

ALMEIDA

LOULBANE APATÓ MEDINEIRA DE ALMEIDA
= Cirurgiã Dentista =

EFEITOS DA SIALOTOXINA I SOBRE O HEMOGRAMA,
FÍGADO E BAÇO DE CAMUNDONGOS FÊMEAS

*Este exemplar foi
devidamente corrigido
conforme Resoluções CCEG/036/83
Piracicaba 12/08/91*

Guimarães

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

*Guimarães, Ulricides Jr.
S.L.C.*

PIRACICABA - SP

Maio - 1991

36/91

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

*À meus pais,
de quem sempre recebi estímulo,
compreensão e apoio e com quem
aprendi à superar
obstáculos,*

DEDICO ESTE TRABALHO

*Ao FERNANDO, meu marido,
pelo carinho,
pelos problemas partilhados
e incentivo recebido.*

*Aos meus filhos BARBARA e
FERNANDO JR., por tudo que
representam.*

Ao Professor Doutor ALCIDES GUIMARÃES, por sua imensa capacidade de compreensão, paciência e incentivo, apesar dos desvios do caminho, pela dedicação e empenho demonstrados durante a orientação deste trabalho e, sobretudo, pela amizade com a qual sempre me brindou durante todos os anos de minha vida acadêmica,

O MELH RUITO GERIGADA.

Ao Professor Doutor DECIO TEIXEIRA, pelo pioneirismo e força de vontade demonstrados na implantação do curso de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica do Sistema Estomatognático, pelo estímulo e apoio sempre presentes diante das inúmeras dificuldades surgidas, e pelos conhecimentos e experiências transmitidos, proveitosos que foram à minha formação científica.

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Doutor CARLOS ALBERTO VOGT, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas, pelo seu empenho em melhorar a qualidade de ensino e pesquisa.

- Ao Professor Doutor RENATO ROBERTO BIRAL, Digníssimo Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba pelo seu exemplo de amor e dedicação à nossa escola.

- Ao Professor Doutor THALES DA ROCHA MATTOS FILHO, Coordenador Geral dos Cursos de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP pela seriedade com que conduz seu trabalho.

- Ao Professor Doutor JOÃO LEONEL JOSÉ, Chefe do Departamento de Ciências Fisiológicas da FOP-UNICAMP, pela amizade, atenção, positivismo e ensinamentos valiosos que muito contribuíram para o enriquecimento da minha vida acadêmica.

- À Professora Doutora MARIA CECILIA FERRAZ DE ARUDA VEIGA pelo apoio, amizade, carinho e ensinamentos transmitidos e pelas sugestões no decorrer deste trabalho.

- Ao Professor Doutor CARLOS EDUARDO PINHEIRO, Titular da Disciplina de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, pela colaboração e fornecimento da Sialotoxina I, possibilitando a realização de nossa pesquisa.

- Ao Professor Doutor PEDRO LUIS ROSALEM pela atenção e auxílio técnico fundamental ao desenvolvimento deste trabalho.

- Ao Professor Doutor MARIO ROBERTO VIZIOLI por sua atenção, sugestões valiosas e espírito de colaboração no decorrer de nossa pesquisa.

- Ao Professor Doutor NORAIR SALVIANO DOS REIS, Chefe do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia - UNICAMP pela ajuda despretenciosa mas necessária à consolidação deste trabalho.

- Ao Professor RONALDO SEICHI WADA, pela programação e orientação estatística.

- Aos Srs. CARLOS ALBERTO APARECIDO FELICIANO e PAULO DO AMARAL, pelo apoio técnico e boa vontade.

- À Sra. SHIRLEY ROSANA SBRAVATTI MORETO, pela prestimosa colaboração.

- À Sra. SUELI DUARTE DE OLIVEIRA SOLLANI, pelo auxílio na revisão bibliográfica.

- A todos aqueles que direta ou indiretamente possibilitaram a realização desta pesquisa.

