 vezes mais atividade de fosfatase ácida que as das fêmeas.

Ainda em 1949, JUNQUEIRA e colaboradores relataram a presença de atividade proteolítica nas glândulas submandibulares de ratos, demonstrando ainda sua dependência aos andrógenos. Mais tarde EKFORS e colaboradores (1967), EKFORS, MALMI-HARTU e HOPUSU-HAVU (1972) demonstraram a presença de várias esteropeptidases semelhantes à tripsina, em glândulas submandibulares de ratos e camundongos. Outras duas proteases foram purificadas e caracterizadas, a partir de glândulas submandibulares de camundongos, por SCHENKEIN e colaboradores (1969), BOESMAN, LEVY e SCHENKEIN (1976) e SCHENKEIN e

colaboradores (1977). Todas estas proteases, isoladas de glândulas submandibulares de ratos e camundongos, são andrógeno dependentes (BARKA, 1980).

Em 1956 COHEN e LEVI-MONTALCINI isolaram de veneno de cobra um Fator de Crescimento Nervoso. O mesmo autor purificou esta substância e estudou seus efeitos metabólicos (COHEN, 1959) e, através de brilhante associação de idéias, foi levado a pesquisar, isolar e purificar um Fator de Crescimento Nervoso nas glândulas salivares de camundongos. Embora tenham ação semelhante, estas substâncias são distintas (BAILEY e colaboradores, 1976). O Fator de Crescimento Nervoso das glândulas salivares dos camundongos tem natureza protéica e suas propriedades químicas e biológicas foram acuradamente estudadas (LEVI-MONTALCINI e ANGELETTI, 1968, BRADSHAW e FRAZIER, 1975 e VARON 1975). MONTALCINI e ANGELETTI (1964) mostraram que esta substância é andrógeno dependente e apresenta maior concentração nas submandibulares masculinas que nas femininas.

WERLE, VOGEL e GOLDEL (1957) descobriram, em glândulas submandibulares de camundongos, uma substância que causa uma prolongada hipertensão quando injetada em camundongos e cachorros. Em 1963 WERLE, TRAUTSCHOLD e SCHMAL conseguiram a purificação parcial de uma renina, de glândulas submandibulares dessa espécie. Em 1972 COHEN e colaboradores demonstraram que os camundongos apresentaram em suas glândulas submandibulares duas reninas, A e C. GUTMAN, LEVI e SHORR, em 1973, demonstraram que os ratos também apresentam renina em suas glândulas submandibulares.

Em 1962 COHEN, ainda de glândulas submandibulares de camundongos, obteve um Fator de Crescimento Epidermal (FCE), que mostrou provocar a aceleração da erupção dos incisivos e da abertura das pálpebras, nos camundongos e ratos recém nascidos. EYNY, ORTH e COHEN (1972) comprovaram que a concentração deste princípio ativo aumenta nas glândulas submandibulares a partir da maturação sexual. A presença desta substância nas glândulas pode ser detectada a partir do 20º dia após o nascimento (GRESIK e BARKA, 1978). A estrutura química do Fator de Crescimento Epidermal está totalmente desvendada, constituindo-se de uma única cadeia polipeptídica, com 53 resíduos de aminoácidos, cuja seqüência já foi determinada (COHEN, 1962, SAVAGE, INAGAME e COHEN, 1972 e CARPENTER e COHEN, 1979). O Fator de Crescimento Epidermal é um potente estimulante da mitose em diferentes tipos de células, induz a queratinização e é inibidor da secreção ácida do estômago (BARKA, 1980, MARTI, BURWEN e JONES, 1989). Foi comprovado também que o FCE é andrógeno dependente (BULLOCK, BARTHE e MOWSZOWICZ, 1975) e que, embora sua síntese dependa de hormônios androgênicos e tiroideanos, a sua liberação na circulação depende só dos andrógenos (KASAYAMO, YOUSHIKURA e OKA, 1989). As glândulas submandibulares dos machos apresentam de 1 a 2 µg de FCE por mg de tecido, cerca de 10 vezes mais que as das fêmeas; a orquiectomia reduz, e a administração de testosterona aumenta, nos machos castrados e nas fêmeas, essa concentração (BARKA, 1980). O FCE foi também localizado nas glândulas submandibulares humanas e de ratos .

Em 1963 MAYNER e ACKERMAN demonstraram, nas glândulas submandibulares de camundongos, a presença de uma ribonuclease.

Em 1965 ATTARDI e colaboradores isolaram e purificaram, de glândulas submandibulares de camundongos, um Fator de Crescimento Mesodermal, capaz de induzir uma perda de miosina nas fibras musculares, modificar o tecido cartilaginoso e estimular a proliferação das células mesenquimais. ATTARDI, SCHLESINGER e SCHLESINGER (1976) demonstraram a ação proteolítica deste fator.

No mesmo ano, 1965, ADLER e NARBAITZ mostraram que a adição de extrato de glândulas submandibulares de ratos à culturas "in vitro" de tubos neurais de galinha provocavam o aparecimento de abertura dorsal e crescimento irregular e hiperplástico. Foi denominado fator de crescimento do tubo neural e até recentemente não tinha sido purificado, ou sua presença comprovada em camundongos (BARKA, 1980).

ANGELETTI e colaboradores (1965) purificaram parcialmente, de glândulas submandibulares de camundongos, uma substância que provoca, quando injetada em camundongos ou coelhos, um aumento do número de leucócitos polimorfonucleares.

Em 1967 TAKEDA e colaboradores relataram que o extrato de glândulas submandibulares de camundongos provoca uma atrofia nos tecidos linfóides desses animais. TAKEDA e GROLLMAN (1968) acentuaram a drástica ação atrófica destas substâncias sobre tecidos linfóides, especialmente timo de camundongos. No mesmo trabalho esses autores relataram que este Fator Linfóide (ou Fator Timotrófico) não se faz presente nas submandibulares das fêmeas.

Em 1968 HOSHINO e LIN relataram que o transplante de glândulas submandibulares de camundongos adultos é fatal para o

hospedeiro. O transplante de parótidas, ou de submandibulares de fêmeas ou machos sexualmente imaturos, não evidenciam o mesmo efeito tóxico, mostrando que este Fator Letal é andrógeno dependente. HOSHINO e LIN (1970 e 1971) compararam a toxicidade do Fator Letal em hospedeiros do transplante: camundongos machos são mais resistentes que as fêmeas ou machos sialoadenectomizados, e a aplicação de testosterona protege as fêmeas contra o efeito letal. HATAKEYAMA, HIRAMATSU e MINAMI (1981) relataram que este fator letal está também presente na saliva de camundongos machos e é tóxico para camundongos, ratos, cobaias e cricetos; isolaram o princípio ativo e mostraram que esta substância é um enzima semelhante à calicreína.

Em 1970 JONES, ASWOOD-SMITH purificaram parcialmente, de glândulas submandibulares de camundongos, uma substância que descreveram como capaz de estimular a proliferação de tecido epitelial de ratos "in vitro". Esta ação já tinha sido constatada anteriormente por JONES (1966). BANKS e WALTER (1973), contudo, demonstraram que esse Fator de Crescimento Epitelial provoca uma desorganização das células epiteliais e que não há estímulo de sua proliferação. BARKA (1980) sugere que os efeitos estimulantes descritos por JONES e JONES e ASHWOOD-SMITH (1966 e 1970) são devidos às proteases presente no extrato das glândulas submandibulares dos camundongos.

Em 1971 SHERIDAN e STANLEY publicaram a descoberta de um Fator Estimulante de Colônias da Medula Óssea, em diferentes tecidos de camundongos; constataram que o tecido que apresentava maior concentração era o das glândulas submandibulares, e que as dos machos têm quantidades cerca de 3 vezes superiores às das fêmeas.

Em 1972 BOUCHER, SAIDI e GENEST descreveram uma nova angiotensina I, denominada tonina, purificada e caracterizada por DEMASSIEUX e colaboradores em 1976. Esta tonina, isolada de glândulas salivares de ratos, mostrou ser diferente da renina, da pseudorenina e da angiotensina I (BOUCHER, ASSELIN e GENEST, 1974).

Em 1973 ZANGHERI e colaboradores, trabalhando com ratos, demonstraram que o nível aumentado de eritropoetina, em animais hipóxicos e hipoxicos e anêmicos, é reduzido pela nefrectomia. E que a nefrectomia, acompanhada de sialoadenectomia, provoca uma redução mais drástica, de onde deduziram que as glândulas submandibulares constituem importante sítio extra-renal de eritropoetina. FAVA DE MORAES, ZANGHERI e DOINE, em 1979, através de técnicas imunogênicas, confirmaram a localização de eritropoetina em glândulas submandibulares de ratos e camundongos.

Em 1974 SILVERMAN e DUNBAR mostraram que o extrato de glândulas submandibulares de ratos provocam um aumento de nível da glicose sanguínea e atribuíram esse efeito a um Glucagon Salivar. LAWRENCE e colaboradores (1975, 1976 e 1977) mostraram a presença de Glucagon Salivar em glândulas submandibulares humanas e de ratos, camundongos, cobaias, coelhos e cães. A presença do Glucagon Salivar é insignificante nas parótidas e sublinguais (LAWRENCE e colaboradores, 1977). As glândulas submandibulares de ratos adultos contêm cerca de 3 vezes mais Glucagon Salivar que as de fêmeas, e cerca de 100 vezes mais que as de animais impúberes, machos ou fêmeas (KELLY e colaboradores 1977). A dependência à testosterona foi ratificada pela diminuição do Glucagon Salivar nas submandibulares de ratos castrados, e pela recuperação em tratamento com o hormônio. LAWRENCE e colaboradores (1976) apresentaram a

hipótese de que o Glucagon Salivar é sintetizado nas glândulas submandibulares, numa forma de alto peso molecular, e depois hidrolizada a moléculas menores pela tripsina. A liberação do Glucagon Salivar diretamente na circulação não foi comprovada (BARKA, 1980).

Em 1976 HOFFMAN e colaboradores purificaram, a partir de glândulas submandibulares de camundongos, uma substância, denominada Fator Estimulante do Crescimento Endotelial. Estes autores descreveram este fator como capaz de produzir um crescimento hipertrófico das células endoteliais em diferentes órgãos, quando injetados em camundongos adultos, ou recém nascidos. BARKA (1980) analisa criticamente este trabalho e conclui que ainda há duvidas sobre a existência de um Fator Estimulante de Crescimento Endotelial separado.

Ainda em 1976 LISKE e REBER, usando técnicas de radioimunensaio e imunofluorescência, demonstraram nas glândulas submandibulares de ratos, a presença de uma atividade semelhante à insulina não suprimível.

Neste mesmo ano de 1976, WALLACE, PARTLOW e ELLIS relataram que a saliva de camundongos tem um Fator Anti-complementar que é regulado pelos receptores alfa-adrenérgicos. Este trabalho mostra que a injeção de saliva de camundongos em ratos abole a atividade hemolítica dos complementos do sangue por 24 horas. WEILL e colaboradores, em 1979, confirmaram a existência desse fator.

Em 1979 ITO e colaboradores, usando técnicas de imunofluorescência, determinaram em glândulas submandibulares de ratos uma angiotensina II.

Ainda em 1979 HUTSON, EVANS e FOWLER relataram que a saliva de camundongo contém um Fator Cicatrizante, o que explicaria a aceleração de cicatrização pelo hábito de lamber os ferimentos, observado nessa espécie.

No mesmo ano, 1979, ARRUDA VEIGA isolou, de glândulas submandibulares de camundongos machos, um peptídeo, que injetado subcutaneamente induz à albuminúria e poliúria, relacionadas com uma ação nefrotóxica.

Em 1982 MURAKAMI, TANIGUCHI e BABA mostraram a síntese de um peptídeo semelhante à insulina, nas glândulas parótidas de ratos e seres humanos.

Em 1985 COX e QUISSEL isolaram, de glândulas submandibulares de ratos, uma proteína ativadora de plaquetas; mostraram que esta substância, "in vitro", ativa plaquetas, agregando-as e induzindo a secreção de serotonina, de coelhos, ratos ou seres humanos.