CONTEDIDO

	Página
CAPITULO I	
1 - INTRODUÇÃO	1
CAPITULO II	
2 - REVISTA DA LITERATURA	5
2.1. Glândulas salivares e seus fatores ativos	5
2.2. Glândulas salivares e seus fatores letais	11
2.3. Glândulas salivares e sistema linfóide	17
CAPITULO III	
3 - PROPOSIÇÃO	22
CAPITULO IV	
4 - MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. Técnicas utilizadas	24
4.2. Tratamento estatístico	25
CAPITULO V	
5 - RESULTADOS	27
5.1. Análise hematológica	27
5.2. Análise histológica	41
CAPITULO VI	
6 - DISCUSSÃO	48
CAPITULO VII	
7 - CONCLUSÕES	56
CAPITULO VIII	
8 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
CAPITULO IX	
9.1. RESUMO	68
9.2. SUMMARY	70

1 - INTRODUÇÃO

Grande número de trabalhos de pesquisa tem enfatizado a importância das glândulas salivares, considerando tanto a sua atividade exócrina quanto a endócrina. Estes trabalhos também possibilitaram a constatação da presença, nestas mesmas glândulas, de peptídeos biologicamente ativos, incluindo vários hormônios.

Assim sendo, tem havido empenho da parte dos pesquisadores, em se caracterizar melhor, química e biologicamente, os polipeptídeos isolados das glândulas salivares, bem como determinar a localização, síntese e seus possíveis papéis fisiológicos. Estes fatores podem ser agrupados em diferentes categorias: 1º) os que atuam sobre o crescimento e a diferenciação celular; 2º) os relacionados com a homeostase; 3º) os relacionados com a regulação intra-celular e, 4º) os relacionados com a digestão (BARKA, 1980).

Assim, COHEN (1960 e 1962) isolou do extrato de glândulas submandibulares de camundongos o fator de crescimento nervoso (NGF) e o fator de crescimento epidermal (EGF). ADLER & NARBBAITZ (1965) isolaram o fator de crescimento de células do tubo neural; JONES (1966) isolou um fator que estimula a proliferação de células epiteliais;

SHERIDAM (1971) isolou um fator estimulante de medula óssea e BARKA (1978) purificou parcialmente um supressor mitótico.

Ainda, observaram-se entre outros fatores: o fator hipertensivo (WERLE, VOGEL & GOLDEL, 1957); um peptídeo que provoca poliúria e albuminúria ao ser injetado subcutaneamente em camundongos (ARRUDA VEIGA, 1979); a presença de renina-2, em glândula submandibular de camundongos, homóloga à resina renal (PANTHIER e cols., 1982); o isolamento e identificação de uma proteinase sérica, da família das calicreínas, em glândula submandibular de ratos (BERG, HOLK & JOHANSEN, 1987) e o fator lipolítico de glândulas submandibulares de ratos (ZIMMOSKA-MODELEWSKA, 1984).

Vários autores tem sugerido a presença de fatores tóxicos e letais nas glândulas salivares de diversas espécies, principalmente em glândulas submandibulares de camundongos. Através destes trabalhos sugeriu-se que os extratos destas glândulas, obtidas a partir de animais adultos, e também a sua saliva, induzida por fenilefrina, são altamente tóxicos quando injetados intra-peritonealmente ou subcutaneamente em camundongos (LIUZZI & ANGELETTI, 1968 e HIRAMATSU, HATAKEYAMA & MINAMI, 1980). O extrato de glândula submandibular de camundongos fêmeas apresenta baixa toxicidade quando comparado ao extrato de machos (COHEN, 1962 e LIUZZI & ANGELETTI, 1968), assim como a saliva de fêmea induzida por fenilefrina (HATAKEYAMA & MINAMI, 1980).