Em 1985, ainda, PINHEIRO isolou, de glândulas salivares de camundongos machos, 4 substâncias, que denominou Sialotoxinas, I, II, III e IV, de natureza tóxica e atividade letal. Em 1988 PINHEIRO relatou que estas substâncias não têm natureza protéica, mas reagem com biureto, Follin-fenol e reagentes xantoprotéicos. CAMPOS e colaboradores (1992), trabalhando em tecidos de diafragma de ratos, demonstraram que a Sialotoxina I promove uma redução da capacidade celular de captar glicose. ARRUDA VEIGA e colaboradores (1992) relataram que os camundongos fêmeas são cerca de 3,5 vezes mais sensíveis à Sialotoxina III que os machos, e que as fêmeas tratadas com testosterona são cerca de 2 vezes mais resistentes que as

normais; confirmaram a dependência de Sialotoxina III aos hormônios androgênicos.

Em 1986 KEMP, MELLOW e SABADINI, trabalhando com extrato de glândulas submandibulares de rato, purificaram um fator de propriedades imunossupressivas e demonstraram, "in vitro", sua ação inibidora sobre a proliferação de linfócitos mitógenos e antígeno-estimulados.

Ainda em 1986 ANDERSON demonstrou, "in vitro", a presença de uma peroxidase, em células acinares das glândulas submandibulares de ratos.

Em 1988 EKSTRÖN e EKMAN demonstraram, em glândulas salivares de ratos, a presença de um Neuro-peptídeo que está envolvido na regulação do fluxo sanguíneo e da secreção nas glândulas salivares.

2.2. Dimorfismo sexual das glândulas submandibulares de camundongos.

LACASSAGNE (1940a) mostrou histologicamente o dimorfismo sexual das glândulas submandibulares de camundongos. Trabalhos subseqüentes do próprio LACASSAGNE (1940b e c), e de LACASSAGNE e CHAMORRO (1949), mostraram que essas diferenças sexuais histológicas dependem dos hormônios sexuais, e que a administração de testosterona nas fêmeas leva suas glândulas submandibulares a tomar o aspecto semelhante às dos machos.

Em 1950 RAYNAUD relatou que a injeção de testosterona desencadeia um acentuado desenvolvimento dos túbulos granulares das glândulas submandibulares de camundongos, evidenciando a ação direta deste hormônio sobre a glândula.

CARAMIA (1966) comparou, através de microscopias ótica e eletrônica, as glândulas submandibulares de camundongos machos e fêmeas. Relata a presença, nas glândulas dos machos, de quatro zonas distintas: ácinos, ducto intercalado, tubo secretório e ducto intralobular estriado. As glândulas das fêmeas apresentam estas mesmas estruturas e mais túbulos secretórios estriados. Nas glândulas masculinas o sistema de túbulos secretórios é muito mais proeminente, e são também caracterizados pela presença de canaliculos intracelulares.

SHACKLEFOR e WILBORN (1968) confirmaram a diversidade estrutural e histoquímica em glândulas salivares de diversas espécies de mamíferos.

SMITH e FROMMER (1972) relataram que os túbulos granulares, nas glândulas submandibulares de camundongos, não estão presentes antes da quarta semana após o nascimento.

CHAI e colaboradores (1993), trabalhando com o auxílio de técnicas computadorizadas de reconstrução tridimensional, relataram que as células acinares eram menores que as células do ducto granular, em glândulas submandibulares de camundongos machos adultos. Nas glândulas das fêmeas da mesma espécie ocorre o inverso: as células do ducto granular são menores que as acinares. Também encontraram que o volume médio das células acinares é significativamente maior nas fêmeas que nos machos. Revelaram ainda que a mais dramática evidência do dimorfismo sexual foi encontrada

pela determinação da atividade replicante de ADN: nas fêmeas a atividade de replicação é substancialmente maior nas células do ducto intercalar que nas células do ducto granular e acinares. Nos machos esta atividade têm níveis aproximadamente iguais nas células do ducto granular, do ducto intercalar e acinares. Mostraram ainda que as fêmeas possuem um ducto intercalar muito mais ramificado e que o ducto granular usualmente termina num complexo secretório. Nos machos o ducto granular usualmente atravessa um complexo secretório e forma uma proeminente estrutura, semelhante a uma capa, do lado oposto.

Essas diferenças morfológicas e histológicas induzem ao entendimento das diferenças secretórias e sua dependência aos hormônios gonadais. Quando são analisadas as substâncias biologicamente ativas secretadas por estas glândulas encontra-se que estes fatores são, geralmente, de natureza protéica e andrógeno dependentes (BARKA, 1980).

2.3. Separação eletroforética de proteínas das glândulas salivares.

A eletroforese constitui a primeira escolha entre os métodos utilizados para separação e análise de substâncias protéicas (JORGENSEN, 1986).

A utilização da eletroforese em materiais biológicos deve muito a TISELIUS, que desenvolveu a técnica, interessado em componentes do soro sanguíneo (TISELIUS, 1937, e TISELIUS e KABAT, 1939).

KINERSLY, em 1953, utilizou eletroforese em papel para estudar os componentes da saliva.

GELLER, HAMES e ROVELSTAD (1959), utilizando eletroforese em papel, e comparando a mobilidade das frações separadas com materiais de referência, relatou para a saliva de parótide humana, 5 frações: albumina, alfa-globulina, beta-globulina, gama-globulina e lisozima. O mesmo trabalho registra, para a saliva humana total, as frações mucóide, albumina, alfa-globulina, beta-globulina e lisozima.

MASSON, CARBONARA e HEREMANS, em 1965, trabalhando com saliva total, eletroforese em papel, eletroforese em gel de agarose, imunoeletroforese e cromatografia em dietilaminoetil-celulose, comprovaram que as frações separadas por GELLER, HAMES e ROVELSTAD eram compostas de diversas frações, além de confirmar a presença de mucinas salivares, amilases salivares (situadas na área de globulinas-beta 2) e de lisozima, mostraram a separação de globulinas-alfa 1, globulinas-alfa 2, globulinas-beta 1, globulina-alfa 2 mucosal e um componente catódico.

Com o refinamento das técnicas de eletroforese o número de frações isoladas foi aumentando. BELLAVIA (1971), utilizando gel de poliacrilamida, separou 14 frações protéicas na saliva humana. OBERG, IZUTSU e TRUELOVE (1982), usando gel de dodecil sulfato sódico de poliacrilamida, identificou em salivas de parótidas humanas, um total de 23 diferentes frações de natureza protéica. E SHIBA, SHIBA e SUZUKI (1985), também em gel de dodecil sulfato de poliacrilamida, registraram 22 frações protéicas em saliva total humana.

Em roedores, SWEENEY(1962) e HALL e SCHNEYER, (1964),trabalharam com salivas de ratos, em eletroforese em papel. ROBINOVITH e SREEBNY (1969) trabalhando em gel de poliacrilamida, encontraram, em saliva de parótidas de ratos adultos machos, 12/13 frações protéicas em gel aniônico, e 9 em gel catiônico.

3. PROPOSIÇÃO

A revista da literatura lista uma série de trabalhos que mostram que as substâncias ativas secretadas pelas glândulas salivares, geralmente, são de natureza protéica. Mostra ainda que o camundongo (*Mus musculus*) é a espécie que apresenta maior dimorfismo sexual nas glândulas submandibulares.

Ainda pela revista de literatura fica evidente a andrógeno dependência de muitas das substâncias biologicamente ativas das glândulas submandibulares de camundongos.

Assim, a proposição deste trabalho é:

1. Comparar a concentração protéica, e o perfil eletroforético destas substâncias matéricas extratos de glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos adultos normais, machos e fêmeas.

2. Analisar as alterações provocadas na concentração e no perfil eletroforético destas substâncias protéicas, pela castração de camundongos adultos normais, machos e fêmeas.

3. Analisar as alterações provocadas, na concentração e no perfil eletroforético destas substâncias protéicas, pelo tratamento com testosterona de camundongos machos castrados, e pelo tratamento com estradiol de camundongos fêmeas castrados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

GRUPOS DE ANIMAIS

Para a realização do presente trabalho foram utilizados 160 camundongos (*Mus musculus albinus*), sendo 80 machos e 80 fêmeas, com 30 a 45 dias de idade, e peso limitado entre 25 e 35g na data de início do experimento. Antes e durante o período experimental os animais foram mantidos à temperatura ambiente e alimentados com ração balanceada padrão e água "ad libitum".

Para o experimento os animais foram distribuídos em 8 grupos:

GRUPO I : Controle dos machos normais: 20 animais foram anestesiados com éter etílico e tiveram os complexos glandulares submandibulares/sublinguais extraídos.

GRUPO II: Controle das fêmeas normais: 20 animais receberam o mesmo tratamento que o grupo anterior.

GRUPO III: Machos normais tratados com estradiol: 20 animais receberam uma série de 15 aplicações de intraperitoniais, diárias, de 2 mg/kg de peso vivo, de estradiol. Dois dias após cessarem as aplicações tiveram as glândulas extraídas.

GRUPO IV: Fêmeas normais tratadas com testosterona: 20 animais receberam o mesmo tratamento que o grupo anterior substituindo o estradiol por testosterona (2 mg/kg de peso vivo).

GRUPO V: Machos castrados: 20 animais foram orquiectomizados e após quarenta dias tiveram suas glândulas extraídas.

GRUPO VI: Fêmeas castradas: 20 animais foram ovariectomizados e após quarenta dias tiveram suas glândulas extraídas.

GRUPO VII: Machos castrados e tratados com testosterona: 20 animais foram castrados e após 40 dias de repouso receberam uma série de 15 aplicações intraperitoniais, diárias, de 2 mg/kg de peso vivo, de testosterona. Dois dias após o término das aplicações tiveram as glândulas extraídas.

GRUPO VIII: Fêmeas castradas e tratadas com estradiol: Receberam o mesmo tratamento que o grupo anterior, substituindo a testosterona por estradiol.

Cada grupo foi subdividido em 3 subgrupos de 6 ou 7 animais e tiveram extraídos os complexos de glândulas submandibulares/sublinguais imediatamente após a anestesia com éter etílico.

HORMONIOS:

A testosterona foi utilizada na forma de uma mistura comercial de propionato (12%), fenil-propionato (24%), isocaproato (24%) e caproato (40%) (DURATESTON 250/AKSO). O estradiol foi utilizado na forma de dihidrobenzoato (BENZO GINOESTRIL/SARSA).

EXTRATOS PROTEICOS:

Após a extração as glândulas foram limpas, pesadas e mantidas à temperatura próximas de 4°C. Cada 720 mg. de tecido foi homogeneizado em 200 ml de diluente (Tampão Tris 0,002 M/pH 7,4, 0,744 mg de EDTA e 0,14 ul de mercaptoetanol) e triturado em triturador de van Potter sempre conservando o material em gelo. O sobrenadante da suspensão celular triturada foi centrifugado, sob refrigeração, por 30 minutos à 3.500 rpm. Desprezado o sedimento, parte do sobrenadante foi utilizado para dosar a proteína total, e parte foi usado para a separação eletroforética.

DOSAGEM DE PROTEINA:

A proteína total do extrato de cada subgrupo foi dosada utilizando o método de LOWRI e colaboradores (1951) e a concentração protéica calculada em relação ao volume do extrato e ao peso do tecido glandular.

ELETROFORESE:

Misturas de partes iguais de cada subgrupo formaram uma amostra de cada grupo para a eletroforese. A separação eletroforética foi feita em fitas de "Agarose geral CELMGEL", em tampão "CELMGEL 0.05-pH 8,6" (Tampão barbitol sódico mais EDTA) em um aparelho "CORNING". Foi utilizado como corante o Negro de Amido e o gráfico obtido em densitômetro "Helena Laboratories", modelo "AUTOSCANNER FLUR VIS".

O cálculo da área de cada fração separada teve como base o método de TISELIUS e KARAT (1939).

Usando a média da concentração de proteínas totais de cada grupo calculou-se, com base nas áreas relativas obtidas em cada fração separada, a concentração protéica de cada fração.