HOSHINO & LIN, 1968, também identificaram um fator letal, androgeno-dependente, produzido nas glândulas subman-

dibulares de camundongos machos quando transplantadas para camundongos machos ou fêmeas. Os mesmos autores sugeriram que a produção desse fator ocorre a nível dos túbulos secretórios destas mesmas glândulas (HOSHINO & LIN, 1970). Posteriormente, foi demonstrado que esse fator é abolido pela ligação dos ductos excretórios das glândulas submandibulares (HUANG, HOSHINO & LIN, 1972).

PINHEIRO (1985) isolou das glândulas submandibulares de camundongos machos várias substâncias de natureza tóxica e com atividade letal, denominadas sialotoxinas I, II, III e IV.

AGOSTINHO (1987) demonstrou uma significativa diferença na DL₅₀ de sialotoxina I, entre camundongos machos e fêmeas, sendo as fêmeas mais sensíveis que os machos. Foram observadas ainda diversas manifestações clínicas nestes animais, como hiper-excitabilidade, apatia, poliúria, convulsões e morte.

BOAVENTURA (1988), observando a ação da sialotoxina I sobre a incorporação da glicose e o consumo de oxigênio pelo diafragma de ratos (*in vitro*), evidenciou uma redução do consumo e oxigênio e diminuição da incorporação da glicose, mesmo em presença de insulina.

CALDAS (1988) observou, após administração intraperitoneal de sialotoxina III em camundongos fêmeas, um grande aumento do número de leucócitos com diminuição do número de linfócitos circulantes. As doses administradas (0,5 e 1,0 mg/kg de peso), não provocaram a morte dos animais.

Numerosas observações sugerem também uma interação entre a glândula submandibular e o sistema linfóide. A glândula salivar, presumivelmente, contém fatores que afetam o sistema linfóide em geral, podendo provocar a atrofia do timo e outros órgãos como foi sugerido por alguns autores (BUEKER & SCHENKEIN, 1964; TAKEDA & GROLLMAN, 1968; HOFFMAN & Mc DOUGALL, 1968; NAUGHTON e cols., 1969, 1972). Pode também produzir aumento transitório de granulócitos (ANGELETTI e cols., 1965) e transformações *in vitro* de timócitos (NAUGHTON e cols., 1969). Outros trabalhos demonstraram a supressão da rejeição de enxertos de pele (KONGSHAVN & BLISS, 1970), da formação de anticorpos (KONGSHAVN & LAPP, 1972; KOCH & ROWE, 1976), e do desenvolvimento de hipersensibilidade tardia (ROBERTS e cols., 1976 e HIRAMATSU e cols., 1979) em camundongos tratados com o extrato desta glândula. Em 1986, KEMP e cols., purificaram de glândulas submandibulares de ratos um fator que inibe a proliferação *in vitro* de linfócitos mitógenos e antígenos estimulados. Mais recentemente, PAPPO e cols., 1988, sugeriram que as glândulas salivares podem atuar como via alternativa da resposta imune funcional.

Frente aos resultados destes trabalhos e conhecendo-se a origem glandular da sialotoxina I, surgiu o interesse em estudar as possíveis alterações provocadas pela mesma, sobre o quadro hematológico, e também sobre a histologia de alguns órgãos (fígado e baço).

2 - REVISTA DA LITERATURA

2.1. Glândulas salivares e seus fatores ativos

A descoberta da calicreína nas glândulas salivares por WERLE & RODEN (1936) foi responsável por uma série de trabalhos de pesquisa tanto *in vivo* quanto *in vitro*, que possibilitaram a identificação de muitos outros fatores ativos existentes nessas glândulas.

JUNQUEIRA e cols. (1949) demonstraram a atividade da fosfatase ácida, analisando histoquimicamente os grânulos secretórios dos ductos granulosos de glândulas salivares de camundongos e verificaram que, nos camundongos machos, o nível de atividade dessa fosfatase era aproximadamente duas vezes e meia maior do que nas fêmeas.

A produção de proteases andrógeno-dependentes em glândulas submandibulares de ratos foi relatada por SREEBNY e cols. (1955) e SREEBNY (1960).

SWIGART e cols. (1965) observaram grande atividade amilásica nas glândulas submandibulares de camundongos e verificaram que essa atividade enzimática era maior nos machos.

Foram também isoladas das glândulas submandibulares de ratos e camundongos, diferentes enzimas: quatro a seis isoenzimas "trypsin-like" (EKFÖRS e cols., 1967 e EKFÖRS & HOPFU-HAVU, 1972) e duas proteases, A e D (SCHENKEIN e cols., 1969, 1974 e 1977). Essas enzimas, além de hidrolizarem as ligações arginil das proteínas, apresentavam atividade quimiolítica, demonstrando estar relacionadas filogeneticamente às calicreínas, não parecendo ser andrógeno-dependentes.

SHEAR e cols. (1979) demonstraram que, em animais castrados, havia diminuição da atividade amilásica e que a administração de testosterona em fêmeas e em camundongos castrados provocava aumento dessa atividade.

Posteriormente, BALDISSERA e cols. (1985) relataram que as glândulas salivares de camundongos secretam uma enzima que degrada o glucagon.

ANDERSON (1985) demonstrou *in vitro* que a liberação de peroxidase pelas células acinares de submandibulares de rato foi estimulada em 70% a 80% do total de sua atividade pelo isoproterenol, 15% pela carbamilcolina e que a fenilefrina e a insulina não estimularam sua liberação.

Dos diversos fatores biologicamente ativos produzidos pelas glândulas submandibulares de camundongos machos, um dos mais importantes e amplamente estudados é o Fator de Crescimento Nervoso (NGF). A sua purificação, a partir da glândula submandibular de camundongos machos, foi precedida

pela purificação do Fator de Crescimento Nervoso extraído do veneno de cobra por COHEN & LEVI-MONTALCINI (1958).

Acredita-se que o NGF está intimamente relacionado ao desenvolvimento e manutenção da função normal do sistema nervoso simpático e de alguns neurónios sensitivos (COHEN, 1960).

A administração do NGF parcialmente purificado em ratos recém-nascidos e camundongos, provocou intenso atraso no crescimento e perda de peso (LEVI-MONTALCINI & BOOKER, 1960).

Foi verificado posteriormente que a concentração do fator de crescimento nervoso nas glândulas submandibulares de camundongos é testosterona-dependente, sendo que nas fêmeas sua concentração é menor do que nos machos (LEVI-MONTALCINI & ANGELETTI, 1964).

Trabalhando ainda com glândulas submandibulares de camundongos, COHEN (1962) isolou o Fator de Crescimento Epidermal que foi descrito como polipeptídeo de cadeia única. O primeiro efeito biológico observado foi o de acelerar a abertura de pálpebras e a erupção dos incisivos em camundongos neonatos.

Foi verificado que após a puberdade, ocorre um aumento na concentração do fator de crescimento epidermal (BYNY, ORTH & COHEN, 1972). O FCE também foi detectado em outros tecidos incluindo rins, estômago, pâncreas e intestino delgado (BYNY e cols., 1972; FRATTI e cols., 1976). A

identificação desse fator na glândula submandibular é possível em torno do 20º dia após o nascimento (GRESTIK & BARKA, 1967 e 1978).

KHASHIMATA e cols. (1987) verificaram que o Fator de Crescimento Epidermal sintetizado pelos rins de camundongos é idêntico estrutural e funcionalmente ao peptídeo encontrado na glândula submandibular mas aparece em concentração excessivamente baixa se comparada à encontrada a nível de glândula submandibular.

KASAYAMA e cols. (1988) observaram que a síntese do FCE na glândula submandibular de camundongos é regulada por alteração do nível de mRNA desse fator, por hormônio da tireóide e androgênicos, e que o aumento da concentração plasmática do FCE está submetido apenas à influência dos hormônios androgênicos, não tendo os hormônios tireoidianos papéis relevantes.