Utilizando-se os resultados médios obtidos nas concentrações de proteínas totais, e as áreas relativas de cada fração, foram calculadas as concentrações protéicas de cada fração (mg/g de tecido).

TRATAMENTO ESTATÍSTICO:

As análises de estatística descritiva (médias e desvios padrões), a análise de variância, e o teste de TUKEY para comparação de médias, foram realizadas através do programa SEAG (Sistema de Análise Estatística e Genética) para microcomputadores, desenvolvido pela Divisão de Informática da Fundação Arthur Bernardes, da Universidade Federal de Viçosa.

5. RESULTADOS:

Os valores obtidos para as concentrações de proteínas dos extratos da glândulas submandibulares/sublinguais, dos 8 grupos, e a média de cada grupo, estão relacionadas no Quadro 1.

Quadro 1 - Concentração de proteínas em extrato de glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos (mg/ml). (Grupos I, II, III, IV, V, VI, VII e VIII).

GRUPOS	SUB-GRUPO 1	SUB-GRUPO 2	SUB-GRUPO 3	MÉDIA
I-MACHOS N	0,24	0,25	0,27	0,253
II-FEMEAS N	0,12	0,12	0,10	0,212
III-MACHOS N+E	0,15	0,17	0,16	0,160
IV-FEMEAS N+T	0,22	0,20	0,23	0,216
V-MACHOS C	0,14	0,15	0,12	0,134
VI-FEMEAS C	0,11	0,09	0,07	0,090
VII-MACHOS C+T	0,23	0,24	0,25	0,240
VIII-FEMEAS C+E	0,20	0,21	0,22	0,210

Legenda: N = Normais, E = Estradiol, T = Testosterona e
C = Castrados/as.

Os resultados dos cálculos das concentrações de proteínas em relação aos tecidos glandulares, bem como a média de cada grupo, estão relacionados no Quadro 2.

Quadro 2.- Concentração de proteínas em tecido de glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos (mg/g). (GRUPOS I; II; III; IV; V; VI; VII e VIII).

GRUPOS	SUB-GRUPO 1	SUB-GRUPO 2	SUB-GRUPO 3	MÉDIA
I-MACHOS N	47,53	49,88	52,20	49,87
II-FEMEAS N	23,76	23,53	19,80	22,36
III-MACHOS N+E	30,43	34,46	32,44	32,44
IV-FEMEAS N+T	43,46	39,60	44,34	42,46
V-MACHOS C	27,90	29,45	24,00	27,11
VI-FEMEAS C	29,09	27,82	25,15	27,35
VII-MACHOS C+T	44,34	46,75	48,73	46,60
VIII-FEMEAS C+E	40,29	42,41	45,08	42,59

Legenda : N = Normais, E = Estradiol, T = Testosterona e
C = Castrados/as.

As concentrações protéicas obtidas (Quadro 2) foram submetidas à análise de variância e suas médias comparadas pelo teste de Tubey.

Os resultados estão resumidos na Tabela 1.

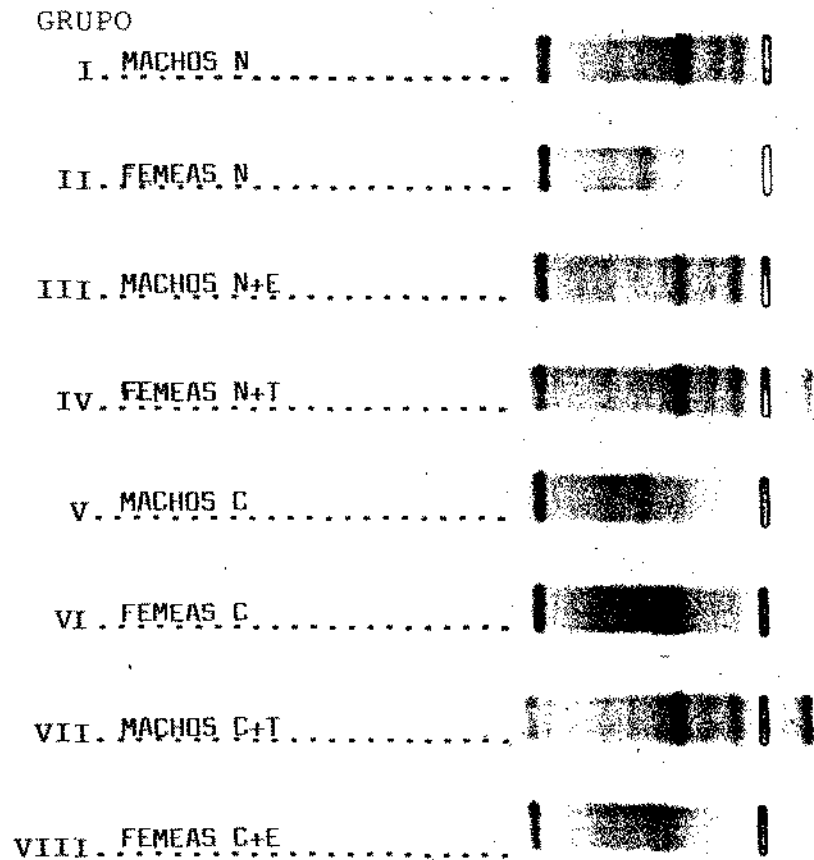
TABELA 1. - Composições entre médias das concentrações protéicas, das glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos(mg/g de tecido) pelo teste de Tukey. (Na comparação letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5%/p<0,05). Valores decrescem na seqüência alfabética).

GRUPOS	MÉDIAS	COMPARAÇÕES
I.MACHOS N	49,87 $\pm$ 2,33	A
VII.MACHOS C+T	46,60 $\pm$ 2,20	A B
VIII.FEMEAS C+E	42,59 $\pm$ 2,40	B
IV.FEMEAS N+T	42,46 $\pm$ 2,51	B
III.MACHOS N+E	32,44 $\pm$ 2,01	C
VI.FEMEAS C	27,35 $\pm$ 2,01	C D
V.MACHOS C	27,11 $\pm$ 2,81	C D
II.FEMEAS N	22,36 $\pm$ 2,22	D

Legenda: N = Normais, E = Estradiol, T = Testosterona.
C = Castrado/as.

Os perfis eletroforéticos das proteínas dos extratos das glândulas submandibulares/sublinguais são mostrados na Figura 1.

Figura 1. Perfis eletroforéticos de proteínas de extratos de glândulas submandibulares/sublinguais. (Grupos I, II, III, IV, V, VI, VII e VIII).



Legenda: N = Normais, C = Castrados/as,
E = Estradiol e T = Testosterona.

Os gráficos obtidos pela leitura em densitômetro, das fitas da separação das proteínas de extratos de glândulas submandibulares/sublinguais dos camundongos, estão nas figuras 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 (Respectivamente grupos I, II, III, IV, V, VI, VII e VIII).

Figura 2. Perfil eletroforético de proteínas de extrato de glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos. Grupo I-MACHOS NORMAIS.

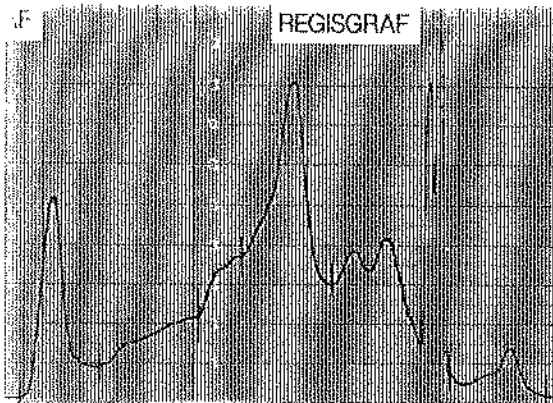


Figura 3. Perfil eletroforético de proteínas de extrato de glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos. Grupo II - FÊMEAS NORMAIS.

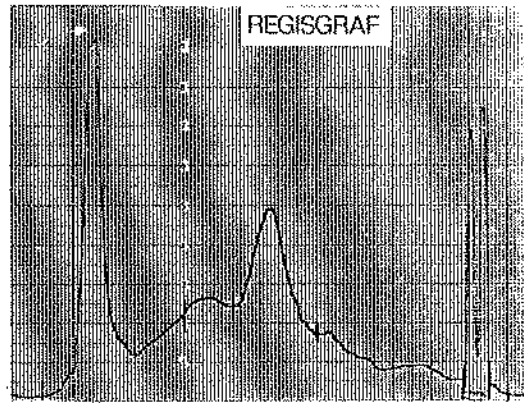


Figura 4. Perfil eletroforético de proteínas de extrato de glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos. Grupo III - MACHOS NORMAIS + ESTRADIOL.

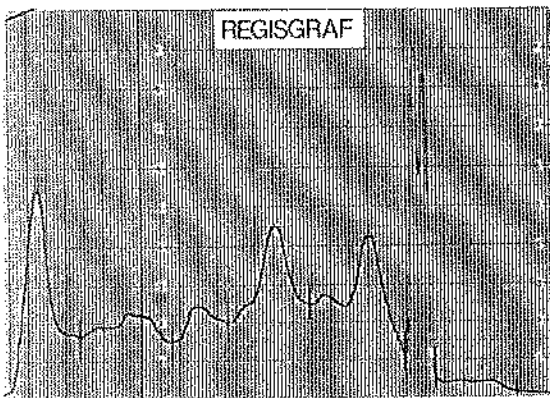


Figura 5. Perfil eletroforético de proteínas de extrato de glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos. Grupo IV - FÊMEAS NORMAIS + TESTOSTERONA.

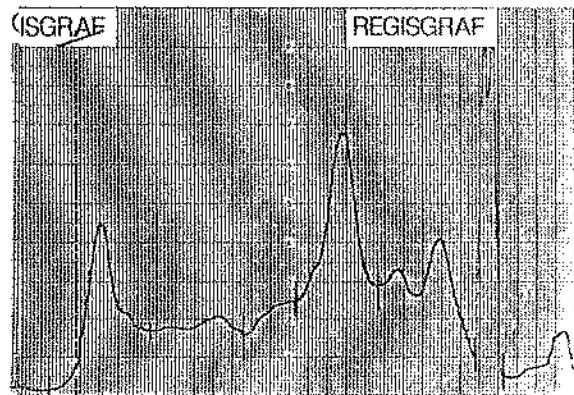


Figura 6. Perfil eletroforético de proteínas de extrato de glândulas submandibulares/ sublinguais de camundongos. Grupo V - MACHOS CASTRADAS.

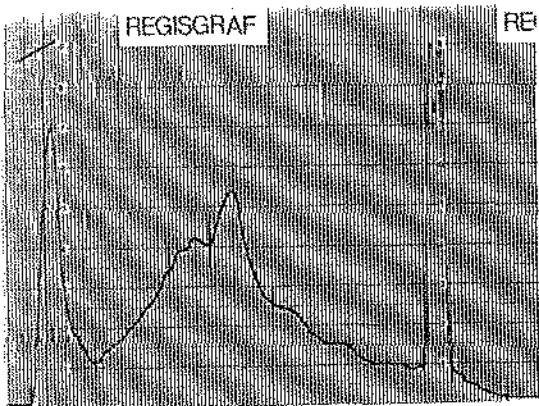


Figura 7. Perfil eletroforético de proteínas de extrato de glândulas submandibulares/ sublinguais de camundongos. Grupo VI - FEMEAS CASTRADAS.

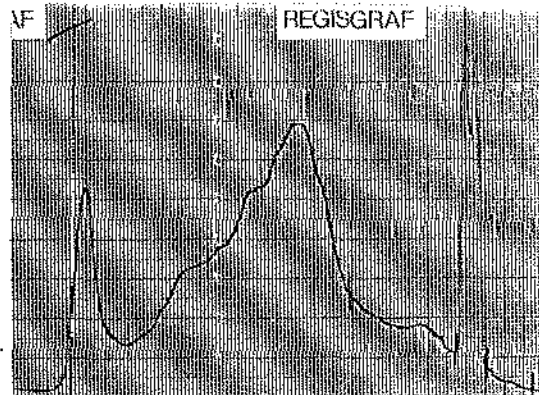


Figura 8. Perfil eletroforético de proteínas de extrato de glândulas submandibulares/ sublinguais de camundongos. Grupo VII - MACHOS CASTRADOS + TESTOSTERONA.