Foi demonstrada também a inter-relação entre o mecanismo regulador da síntese e secreção do FCE da glândula submandibular e o desenvolvimento de úlceras gástricas e duodenais. O FCE existente em glândulas submandibulares aumenta em ratos com lesões gástricas (GYSTIN, MULLER e cols., 1988).

MARTI, BURWEN & JONES (1989), fazendo uma revisão sobre o assunto, concluíram que o FCE em roedores aparentemente modula a secreção ácida de células parietais do estômago. Também tem participação importante na cicatrização de feridas e pode ser um dos fatores-chaves para iniciar a regeneração.

ração do fígado após hepatectomia ou lesão química.

ATTARDI e cols. (1965 e 1967) purificaram um fator da glândula submandibular de camundongo que foi chamado de Fator de Crescimento Mesodermal (FCM). O FCM causava a desdiferenciação de fibras musculares, com perda de miosina e de cartilagens e estimulava o crescimento celular mesenquial.

ADLER & NARBAITZ (1965) reportaram a existência de um fator, no extrato de glândulas submandibulares, que foi denominado Fator de Crescimento do Tubo Neural, e observaram que adições desse mesmo extrato à culturas tubo de neural em embriões de galinha, *in vitro*, resultava na abertura dorsal com crescimento irregular e hiperplásico.

JONES (1966) e JONES, ASWOOD & SMITH (1970) estabeleceram que as glândulas submandibulares de camundongos produzem o Fator de Crescimento Epitelial, o qual, em cultura de órgãos, age sobre a proliferação de células epiteliais.

Ainda, fatores existentes nas glândulas submandibulares de camundongos e em glândulas parótidas bovinas, produziram crescimento hiperplásico e hipertrófico de células endoteliais em diferentes órgãos, quando injetados em camundongos recém-nascidos e adultos. Estes fatores foram denominados conjuntamente Fator Estimulante do Crescimento Endotelial (HOFFMAN e cols., 1976).

De fato, HUTSON, EVANS & FOWLER (1979) sugeriram a existência de um Fator Cicatricial que seria secretado na saliva pelas glândulas submandibulares e sublinguais de camun-

dongos, e que agia acelerando o processo de reparo cicatricial.

Pesquisas foram feitas no sentido de relacionar-se glândulas salivares e homeostase. Primeiramente, foi identificado nas glândulas submandibulares de camundongos, um princípio ativo que provocava hipertensão de longa duração quando injetado em camundongos ou em cachorros (WERLE, VOGEL & GOEDEL, 1957).

TURRIAN (1960) demonstrou a presença desse fator hipertensivo, ao verificar que o extrato de glândula submandibular de camundongo, incubado com soro de rato, produzia um fator semelhante à angiotensina.

COHEN e cols. (1972) obtiveram das glândulas submandibulares de camundongos machos, duas enzimas (glicoproteínas) na forma pura e estável, semelhantes à renina. Essas duas enzimas, renina A e C, demonstraram grande atividade hipertensiva em ratos, diferindo um pouco em sua composição de aminoácidos.

Em 1973, GUTMAN e cols. demonstraram a presença da renina em glândulas submandibulares de ratos.

O papel das calicreínas salivares como fatores homeostáticos foi analisado também por HILTON (1970) e SCHACHTER (1970) que descreveram a liberação pelas mesmas, de um decapeptídeo biologicamente ativo, a lisil-bradicinina, enzima vasodilatadora a qual tem sido atribuído importante papel na regulação local do fluxo sanguíneo das glândulas

salivares.

MENGGI e cols. (1987) realizaram um estudo para caracterização e verificação de propriedades anticoagulantes de extratos de glândulas sublinguais de ratos e camundongos. Verificaram que as duas glândulas sublinguais exibiram composição química diferentes, assim como distintas propriedades anticoagulantes. Os constituintes glicocjugados isolados da sublingual de ratos alteraram marcantemente os parâmetros tromboelastográficos e testes de hemocoagulação. Já os glicocjugados de sublingual de camundongos não provocaram mudanças estatisticamente significantes nos tromboelastográficos, mas induziram mudanças significativas no tempo parcial de tromboplastina.

EKSTRÖM & EKMAN (1980) descreveram um neuropeptídeo geneticamente relacionado à calcitonina (CGPR), envolvido na regulação da secreção e fluxo sanguíneo das glândulas salivares. O CGPR pode interagir positivamente com a acetilcolina e alguns outros transmissores não clássicos e pode estar envolvido na secreção parassimpática-atropina-resistente que ocorre nas glândulas salivares estudadas: parótidas, sublinguais e submandibulares de ratos.

2.2. Glândulas salivares e seus fatores letais

Tem sido demonstrado que extratos de glândulas submandibulares de camundongos são extremamente tóxicos, mesmo

com baixa concentração protéica.

A confirmação da presença de fatores tóxicos e a identificação dos mesmos foi possível através da injeção de extratos de glândulas submandibulares de camundongos machos adultos, e também através do transplante dessas mesmas glândulas.

A observação dos sintomas apresentados pelos animais tratados, injetados e/ou transplantados, levou à conclusão de que deveriam existir pelo menos dois fatores tóxicos distintos, denominados Fator Letal e Fator Hemorrágico.

Dessa forma, COHEN (1962) observou que injeção de extrato de glândula submandibular de camundongos machos, a uma concentração de 5% de extrato glandular, em uma dose de 0,3 mg de proteína, foi letal para camundongos recém-nascidos. Doses menores causaram marcante inibição no desenvolvimento dos animais e no crescimento dos pelos. O mesmo autor observou ainda que a administração dos extratos glandulares a 10% obtidos a partir de glândulas submandibulares de camundongos fêmeas adultas, não alterou o ritmo de desenvolvimento dos camundongos recém-nascidos e nem foi observado efeito letal.

Posteriormente, LIUZZI & ANGELETTI (1968) observaram que o fator tóxico presente no extrato de glândula submandibular de camundongos machos deve estar associado a macromoléculas, possivelmente de natureza protéica, visto que não sofreu diálise e a toxicidade foi grandemente destruída

por fervura a 100°C durante 10 minutos. Com o objetivo de localizar os componentes tóxicos desses extratos, esses autores realizaram o fracionamento em colunas "SHEPHADEX G-100", pH neutro e verificaram que algumas frações eram acentuadamente mais tóxicas que outras, sendo a fração E a mais tóxica. Doses sub-letais dessa fração induziram retardo no crescimento de camundongos recém-nascidos e também afetaram alguns órgãos, principalmente o timo, que sofreu severa atrofia.

LIN & HOSHINO (1969) relataram a existência de um fator hemorrágico evidenciado em transplantes subcutâneos de glândulas submandibulares de camundongos, que provocava hematoma local e severa hemorragia sistêmica.

De fato, HOSHINO & LIN (1968 e 1969) observaram que, ao se transplantar glândulas salivares submandibulares para um hospedeiro, ocorria a liberação de um fator tóxico e letal. O transplante da glândula parótida ou de submandibular de fêmea ou macho imaturo não apresenta toxicidade, o que os levou a considerar que a manifestação do fator letal está diretamente relacionada à maturação sexual do camundongo macho, e também a ação da testosterona. O fator letal foi considerado testosterona dependente.

Em concordância com este trabalho, LIN & HOSHINO (1970 e 1971) encontraram diferenças no índice de mortalidade entre camundongos machos e fêmeas que receberam o transplante. O camundongo macho apresentou-se mais resistente.

Observaram ainda que o hospedeiro macho sialoadenectomizado apresentou maior taxa de mortalidade quando comparado com o não sialoadenectomizado e que a testosterona protege as fêmeas hospedeiras contra o efeito letal, tanto nos animais sialoadenectomizados quanto nos não sialoadenectomizados. Estes dados podem sugerir que a presença do hormônio endógeno tem função protetora para o camundongo macho.