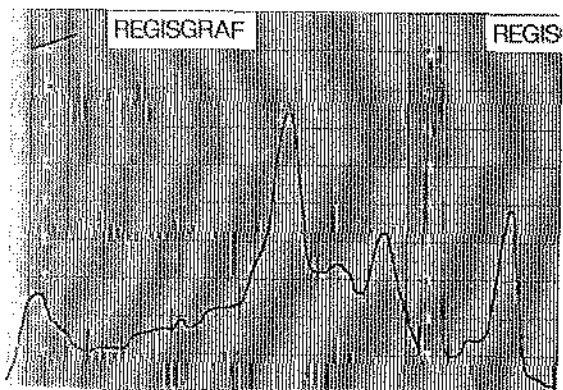
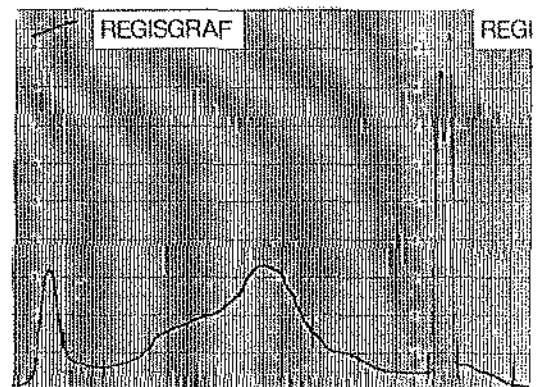


Figura 9. Perfil eletroforético de proteínas de extrato de glândulas submandibulares/ sublinguais de camundongos. Grupo VIII - FEMEAS CASTRADAS + ESTRADIOL.



A partir dos gráficos dos perfis eletroforéticos foram estabelecidas, em correspondência com o padrão para soro sanguíneo, 7 frações protéicas: A, correspondente às albuminas; B, correspondente às globulinas alfa 1; C, correspondente às globulinas alfa 2; D, correspondente às beta-globulinas; E, correspondente às gama-globulinas; F, correspondente ao residuo no local de aplicação; G, fração que migra para o polo oposto. As áreas de cada fração, calculadas como base em TISELIUS e KABAT (1939), permitiram o cálculo de suas áreas relativas. Estas, relacionadas com a média da concentração de proteínas totais de cada grupo, possibilitaram o cálculo das concentrações das proteínas de cada uma das frações (em mg/g de tecido). Os resultados obtidos são mostrados nos Quadros 3 e 4.

Quadro 3. Area em mm² (A), área relativa em porcentagem (AR) e concentração protéica em mg/g de tecido (CP) das frações A, B, C, D, E, F e G, separadas por eletroforese em agar geral, de extratos de glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos. (Grupos I, II, III, e IV).

FRAÇÕES	G-I MACHOS N			G-II FEMEAS N			G-III MACHOS N+E			G-IV FEMEAS N+T		
	A	AR	CP	A	AR	CP	A	AR	CP	A	AR	CP
	mm ²	%	mg/g	mm ²	%	mg/g	mm ²	%	mg/g	mm ²	%	mg/g
A	400	10,65	5,34	620	25,29	5,65	375	12,78	4,14	364	11,64	5,02
B	417	11,16	5,56	208	8,48	1,89	452	15,41	4,99	458	14,12	5,99
C	376	10,06	5,02	329	13,42	3,00	463	15,78	5,12	449	13,84	5,88
D	1.184	31,70	15,80	642	29,19	5,85	526	17,93	5,81	611	18,84	8,00
E	783	20,96	10,45	353	14,40	3,22	657	22,40	7,26	744	22,84	9,74
F	434	11,61	5,79	289	11,79	2,63	362	13,02	4,22	413	12,73	5,40
G	141	3,77	1,68	10	0,40	0,09	78	2,65	0,86	183	5,64	2,39
TOTAIS	3.735	100	49,87	2.451	100	22,36	2.933	100	32,44	3.242	100	42,46

Legenda: N = Normais, C = Castrados/as,
E = Estradiol e T = Testosterona.

Quadro 4. Área em mm² (A), área relativa em porcentagem (AR) e concentração protéica em mg/g de tecido (CP) das frações A, B, C, D, E, F e G, separadas por eletroforese em agar geral, de extratos de glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos. (Grupos V, VI, VII, e VIII).

	G-V MACHOS C			G-VI FEMEAS C			G-VII MACHOS C+T			G-VIII FEMEAS C+E		
	A	AR	CP	A	AR	CP	A	AR	CP	A	AR	CP
FRAÇÕES	mm ²	%	mg/g	mm ²	%	mg/g	mm ²	%	mg/g	mm ²	%	mg/g
A	483	15,57	4,22	421	12,69	3,47	350	9,09	4,23	242	12,12	5,18
B	427	13,78	3,73	467	14,08	3,86	310	8,05	3,75	92	4,60	1,96
C	461	14,86	4,03	466	14,05	3,84	303	7,87	3,67	443	22,19	9,45
D	615	19,83	5,37	977	29,47	8,06	1.212	31,50	14,68	480	24,04	10,24
E	617	19,89	5,39	604	18,20	4,15	871	22,64	10,55	237	11,87	5,05
F	445	14,35	3,89	437	13,18	3,60	367	9,53	4,44	394	19,73	8,40
G	53	1,70	0,46	43	1,29	0,35	434	11,28	5,25	108	5,41	2,30
TOTAIS	3.101	100	27,11	3.315	100	27,35	3.847	100	46,60	1.996	100	42,59

Legenda: N = Normais, C = Castrados/as,
E = Estradiol e T = Testosterona.

Como houve uma única corrida eletroforética realizado com mistura, em volumes iguais, dos 3 subgrupos de cada grupo, com base nas áreas relativas foram calculados os valores de cada fração, para cada uma das concentrações protéicas dos subgrupos. Assim foram criadas condições para executar a análise da variância e o teste de Tukey para comparação das médias de cada fração protéica isolada. Os resultados das análises das frações A, B, C, D, E, F, e G são mostrados, respectivamente, nas Tabelas 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8. Em todas estas tabelas N=NORMAIS, C=CASTRADOS/AS, E=ESTRADIOL e T=TESTOSTERONA. Em todas estas tabelas, ainda, letras diferentes revelam diferença significativa ao nível de 5% (p<0,05), e os valores são decrescentes na sequência alfabética.

Tabela 2. Comparação entre as médias das concentrações protéicas da fração A (Albuminas) de glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos (mg/g de tecido), pelo método de Tukey.

GRUPOS	MÉDIAS	COMPARAÇÕES
II FEMEAS N	5,6557 $\pm$ 0,58	A
I MACHOS N	5,3112 $\pm$ 0,25	A
VIII FEMEAS C+E	5,1629 $\pm$ 0,30	A B
IV FEMEAS N+T	5,0273 $\pm$ 0,30	A B
VII MACHOS C+T	4,2365 $\pm$ 0,20	B C
V MACHOS C	4,2221 $\pm$ 0,44	B C
III MACHOS N+E	4,1463 $\pm$ 0,26	B C
VI FEMEAS C	3,4711 $\pm$ 0,26	C

Legenda: N = Normais, C = Castrados/as.
E = Estradiol e T = Testosterona.

Tabela 3. Comparação entre a médias das concentrações protéicas da fração B (Globulinas alfa 1) de glândulas submandibulares/ sublinguais de camundongos (mg/g de tecido), pelo método de Tukey.

GRUPOS	MÉDIAS	COMPARAÇÕES
IV FEMEAS N+T	5,9954 $\pm$ 0,35	A
I MACHOS N	5,5655 $\pm$ 0,26	A B
III MACHOS N+E	4,9995 $\pm$ 0,31	B
VI FEMEAS C	3,8513 $\pm$ 0,28	C
VII MACHOS C+T	3,7518 $\pm$ 0,17	C
V MACHOS C	3,7313 $\pm$ 0,39	C
VIII FEMEAS C+E	1,9593 $\pm$ 0,11	D
II FEMEAS N	1,8964 $\pm$ 0,19	D

Legenda: N = Normais, C = Castrados/as,
E = Estradiol e T = Testosterona.

Tabela 4. Comparação entre as médias das concentrações protéicas da fração C (Globulinas alfa 2) de glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos (mg/g de tecido), pelo método de Tukey

GRUPOS	MÉDIAS	COMPARAÇÕES
IV FEMEAS N+T	5,9954 $\pm$ 0,35	A
I MACHOS N	5,5655 $\pm$ 0,26	A B
III MACHOS N+E	4,9995 $\pm$ 0,31	B
IV FEMEAS C	3,8513 $\pm$ 0,28	C
VII MACHOS C+T	3,7518 $\pm$ 0,17	C
V MACHOS C	3,7313 $\pm$ 0,39	C
VIII FEMEAS C+E	1,9593 $\pm$ 0,11	D
II FEMEAS N	1,8964 $\pm$ 0,19	D

Legenda: N = Normais, C = Castrados/as,
E = Estradiol e T = Testosterona.

Tabela 5. Comparação entre as médias das concentrações protéicas da fração D (Betaglobulinas) de glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos (mg/g de tecido), pelo método de Tukey.

GRUPOS	MÉDIAS	COMPARAÇÕES
I MACHOS N	15,8088 $\pm$ 0,74	A
VII MACHOS C+T	14,6811 $\pm$ 0,69	A
VIII FEMEAS C+E	10,2394 $\pm$ 0,58	B
VI FEMEAS C	8,0610 $\pm$ 0,59	C
IV FEMEAS N+T	7,9995 $\pm$ 0,47	C
II FEMEAS N	6,5279 $\pm$ 0,64	C D
III MACHOS N+E	5,8171 $\pm$ 0,36	D
V MACHOS C	5,3772 $\pm$ 0,56	D

Legenda: N = Normais, C = Catrados/as.
E = Estradiol e T = Testosterona.



Tabela 6. Comparação entre as médias das concentrações protéicas da fração E (Gama-globulinas) de glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos (mg/g de tecido) pelo método de Tukey.

GRUPOS	MÉDIAS	COMPARAÇÕES
VII MACHOS C+T	10,5517 $\pm$ 0,50	A
I MACHOS N	10,4528 $\pm$ 0,49	A
IV FEMEAS N+T	9,7403 $\pm$ 0,58	A
III MACHOS N+E	7,2673 $\pm$ 0,45	B
V MACHOS C	5,3935 $\pm$ 0,56	C
VIII FEMEAS C+E	5,0558 $\pm$ 0,28	C
VI FEMEAS C	4,1577 $\pm$ 0,30	C D
II FEMEAS N	3,2203 $\pm$ 0,32	D

Legenda: N = Normais, C = Castrados/as,
E = Estradiol e T = Testosterona.

Tabela 7. Comparação entre as médias das concentrações protéicas da fração F (Resíduo/ponto de aplicação) de glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos (mg/g de tecido), pelo método de Tukey.

GRUPOS	MÉDIAS	COMPARAÇÕES
VIII FEMEAS C+E	8,4037 $\pm$ 0,47	A
I MACHOS N	5,7899 $\pm$ 0,27	B
IV FEMEAS N+T	5,4052 $\pm$ 0,32	B
VII MACHOS C+T	4,4416 $\pm$ 0,21	C
III MACHOS N+E	4,2241 $\pm$ 0,26	C
V MACHOS C	3,8912 $\pm$ 0,26	C
VI FEMEAS C	3,6052 $\pm$ 0,26	C
II FEMEAS N	2,6368 $\pm$ 0,2	D

Legenda: N = Normais, C = Castrados/as,
E = Estradiol e T = Testosterona.

Tabela 8. Comparação entre as médias das concentrações protéicas da fração G (Fração catódica) de glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos (mg/g de tecido), pelo método de Tukey.

GRUPOS	MÉDIAS	COMPARAÇÕES
VII MACHOS C+T	5,2572 $\pm$ 0,247	A
IV FEMEAS N+T	2,3947 $\pm$ 0,141	B
VIII FEMEAS C+E	2,3043 $\pm$ 0,129	B
I MACHOS N	1,8801 $\pm$ 0,088	C
III MACHOS N+E	0,8727 $\pm$ 0,054	D
V MACHOS C	0,4610 $\pm$ 0,047	E
VI FEMEAS C	0,3529 $\pm$ 0,025	E F
II FEMEAS N	0,0895 $\pm$ 0,008	F

Legenda: N = Normais, C = Castrados/as,
E = Estradiol e T = Testosterona.

6. DISCUSSÃO:

As concentrações das proteínas totais foram obtidas pelo método de Lowry, assim estão incluídas nos resultados uma extensa gama de substâncias protéicas, incluindo peptídeos de peso molecular relativamente baixo e glicoproteínas. Também, conforme PINHEIRO (1985), são reveladas as sialotoxinas, consideradas não protéicas.

As médias dos resultados das dosagens das proteínas totais de cada grupo estão no Quadro 2, e as comparações entre elas, através do teste de Tukey, estão na Tabela 1. Esta tabela mostra as diferenças significativas, a nível de 5% ($p < 0,05$), entre as concentrações protéicas em relação ao tecido das glândulas submandibulares/subsalivares de camundongos adultos. Pode-se observar que: a) machos normais têm concentrações significativamente maiores que fêmeas normais ($I >> II$). b) Machos normais têm concentrações semelhantes aos machos castrados tratados com testosterona e, ambos, têm concentrações significativamente superiores aos machos castrados, confirmando a dependência da função secretora à testosterona. c) Machos normais têm concentrações significativamente superiores aos machos normais tratados com estradiol ($I >> III$). A ação antagônica do estradiol comprovam as observações de TUOMELA, VIINIKKA e PERHEENTUPA (1989) e TUOMELA e colaboradores (1990), para o Fator de Crescimento Epidermal. d) Machos castrados tratados com testosterona têm resultados semelhantes às fêmeas castradas tratadas com estradiol e às fêmeas normais tratadas com testosterona ($VII = VIII = IV$). Confirma que a

testosterona ativa as funções secretoras. A resposta das fêmeas castradas ao tratamento com estradiol talvez seja devido à dosagem excessiva. e) Machos normais têm resultados significativamente superiores aos machos normais tratados com estradiol ($I \gg III$), mais uma evidência da ação estrogênica antagônica. f) As fêmeas castradas têm resultados semelhantes as fêmeas normais ($VI=II$) mostrando que o estradiol, em concentrações fisiológicas, não exerce influência decisiva sobre a atividade secretora das proteínas. g) Observa-se que os dois grupos anteriores têm concentrações semelhantes aos machos castrados ($VI=II=V$), concorrendo para o mesmo raciocínio anterior, e para a confirmação da dependência secretora à testosterona.

No conjunto, os dados confirmam o dimorfismo relatado por LACASSAGNE (1940a) e JUNQUEIRA e colaboradores (1949), e a dependência desse dimorfismo em relação à testosterona, conforme a descrição de RAYNAUD (1950), confirmada por HOSOI, NAKAMURA e UEHA (1977). Confirmam também a relação direta das propriedades morfo-histológicas com a secreção dos fatores de natureza protéica, conforme consideração de BARKA em sua extensa revisão sobre o assunto, de 1980.

A separação eletroforética é reproduzida na figura 1 e os perfis eletroforéticos, obtidos do material de cada grupo, são mostrados nas figuras 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9. As separações observadas são condizentes com as descritas para a eletroforese em gel de agarose (MANDEL, 1966). As frações separadas, e os picos evidenciados, são diferentes nos diversos grupos, em consonância com as alterações ditadas pelo dimorfismo sexual e pela dependência dos andrógenos.

As substâncias protéicas foram reveladas com Negro de Amido, usualmente utilizado para este fim, mas que apresenta diferenças na evidenciação de frações, quando comparadas com outros corantes, como o Azul de Coomassie (ver STAINER e KELLER, 1968).

O número de picos obtidos é compatível com os trabalhos executados com técnicas semelhantes e com saliva humana (GELLER, HAMES e ROVELSTAD, 1959, e MASSON, CARBONARA e HEREMANS, 1965). Deve-se lembrar que o extrato do complexo glandular carrega, além das secreções exócrinas, as diversas secreções endócrinas relacionadas na revista da bibliografia, e mais as substâncias protéicas do tecido. Como este trabalho não previu a caracterização, através de controles com substâncias conhecidas, das frações separadas, não são definidas as bandas separadas. No entanto são comparáveis com as encontradas por GELLER, HAMES e ROVELSTAD (1959) em saliva humana.

Assim, foram reconhecidas as frações A, B, C, D, E, F e G. A fração mais rápida (A), corresponde às albuminas, seguidas das globulinas alfa 1 (B), das globulinas alfa 2 (C), beta globulinas (D) e gama globulinas. No ponto de aplicação, em todas as amostras, ficou um resíduo (F) que pode ser um defeito de técnica, mas que foi incluído no cálculo por ter natureza protéica. E, bem acentuada em alguns grupos, aparece uma fração que migra para o cátodo (G). Nos trabalhos executados com saliva total aparece uma fração mais rápida que a das albuminas, identificada como de substâncias mucóides e que não é percebida na saliva das parótidas (GELLER, HAMES e ROVELSTAD, 1959, e MASSON, CARBONARA e HEREMANS, 1965). Sua ausência em extrato de glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos está em conformidade com

as diferenças secretórias das glândulas salivares.

Confirmando trabalhos executados com técnicas mais eficazes de separação, que encontram subfrações em todas as bandas aqui assinalados (BELLAVIA, 1971, OBERG, IZUTSU e TRUELOVE, 1982, e SHIBA, SHIBA e SUZUKI, 1985), a observação das Figuras 2 a 9 deixam ver a subdivisão de algumas bandas. A subdivisão é especialmente notável na fração E (gama globulinas) dos machos normais (Figura 2), machos normais + estradiol (Figura 4), fêmeas normais + testosterona (Figura 5) e machos castrados + testosterona (Figura 9). A ausência desta subdivisão, evidenciada pelos 2 picos proeminentes bem separados, nos outros grupos de fêmeas mostram sua relação estreita com a testosterona. Outras subdivisões menos evidentes aparecem também nas frações correspondentes às alfa e betaglobulinas. Nas análises executadas neste trabalho optou-se por comparar as frações como um todo, sem considerar as subdivisões, devido a ausência de controles que passamos a identificá-las.

A observação das Figuras (2 e 3) comparando os grupos I (Machos normais) e II (Fêmeas normais), deixa ver que as diferenças são notáveis. Comparando as figuras 2, 6 e 8, referentes aos grupos I (Machos normais), V (Machos castrados) e VII (Machos castrados + testosterona), pode-se observar com clareza a feminilização do perfil eletroforético dos machos castrados e o retorno às suas características normais pelo tratamento com testosterona.

Para facilitar estas e outras comparações, e evidenciar as diferenças demonstradas na análise estatística, foram elaboradas, utilizando os dados das Tabelas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, as Tabelas 9, 10, 11, 12, 13 e 14. Nestas Tabelas, quando as

diferenças entre os grupos são significativas a nível de 5%, indica-se pelo sinal >. Quanto mais sinais > são utilizados, maior a diferença de grandeza entre os grupos. Grupos que não apresentam diferença significativa são apresentados com o sinal de igualdade (=). Na comparação entre os grupos a ordem de apresentação indica valores decrescentes, sem necessariamente indicar diferença significativa.

Tabela 9. Comparação entre os grupos I (Machos normais) e II (Fêmeas normais), das concentrações de proteínas totais e das frações A, B, C, D, E, F e G, de glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos.

PROTEÍNAS TOTAIS		I >>> II
FRAÇÃO	A	I = II
FRAÇÃO	B	I >>> II
FRAÇÃO	C	I >> II
FRAÇÃO	D	I >> II
FRAÇÃO	E	I >>> II
FRAÇÃO	F	I >> II
FRAÇÃO	G	I >>> II

Em todas as comparações, exceto na fração A, os machos normais apresentam resultados significativamente maiores que as fêmeas normais. Chama a atenção aqui a semelhança da fração A nos dois grupos. Esta fração, a mais rápida, é identificada como a das albuminas e aqui deve incluir uma parcela de albumina sérica (MASSON, CARBONARA e HEREMANS, 1965). Observando-se no Quadro 3 as concentrações de cada fração, veremos que a concentração da fração A (albuminas) é bastante próxima da concentração da fração D (beta-globulinas) nas fêmeas normais, enquanto que, nos machos normais, a concentração da fração D (beta-globulinas), é três vezes maior que a fração A (albuminas). GELLER, HAMES e ROVELSTAD (1959) e MASSON, CARBONARA e HEREMANS (1965) identificaram essa fração como tendo atividade amilolítica e como origem da banda mais proeminente nos perfis eletroforéticos de proteínas de saliva, o que é reproduzido neste trabalho com extrato de glândulas.

Tabela 10. - Comparação entre os grupos III (Machos Normais +E) e IV (Fêmeas Normais +T), das médias das concentrações de proteínas totais e das frações A, B, C, D, E, F e G, de glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos.

PROTEÍNAS TOTAIS		IV > III
FRAÇÃO	A	IV = III
FRAÇÃO	B	IV > III
FRAÇÃO	C	IV = III
FRAÇÃO	D	IV > III
FRAÇÃO	E	IV > III
FRAÇÃO	F	IV > III
FRAÇÃO	G	IV >> III

Em todas as variáveis, exceto as frações A e C, as médias dos valores encontrados para as fêmeas normais + testosterona são significativamente maiores que os encontrados para os machos normais + estradiol. Note-se que mesmo as frações A e B, que não mostram diferenças significativas a nível de 5% tem valores maiores no grupo IV que no III (Ver Quadro 3). Os dados confirmam integralmente a dependência secretora das glândulas trabalhadas à testosterona, e a ação antagônica do estradiol, conforme constatação na literatura anteriormente citada (BARKA, 1980).

Tabela 11. - Comparação entre os grupos V (Machos castrados) e VI (Fêmeas castradas), das médias das concentrações de proteínas totais e das frações A, B, C, D, E, F e G, de glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos.

PROTEÍNAS TOTAIS		VI = V
FRAÇÃO	A	V > VI
FRAÇÃO	B	VI = V
FRAÇÃO	C	V = VI
FRAÇÃO	D	V = VI
FRAÇÃO	E	V = VI
FRAÇÃO	F	V = VI
FRAÇÃO	G	V = VI

Confirmando a dependência aos andrógenos e a pequena ingerência do estrógenos nas atividades secretoras de substâncias protéicas trabalhadas todas as variáveis, exceto a fração A (Albumina) se igualam em animais, machos e fêmeas, castrados.

Tabela 12. - Comparação entre os grupos VII (Machos castrados + testosterona) e VIII (Fêmeas castradas + estradiol), das médias das concentrações de proteínas totais e das frações A, B, C, D, E, F e G, de glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos.

PROTEÍNAS TOTAIS		VII = VIII
FRAÇÃO	A	VII = VIII
FRAÇÃO	B	VIII > VII
FRAÇÃO	C	VII > VIII
FRAÇÃO	D	VIII > VII
FRAÇÃO	E	VII >> VIII
FRAÇÃO	F	VIII >> VII
FRAÇÃO	G	VII > VIII

A comparação entre as médias dos resultados obtidos dos grupos VII (Machos castrados + testosterona) e VIII (fêmeas castradas + estradiol) traz informações contraditórias. As concentrações das proteínas totais entre os dois grupos não apresentam diferenças. A concentração dos machos castrados + testosterona (VII) são elevadas aos níveis dos machos normais (Ver Quadros 3 e 4). A contradição é que as fêmeas castradas + estradiol também tem concentrações elevadas ao nível dos machos normais, e aproximadamente 2 vezes maiores que as fêmeas normais. Foi aventada a hipótese que o tratamento hormonal teve dosagem excessiva.

As alterações verificadas nos diferentes grupos do mesmo sexo, devidas aos tratamentos adotados, são mais facilmente analisadas com o auxílio das Tabelas 13 e 14.

Tabela 13. Comparação entre os grupos I (Machos normais), III (Machos normais + estradiol), V (Machos castrados) e VII (Machos castrados + testosterona), das médias das concentrações de proteínas totais e das frações A, B, C, D, E, F, e G, de glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos.

PROTEÍNAS	TOTAIS:	I = VII > III = V	OBSERVAÇÕES
FRAÇÃO	A	I > VII = V = III	
FRAÇÃO	B	I = III > VII = V	
FRAÇÃO	C	III = I = V > VII	(III > V)
FRAÇÃO	D	I = VII >>> III = V	
FRAÇÃO	E	VII = I > III > V	
FRAÇÃO	F	I = VII = III = V	
FRAÇÃO	G	VII >> I > III > V	

As proteínas totais mostram, em conformidade com os trabalhos anteriormente citados, que os machos normais + estradiol (III) têm sua secreção protéica reduzida a nível de machos castrados (V), e que os machos castrados + testosterona (VII) recuperam o perfil dos machos normais (I), confirmando a literatura a respeito (ver BARKA, 1980). As frações D (betaglobulinas) e E (gamaglobulinas) mostram resultados semelhantes para machos normais (I) e machos castrados + testosterona (VII), o que também confirma a

dependência à testosterona. As frações A (albuminas), B (globulinas alfa 1) e F (resíduo no ponto de aplicação) mostram resultados semelhantes para machos castrados (V) e machos castrados + testosterona (VII) indicando sua não dependência ao hormônio. Não há explicação plausível para o comportamento da fração C (globulinas alfa 2), que nos machos normais (I) é semelhante aos machos castrados (V), e ambos superiores aos machos castrados + testosterona (VII). Foram aventadas as hipóteses de uma inibição por excesso de testosterona ou falha na determinação da fração por deficiência de separação. A fração G (catódica), por sua vez, nos machos castrados + testosterona (VII) apresentam resultados significativamente superiores aos machos normais (I), que por sua vez têm concentrações significativamente superiores aos machos castrados (V). Uma fração catódica foi identificada por GELLER, HAMES e ROVELSTAD (1959) e MASSON, CARBONARA e HEREMANS (1965) como sendo de lisozima. Como este trabalho não foi realizado com a preocupação de identificação a confirmação não pode ser feita. Fica a hipótese de que a fração é um componente altamente dependente da testosterona, ou a própria testosterona, em concentração muito aumentada pelo tratamento. Concorre para este raciocínio o fato de que as fêmeas normais + testosterona (IV) ganham um pico proeminente nesta fração, não observado nas fêmeas normais (II) (ver Figuras 3 e 5).

Quanto ao grupo III (machos normais + estradiol), foi registrada uma elevação da fração C (globulinas beta 2) ao nível do grupo I (machos normais) para o qual não foi encontrada explicação plausível.

Tabela 14. Comparação entre os Grupos II (Fêmeas normais), IV (Fêmeas normais + testosterona), VI (Fêmeas castradas) e VIII (Fêmeas castradas + estradiol), das médias das concentrações de proteínas totais e das frações A, B, C, D, E, F e G, de glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos.

PROTEÍNAS TOTAIS:		VIII = IV > VI = II
FRAÇÃO	A	II = VIII = IV > VI
FRAÇÃO	B	IV >> VI > VIII = II
FRAÇÃO	C	VIII > IV >> VI = II
FRAÇÃO	D	VIII > VI = IV = II
FRAÇÃO	E	IV >> VIII = VI = II
FRAÇÃO	F	VIII > IV > VI = II
FRAÇÃO	G	IV = VII >>> VI = II

A comparação das médias das proteínas totais dos diferentes grupos mostra que as fêmeas normais (II) são semelhantes às fêmeas castradas (VI) o que, novamente, indica a não dependência das secreções protéicas, como um todo, ao estradiol em concentrações fisiológicas. Já as fêmeas castradas + estradiol (VIII) têm seus resultados elevados ao nível das fêmeas normais + testosterona (IV), ambos superiores aos encontrados para os grupos VI e II. Estes dados também levam à hipótese de que houve uma sobredose de estradiol, e que este hormônio, em altas doses, altera as condições normais da secreção das glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos.

As mesmas causas parecem ter induzido a predominância das frações C (globulinas alfa 2), D (beta globulinas) e F (resíduo) nas fêmeas castradas + estradiol (VIII) em relação ao encontrado nos outros grupos femininos (II, IV e VI). Acompanhando o encontrado nos resultados das proteínas totais, todas as frações, exceto a A (albuminas), têm menores resultados no grupo II (fêmeas normais).

Na comparação dos grupos femininos os valores encontrados para todas as frações, exceto a B (globulinas alfa 1), foram menores nas fêmeas castradas (VI) que nas fêmeas castradas + estradiol (VIII).

No conjunto os resultados obtidos por este trabalho confirmam o dimorfismo sexual nas glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos, o qual gera um perfil significativamente diferente nas separações eletroforéticas de extratos protéicos das glândulas de machos e fêmeas. A dependência à testosterona mostra-se consistente, e a ação do estradiol em concentrações fisiológicas não parece ser importante no processo. Fica demonstrado que um estudo mais detalhado da dose ótima no tratamento com testosterona e, principalmente, com estradiol, deverá ser feito, eliminando algumas discrepâncias aqui observadas. Fica também a indicação de que novos trabalhos poderão mostrar melhor o relacionamento de algumas frações com os hormônios gonadais.

7. CONCLUSOES

A análise dos resultados obtidos na dosagem das concentrações protéicas dos extratos das glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos permitem concluir que:

7.1. As concentrações protéicas do extratos de glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos machos adultos normais são significativamente superiores às fêmeas adultas normais.

7.2. A orquiectomia leva estas concentrações ao nível encontrado nas fêmeas normais ou ovariectomizadas.

7.3. A testosterona induz a recuperação secretora das glândulas dos castrados ao nível das glândulas dos machos normais.

7.4. Fêmeas normais e castradas têm concentração protéica semelhantes em extratos de glândulas submandibulares/sublinguais.

A análise das concentrações protéicas das frações A, B, C, D, E, F e G, obtidas por separação eletroforética em gel de agarose, dos extratos de glândulas submandibulares/sublinguais de camundongos adultos, permitem concluir:

7.5. Machos normais têm concentrações superiores às das fêmeas normais em todas as frações.

7.6. Fêmeas normais tratadas com testosterona têm concentrações superiores às de machos normais tratados com estradiol em todas as frações, exceto nas A e C, onde são semelhantes.

7.7. Machos castrados têm concentrações semelhantes às das fêmeas castradas em todas as frações, exceto na A, onde ocorre o inverso.

7.8. Machos normais têm concentrações superiores aos machos castrados em todas as frações, exceto na C, onde são semelhantes.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ADLER, R., NARBAITZ, R. Action of rat submaxillary gland extracts on neural tube growth in organ culture. *J. Embryol. exp. Morph.*, 114: 281-286, 1965.
- ANDERSON, L. C. Peroxidase release from rat submandibular salivary acinar cells "in vitro". *Archs. oral Biol.*, 31: 501-503, 1986.
- ANGELETTI, P. U., et al. Granulocytosis inducing factor from the mouse submaxillary gland. *Biochim. Biophys. Acta.*, 3: 344-346, 1965.
- ARRUDA VEIGA, M. C. F. *Purificação e caracterização de um peptídeo de glândulas submandibulares de camundongos machos com atividade tóxica renal*. Campinas, 1979. Tese (Mestrado) Instituto de Biologia - UNICAMP).

ARRUDA VEIGA, M. C. F. et al. Determinação da DL50 da Sialotoxina III e sua interação com testosterona em camundongos. *Arg. Biol. Tecn.*, 35 (3): 449-458, 1992.

ATTARDI, D.G. et al. Submaxillary gland of mouse. Effects of a fraction on tissue of mesodermal origin in vitro. *Science*, 150: 1307-1309, 1965.

ATTARDI, D. G., SCHLESINGER, M. J., SCHELESINGER, S.
Submaxillary gland of mouse, properties of a purified protein affecting muscle in vitro. *Science*, 157: 1253-1255, 1967.

BAILEY, G. S. et al. Immunological properties of nerve growth factors. *Biochem. Biophys. Acta.*, 437: 259, 1976.

BANKS, B. E. C., WALTER, S.J. Protein fractions from mouse salivary glands affecting epithelial cells in organ culture. *J. Physiol.*, 234: 241, 1973.

- BARKA, T. Biologically active polypeptides in submandibular glands. *J. Histochem Cytochem.*, 28: 836-859, 1980.
- BOESMAN, M., LEVY, M., SHENKEIN, I. Esteroproteolytic enzymes from the submaxillary gland. Kinetics and other physicochemical properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, 175: 463-474, 1976.
- BOUCHER, R., SAIDI, M. GENEST, J. A new angiotensin I converting enzyme system. In: *Hypertension. New York: Edited by J. Genest.* 23. Koiw. Springer-Verlag, 1972. p.512. Apud BARKA, T. Biologically active polypeptides in submandibular glands. *J. Histochem. Cytochem.*, 28: 836-859, 1980.
- BOUCHER, R., ASSELIN, J., GENEST, J. A new enzyme leading to the direct formation de angiotensin II. *Circ. Res. Suppl.*, 34: 203, 1974.
- BULLOCK, L.P., BARTHE, P.L., MOWSZOWICZ, I. The effect of progestins on submaxillary gland epidermal growth factor: demonstration of androgenic, synandrogenic and antiandrogenic actions. *Endocrinology*, 97: 189, 1975.

- BYYNI, R. L., ORTH, D.N., COHEN, S. Radioimmunoassay of epidermal growth factor. *Endocrinology*, 90: 1261, 1972.
- CALZADA, L. I. Correlacion endocrina glandulas salivales-testiculos. *An. Esp. Odontoestom.*, 34 (3): 215-226, 1975.
- CAMPOS, M.R., et al. Efeito da Sialotoxina I sobre a captação de glucose pelo diafragma de ratos. *Arq. Biol. Tecnol.*, 35 (3): 421-430, 1992.
- CARAMIA, F. Ultrastructure of mouse submaxillary gland I. Sexual differences. *J. Ultrastruct.Res.*, 16: 505-523, 1966.
- CARPENTER, G., COHEN, S. Epidermal growth factor. *Annu. Rev. Biochem.* 48: 193, 1979.
- CHAI, Y. et al. Proliferative and structural difference between male and female mouse submandibular glands. *Anat. Rec.*, 235 (2): 303-311, 1993.

- COHEN, S. Purification and metabolic effects of a nerve growth-promoting protein from snake venom. *J. Biol. Chem.*, 234: 1129, 1959.
- COHEN, S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in new born animal. *J. Biol. Chem.*, 237 (5): 1555-1562, 1962.
- COHEN, S., LEVI-MONTALCINI, R. A nerve growth stimulating factor isolated from snake venom. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 42: 571, 1956.
- COHEN, S., et al. Isolation and characterization of renin-like enzymes from mouse submaxillary glands. *Biochemistry*, 11: 4286, 1972.
- COX, C. P., QUISSEL, D. O. A novel platelet-activating protein derived from rat submandibular glands. *Thromb. Res.*, 39 (3): 343-353, 1985.

DEMASSIEUX, S. et al. Purification and characterization of
tonina. *Can. J. Biochem.*, 54: 788, 1976.

EKFORS, T. O., et al Four izozymic forms of a peptidase resembling
kallikrein purified from therat submandibular gland. *Hoppe-
Seylers Z. Physiol. Chem.*, 348: 111, 1967.

EKFORS, T. O., HOPSU-HAVU, V.K. Properties of the esteropeptidase
purified from the mouse submandibular gland. *Enzymologia*, 43:
177, 1972.

EKFORS, T. O., MALMIHARJU, T., HOPSU-HAVU, V.K.
Isolation of six tryptain-like esteropetidases from the
mouse submandibular gland. *Enzymologia*, 43: 151-158.
1972.

EKSTRÖM, J., EKMAN, R. Calcitonin gene-related peptide in
rat salivary glands: neuronal localization, depletion
upon nerve stimulation, and effects on salivation in
relation to substance P. *Neuroscience*, 26 (3): 933-949,
1988.

FAVA DE MORAES, F., ZANGHERI, E.O., DOINE, A.L.

Immunohistochemical localization of eritropoietin in the rat and mouse submandibular gland. *Histochem. J.*, 11: 97, 1979.

GAUTVIK, K. M., BERG-ORSTAVIK, T., NUSTA D. K. Role of the kallikrein-kinin system in glandular secretion. In: Chemistry and Biology of the kallikrein-kinin and Biology of the kallikrein-kinin system in health and Disease, vol, 27, p. 335. Apud BARKA, T. Biologically active polypeptides in submandibular glands. *J. Histochem Cytochem.*, 28: 836-859, 1980.

GELLER, J. H., HAMES, L., ROVELSTAD, G. H. Electrophoresis of saliva. *J. D. Res.*, 5: 854-859, 1959.

GRESIK, E., BARKA, T. Immunocytochemical localization of epidermal growth factor in the developing submandibular gland of the mouse. *Am. J. Anat.*, 151: 1, 1978.

GUTMAM, Y., LEVY, M., SHORR, J. Renin-like activity of the rat submaxillary gland: characterization and the effect of several drugs and stimuli. *Br. J. Pharmac.*, 47: 59, 1973.

HALL, H. D., SCHNEYER, C. A. Paper electrophoresis of rat salivary secretions. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 117: 789-793, 1964.

HARDIN, A. Connection between the parotid glands and the generative organs. *LANCET*, 1: 374, 1886. Apud WAGNER, 24. M. *Influência da extirpação cirúrgica das glândulas salivares principais sobre o crescimento corporal de ratos machos*. Tese (Docência livre em Fisiologia)-Faculdade de Odontologia de Porto Alegre, Universidade do Rio Grande do Sul, 1961. 65 p.

HATAKEYAMA, K., HIRAMATSU, M., MINAMI, N. Lethal factor in the male mouse submandibular gland. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 59:1134-1138, 1981.

HIKI, Y. et al. Experimental studies on diabetes mellitus. *Transact. Soc. Path. Japonicae* 19: 49-56. 1929. Apud. OGATA T. The internal secretion of salivary gland. *Endocrinol. Japonicae*, 4 (2): 247-261, 1955.

HIKI, Y. et al. Experimental studies on the salivary gland.

Transact. Soc. Path. Japonicae, 20: 130-133, 1930. Apud

OGATA, T. The internal secretion of salivary gland. *Endocrinol. Japonicae*, 4 (2):247-261, 1955.

HIKI, Y. et al. On a Internal Secretion of the Salivary

Gland. *Tokyo Igakukai Zasshi*, 48: 856-878, 1934. Apud

OGATA, T. The internal secretion of salivary gland. *Endocrinol. Japonicae*, 4 (2): 247-261, 1955.

HOFFMAN, H. et al. An endothelial growth-stimulating factor from salivary glands. *Expl. Cell. Res.*, 102: 269, 1976.

HOGUE-ANGELETTI, R.A., BRADSHAW, R.A., FRAZIER, W.A. Nerve growth factor: Structure and mechanism of action. *Adv. Metab. Disord.* 8: 285, 1975.

HOSHINO, K., LIN, C.O. Transplantability of salivary of mice and its lethal effects on the host. *Anat. Rec.*, 160: 474. 1968.

- HUTSON, J. N., EVANS, D., FOWLER, R. Effect of salivary glands on wound contraction in mice. *Nature*. 279: 793, 1979.
- ITO, Y. Parotin: A salivary gland hormone. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 85: 228-310, 1960.
- ITO, S. et al. Angiotensin-like immunoreactivity in the rat submaxillary gland. *Arch. Histol. Jap.* 42: 89, 1979.
- JONES, R. O. The "in vitro" effect of epithelial growth factor on rat organ culture. *Expl. Cell Res.*, 43: 645, 1966.
- JONES, R. O., ASHWOOD-SMITH, M. J. Some preliminary observations on the biochemical and biological properties of epithelial factor. *Expl. Cell Res.*, 59: 161, 1970.
- JORGENSEN, J. W. Electrophoresis. *Anal. Chem.*, 587 (7): 743-760, 1986.

JUNQUEIRA, L.C.V. et al. Biochemical and histo-chemical observations on the sexual dimorphism of mice submaxillary glands. *J. Cell Comp. Physiol.*, 34: 129-149, 1949.

KASAYAMA, S., YOUSIMURA, M., OKA, T. Regulation by thyroid hormones and androgen of epidermal growth factor synthesis in the submandibular gland and its plasma concentration in mice. *J. Endocr.*, 121: 269-275, 1989.

KELLY, Y. et al. Salivary gland glucagon, effect of age and sex. *Clin. Res.*, 25: 572, 1977.

KEMP, A., MELLOW, L., SABADINI, E. Inhibition of interleukin 1 activity by a factor in submandibular glands of rats. *J. Immun.*, 137 (7): 2245-2251, 1986.

KINERSLY, T. Preliminary paper electrophoretic study of saliva. *J. Biol. Med.* 26: 211, 1953.

LAWRENCE, A. M., et al. Salivary gland glucagon in man and adult animals. *Metabolism*, 25: 1405, 1976a.

LAWRENCE A.M., et al. Submaxillary gland hiperglycemic factor in man and animals: An extrapancreatic glucagon. *Clin. Res.*, 24: 364. 1976b.

LAWRENCE, A. M. et al. Salivary gland hiperglycemic factor: An extrapancreatic source of glucagon-like material. *Science*, 195: 70-72, 1977.

LEVI-MONTALCINI, R., ANGELETTI, P. U. Hormonal control of the NGF content in the submaxillary glands of mice. *Apud Salivary glands and their secretions*. Edited by L. M. Screenby and J. Meyer. Pergamon Press Book, The Macmillan Company, New York, 1964. pp. 129-139.

LEVI-MONTALCINI, R., ANGELLETTI, P. U. Nerve Growth Factor. *Physiol. Rev.*, 48: 534, 1968.

- LIN, C. D., HOSHINO, K. Testosterone dependency of the lethal factor in mouse submandibular gland isografts. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 47: 335, 1969.
- LIN, C. D., HOSHINO, K. Strain differences in the lethal factor exerted by submandibular glands transplanted from male mice. *Experientia*, 26: 753, 1970.
- LISKE, R., REBER, K. Nonsuppressible insulin-like activity rat organ as detected by fluorescent antibody and radioimmunoassay techniques. *Horm. Res.* 7: 214, 1976.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
- MANDEL, I. D. Electrophoretic studies of saliva. *J. Dent. Res. Supplement.*, 45: 634-643, 1966.
- MARTI, U., BURWEN, S.J., JONES, L. A. Biological effects of epidermal growth factor, with emphasis on the gastrointestinal tract and liver: an update. *Hepatology*, 9 (1): 126-138, 1989.

- MASSON, P. L., CARBONARA, A. O., HEREMANS, J. F. Studies on the proteins of human saliva. *Biochem. Biophys. Acta*, 107: 485-500, 1965.
- MAYNER, D. A., ACKERMAN, G. A. Tissue localization of ribonuclease activity by the substrate film technique. *25. Histochem. Cytochem.*, 11: 573, 1963.
- MURAKAMI, K., TANIGUCHI, H., BABA, S. Presence of insulin-like immunoreactivity and its biosynthesis in rat and human parotid gland. *Diabetologia*, 22: 358-361, 1982.
- OBERG, S. G., IZUTSU, K. T., TRUELOVE, E. L. Human parotid saliva protein composition: dependence on physiological factors. *Res. Oral Biol.*, 27: 231-236, 1982.
- OGATA, T. The internal secretion of salivary gland. *Endocrinol. Japonicae*, 4 (2): 247-261, 1955.

PHYLLIPS, L. G. Parotid swelling associated with lactation. *Amer J. Obstet-Gynec.* 22:434. 1931. Apud WAGNER. E. M. *Influência a extirpação cirúrgica das Glândulas Salivares principais sobre o crescimento corporal de ratos machos.* Tese (Docência livre em Fisiologia)-Faculdade de Odontologia de Porto Alegre. Universidade do Rio Grande do Sul. 1981. 64 p.

PINHEIRO, C. E. Caracterização química e biológica das sialotoxinas. Apud: Simpósio Anual da Academia de Ciências do Estado de São Paulo. São Paulo. 1985. *Anais.* 28. 17.

PINHEIRO, C. E. Sialotoxins: a family of toxic substances isolated from the submandibular glands of the male mice. *Rvta. Odont. Univ. São Paulo*, 2 (3): 157-160. 1988.

RAYNAUD, J. Action de la thyroxine sur la glande sous-maxillaire de la souris castrée. *C.R. Soc. Biol.* 144: 245-250. 1950a.

- RAYNAUD, J. Action locale de la testosterone injectée dans la glande sous-maxillaire de la souris. *Compt. Rend.*, 230: 2045, 1950b.
- RAYNAUD, J., REBEYROTTE P. Différence de l'activité amylasique de la saliva des souris mâles et des souris femelles - son conditionnement hormonal. *C.R. Acad. Sci.* 228: 549-552, 1949.
- ROBINOVITCH, M. R., SREEBNY, L. M. Separation and identification of some of the protein components of rat parotid saliva. *Archs. Oral Biol.*, 14: 935-949, 1969.
- SAVAGE, C.R. Jr., INAGAMI, T., COHEN, S. The primary structure of epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.*, 247: 7612, 1972.
- SCHENKEIN, I. et al. Proteases from mouse submaxillary gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 36: 156, 1969.

- SCHENKEIN, I. et al. Proteolytic enzymes from the mouse submaxillary glands. *Archs. Biochem. Biophys.*, 182: 64, 1977.
- SCHNEYER, L. H., et al. Studies on the protein composition of rodent saliva-I Application of methods of paper electrophoresis to two strains of laboratory rats. *Archs. Oral. Biol.*, 7, 621-631, 1962.
- SHACKLEFOR, J. M., WILBORN, W. H. Structural and histochemical diversity in mammalian salivary glands. *Ala. J. Med. Sci.*, 5: 180-203, 1968.
- SHEAR, M. et al. Changes in amylase activity in submandibular salivary glands of puberal male mice following castration. *Arch. Oral Biol.*, 24: 185-189, 1979.
- SHERIDAN, J. W., STANLEY, E. R. Tissue sources of bone marrow colony stimulating factor. *J. Cell. Physiol.*, 78: 451-460, 1971.

- SHIBA, A., SHIBA, K. S., SUZUKI, K. Analysis of salivary proteins by thin layer sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *Journ. Prost. Dent.*, 55: 263-271. 1985.
- SILVERNAN, H., DUMBAR, J.C. The submaxillary gland as a possible source of glucagon. *Bull. Sinai Hos. Detroit*, 22: 192. 1974. Apud BARKA, T. Biologically active polypeptides in submandibular glands. *J. Histochem Cytochem.*, 28: 836-859, 1980.
- SMITH, R. J., FROMMER, J. Effects of prepuberal castration on development of granular tubules and amylase activity in the male mouse submandibular gland. *Archs. Oral Biol.*, 17: 1561-1571. 1972.
- STEINER, J. C., KELLER, P. J. An electrophoretic analysis of the protein components of human parotid saliva. *Archs. Oral Biol.*, 15: 1213-1221. 1968.
- SWIGART, R.H. e tal. Effect of gonadal hormones on submandibular gland amylase activity in male and female C 57BL/6J mice. *Endocrinology*, 76: 776-780. 1965.

d

by extracts of the submaxillary gland. *Prod. Sec. Exp. Biol. Med.*, 126: 212, 1967.

TAKEDA, T., GROLLMAN, A. Inhibitory action of a submaxillary gland on thymus and lymphoid tissue of the mouse. *Am. J. Physiol.*, 215 (6): 1337-1342, 1968.

TISELIUS, H. A. Electrophoresis of serum globulin, II. *Biochem. J.*, 31: 1464, 1937.

TISELIUS, H. A., KABAT, E. A. Electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations. *J. Exper. Med.*, 69: 119, 1939.

TUOMELA, T. et al. Estrogen androgen antagonism in the regulation of epidermal growth factor in mouse submandibular salivary gland and kidneys. *Life Sci* 47 (2): 1925-1932, 1990.

TUOMELA, T., VIINIKKA, I., PERHEENTUPA, J. Mouse epidermal growth factor concentrations are altered by gonadectomy and treatments with estradiol and progesterone. *Life Sci.* 44(24): 1815-1822, 1989.

VARON, S. Nerve growth factor and its mode of action. *Exp. Neurol.*, 48: 75, 1975.

WAGNER, E. M. *Influência da extirpação cirúrgica das glândulas salivares principais sobre o crescimento corporal de ratos machos*. Tese (Docência Livre em Fisiologia)-Faculdade de Odontologia de Porto Alegre. Universidade do Rio Grande do Sul, 1961. 64 p.

WALLACE, L.J., PARTLOW, L.M., ELLIS, M.E. Alpha-adrenergic regulation of the secretion of an anticomplementary factor in mouse saliva. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 152: 99, 1976.

WEILL, J. C., et al. Inactivation of complement by mouse saliva enzymatic degradation of C2, C3, C4, C5 e C7. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 12: 425, 1979.

WERLE, E., RODEN, P. Ueber das vorkommen kalikrein in der speichel druesen und in munda speichel. *Biochemie*, 286: 213, 1936.

- WERLE, E., TRAUTSCHOLD, I., SCHMAL, A. Ueber ein Iso-enzym des Renins und ueber die Isolierung eines Biologisch aktiven Spaltproduktes seines Substrates. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, 332: 79, 1963.
- WERLE, E., VOGEL, R., GOLDEL, L.F. Ueber ein blutdrucksteigerndes Prinzip in Extrakten aus der Glandula submaxillaris der weissen Maus. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 230: 236, 1957. Apud BARKA, 27. Biologically active polypeptides in submandibular glands. *J. Histochem Cytochem.*, 28: 836-859, 1980
- ZANGHERI, E. O., et al. The role of submandibular gland on extrarenal erythropoietin production. *Experientia*, 29: 706, 1973.

9. RESUMO

Cento e sessenta camundongos adultos, idade entre 30 e 45 dias, pesando 25 a 35g, foram distribuídos ao acaso, de modo a formar 8 grupos de 20 animais:

Grupo I: Machos normais: foram sacrificados e extraídas suas glândulas submandibulares/sublinguais.

Grupo II: Fêmeas normais: foram sacrificadas e extraídas suas glândulas submandibulares/sublinguais.

Grupo III: Machos normais + estradiol: receberam uma série de 15 injeções intraperitoneais, diárias, de 2mg/kg de peso vivo, de estradiol. Dois dias após o término da série tiveram as glândulas extraídas.

Grupo IV: Fêmeas normais + testosterona: o mesmo tratamento que o grupo anterior, substituindo o estradiol por testosterona.

Grupo V: Machos castrados: os animais foram castrados e após 40 dias tiveram as glândulas extraídas.

Grupo VI: Fêmeas castradas: o mesmo tratamento que o grupo anterior.

Grupo VII: Machos castrados + testosterona: os animais foram castrados e após 40 dias receberam uma série de 15 injeções intraperitoneais, diárias, 2mg/kg de peso vivo, de testosterona. Dois dias após a série tiveram as glândulas extraídas.

Grupo VIII: Fêmeas castradas + estradiol: o mesmo tratamento que o grupo anterior, substituindo a testosterona por estradiol.

De cada grupo foram formados 3 subgrupos de 6 ou 7 animais. Das glândulas foram obtidos extratos protéicos e dosadas as proteínas totais, pelo método de LOWRY. Para cada grupo foram obtidas as seguintes médias (mg/g de tecido glandular): I=49,87, II=22,36, III=32,44, IV=42,46, V=27,11, VI=27,35, VII=46,60 e VIII=42,59. Comparados estatisticamente pelo teste de TUKEY, estes grupos mostraram diferenças significativas a nível de 5% ($p < 0,05$): Machos normais (GI) têm concentração protéica superior às fêmeas normais (GII); machos castrados (GI) têm suas concentrações reduzidas aos níveis de fêmeas normais (GII) e fêmeas castradas (GVI). Machos castrados (GV) têm concentração inferior aos machos normais (GI), mas os machos castrados + testosterona (GVIII), retomam os níveis dos machos normais (GI), caracterizando a dependência da secreção protéica à testosterona. As fêmeas normais (GII) têm resultados semelhantes às fêmeas castradas (GVI).

inferiores às fêmeas castradas + estradiol (GVIII).

Amostras dos 8 grupos foram submetidos à eletroforese em agarose. Foram distintas em todos os grupos das seguintes frações: A (correspondentes às albuminas), B (globulinas alfa 1), C (globulinas alfa 2), D (beta-globulinas), E (gama-globulinas), F (resíduo no ponto de aplicação) e G (fração catódica). Para cada grupo foram calculadas as concentrações de cada fração protéica (mg/g de tecido glandular): Grupo I (machos normais): A=5.34, B=5.56, C=5.02, D=15.80, E=10.45, F=5.79 e G=1.88; Grupo II (fêmeas normais): A=5.65, B=1.89, C=3.00, D=5.85, E=3.22, F=2.63 e G=0.09; Grupo III (machos normais + estradiol): A=4.14, B=4.99, C=5.12, D=5.81, E=7.26, F=4.22 e G=0.86; Grupo IV (fêmeas normais + testosterona): A=5.02, B=5.99, C=5.88, D=8.00, E=9.74, F=5.40 e G=2.39; Grupo V (machos castrados): A=4.22, B=3.73, C=4.03, D=5.37, E=5.39, F=3.89 e G=0.46; Grupo VI (fêmeas castradas): A=3.47, B=3.85, C=3.84, D=8.06, E=4.15, F=3.60 e G=0.35; Grupo VII (machos castrados + testosterona): A=4.23, B=3.75, C=3.67, D=14.68, E=10.55, F=4.44 e G=5.25; Grupo VIII (fêmeas castradas + estradiol) A=5.16, B=1.96, C=9.45, D=10.24, E=5.05, F=8.40 e G=2.30. O tratamento estatístico destes dados mostram (sempre considerando diferenças significativas a nível de 5%) que: Machos normais (GI) têm concentrações protéicas de todas as frações superiores às fêmeas normais (GII). As fêmeas normais + testosterona (GIV) têm concentrações superiores aos machos normais + estradiol (GIII) em todas as frações, exceto A e C, onde se igualam. Machos castrados (GV) têm concentrações iguais às fêmeas castradas (GVI) em todas as frações, exceto a A, onde $GV > GVI$. As fêmeas castradas + estradiol (GVIII) mostraram concentrações superiores aos machos castrados +

testosterona (GVII) em todas as frações, exceto nas B e E, onde $GVII > GVIII$.

As comparações entre os grupos I (machos normais), V (machos castrados) e VII (machos castrados + testosterona) mostraram, no geral, uma feminilização do perfil dos animais castrados (GV), e retorno ao perfil masculino com o tratamento com testosterona. A comparação entre os grupos II (fêmeas normais), VI (fêmeas castradas) e VIII (fêmeas castradas + estradiol) mostra que, no geral, as fêmeas castradas (GVI) não apresentam diferenças em relação as fêmeas normais (GII), e as fêmeas castradas + estradiol (GVII) apresentam concentrações superiores às fêmeas normais (GII) em todas as frações, exceto a A, onde se igualam.

10. SUMMARY

A hundred and sixty 30 to 45 days old mice, 25-35g in weight, were used to form 8 groups with 20 animals:

Group I: Normal males: were killed and submandibular/sublingual glands removed.

Group II: Normal females: were killed and submandibular/sublingual glands removed.

Group III: Normal males + estradiol: estradiol was administered for 15 days, in a dose of 2 mg/1 kg of body weight. Two days after the treatment the glands were removed.

Group IV: Normal females + testosterone: testosterone was administered for 15 days in a dose of 2 mg/1 kg of body weight. Two days after the treatment the glands were removed.

Group V: Castrated males: were castrated and the 40 days after glands removed.

Group VI: Castrated females: were castrated and 40 days after glands removed.

Group VII: Castrated males + testosterone: were castrated and 40 days after testosterone administered for 15 days, in a dose of 2 mg/1 kg of body weight. Two days after the treatment the glands were removed.

Group VIII: Castrated females + estradiol: were castrated and 40 days after estradiol administered for 15 days, in a dose of 2 mg/1 kg of body weight. Two days after the treatment the glands were removed.

From each group 3 sub-groups were taken with 6 to 7 animals. From the glands the protein extracts were got. Proteins were dosed by Lowry's method. Each group protein concentration was (mg/g of body weight): I=49,87, II=22,36, III=32,44, IV=42,46, V=27,11, VII=27,35, VII=46,60 and VIII=42,59.

Statistical analysis showed that normal males (GI) have higher protein concentrations than normal females (GII); castrated males (GV) have lowered their concentrations to normal females (GII) and castrated females (GVI) levels. Castrated males (GV) have lower concentrations than normal males (GI) but castrated males + testosterone returns to normal males levels, showing the characteristic of proteins secretion to testosterone dependence. Normal females (GII) and castrated females (GVI) have similar concentrations both lower than castrated females + estradiol (GVIII) level.

Protein extracts electrophoresis in agar gel were carried out as routine serum method of analyses. Each group showed the following fractions: A (Albumins), B (Alpha 1-globulins), C(Alpha 2-

globulins), D (Beta-globulins), E (Gama-gobulins), F (Aplication residue) and F (Cathodal fraction).

Each fraction had iti protein concentration calculated (mg/kg of body weight): Group I (Normal males): A: 5,34, B=5,56, C=5,02, D=15,80, E=10,45, F=5,79, G=1,88. Group II (Normal females): A=5,65, B=1,89, C=3,00, D=5,85, E=3,22, F=2,63, G=0,09. Group III (Normal males + estradiol): A=4,14, B=4,99, C=5,12, D=5,81, E=7,26, F=4,22, G=0,86. Group IV (Normal females + testosterone):A=5,02, B=5,99, C=5,88, D=8,00, E=9,74, F=5,40, G=2,39. Group V (Castrated males): A=4,22, B=3,73, C=4,03, D=5,37, E=5,39, F=3,89, G=0,46. Group VI (Castrated females):A=3,47, B=3,85, C=3,84, D=8,06, E=4,15, F=3,60, G=0,35. Group VII (Castrated males + testosterone): A=4,23, B=3,75, C=3,67, D=14,68, E=10,55, F=4,44, G=5,25. Group VIII: (Castrated females + estradiol): A=5,16, B=1,96, C=9,45, D=10,24, E=5,05, F=8,40, G=2,30.

Statistical analysis showed that normal males (GI) have protein concentrations higher than normal females (GII) in all fractions. Normal females + testosterone (GIV) have higher than normal males + estratiol (GII) in all fractions except A an C, where they are similar. Castrated males (GV) and castrated females (GVI) have similar concentrations in all fractions except A, were $GV > GVI$. Castrated females + estradiol (GVIII) have higher concentrations than castrated males + testosterone (GVII) in all fractions except B and E, where $GVII > GVIII$.

Groups I (Normal males), V (castrated males) and III (castrated males + testosterone) comparison in general showed a lowering of concentrations of castrated males (GV) to normal females (GII) or castrated females (GVI) levels; castrated males + testosterone (GVII) returns to normal males (GI) levels.

Groups II (Normal females), VI (castrated females) and VIII (castrated females + estradiol) comparison in general showed that normal females (GII), and castrated females (GVI) are similar; castrated females + estradiol (GVIII) have higher protein concentrations in all fractions except A, where they are similar.