HUANG, HOSHINO & LIN (1972) estudaram o efeito da ligação prévia do ducto excretor de glândulas submandibulares na produção do fator letal, como também o efeito da testosterona e isoproterenol em animais transplantados. Observaram que o efeito letal estava presente nas glândulas transplantadas, até três dias após a ligação do ducto excretor, o que não ocorreu após o oitavo dia de pós-operatório. Pequenas quantidades do fator letal foram detectados seis semanas após ligação do ducto excretor. Esses autores demonstraram ainda que a administração de testosterona após a ligação dos ductos e transplante das glândulas intensificou o efeito do fator letal no grupo tratado, e que, no grupo que recebeu solução de isoproterenol após o transplante, foi detectada uma menor quantidade de fator letal. Notou-se, entretanto, aumento de peso glandular em relação ao controle, provavelmente em função da hipertrofia das células acinares, ocasionada pelo tratamento com o isoproterenol.

Posteriormente, HUANG e cols. (1977) relataram que a susceptibilidade ao fator letal variava quando se faziam

comparações entre diferentes espécies animais (camundongos, coelhos e roedores "Mongolian") e diferiam ainda segundo o sexo e grau de maturação sexual dos camundongos. Através destes experimentos, foi demonstrado ainda que o efeito letal das glândulas submandibulares é maior quando sua administração é feita sob forma de homogeneizado do que como transplantes, sendo que, neste último caso, o fator letal parece ser liberado de forma gradual.

Segundo HIRAMATSU, HATAKEYAMA & MINAMI (1980) o fator letal aparece também na saliva de camundongos machos, e sua liberação ocorre quando da salivação induzida por estimulação de agente alfa-adrenérgico. Tanto o extrato de glândula salivar como a saliva destes animais mostraram-se tóxicos para cobaias, ratos e hamsters. Contudo, a saliva apresentava toxicidade relativamente baixa para camundongos. Os resultados levaram estes autores a sugerir que o fator letal fosse uma proteína exócrina.

HATAKEYAMA, HIRAMATSU & MINAMI (1981) confirmaram os resultados já conseguidos através da purificação de um dos componentes tóxicos da saliva por focalização isocelétrica e cromatografia em DEAE Sephadex A-50. Tal componente foi caracterizado como uma enzima semelhante à calicreína. Concluíram ainda que estes fatores estão localizados nos grânulos serosos dos túbulos secretórios, e que sua secreção na saliva seria controlada por agentes alfa-adrenérgicos.

DEAN & HIRAMOTO (1985) observaram que ratos recém-

nascidos e em fase de amamentação, que receberam injeções subcutâneas de homogeneizado de glândula submandibular de ratos machos, morreram em 24 horas. Por outro lado, ratos desmamados e adultos, que receberam doses proporcionalmente maiores desse mesmo extrato, não morreram. Os autores sugeriram que os ratos recém-nascidos absorveram enzimas que agiram como a tripsina na corrente sanguínea, e como não foram capazes de inativá-las, sofreram crise hipotensiva que os levou ao óbito.

PINHEIRO (1985) identificou e isolou das glândulas submandibulares de camundongos machos, quatro substâncias de baixo peso molecular, e de natureza não proteica, denominadas sialotoxinas I, II, III e IV, todas elas com atividade tóxica e letal para estes animais.

AGOSTINHO (1987) determinou a DL50 da Sialotoxina I (SI), em camundongos de ambos os sexos, e concluiu que o peptídeo promove efetivamente a morte dos camundongos. Existem diferenças nas reações biológicas e na DL50 da SI entre os machos e fêmeas, sendo as fêmeas muito mais sensíveis que os machos. A administração do estradiol nos camundongos machos, assim como sua castração, aumentou a sensibilidade dos mesmos em relação à SI. A testosterona protegeu parcialmente as fêmeas, diminuindo sua sensibilidade. As fêmeas ovariectomizadas apresentaram DL50 e manifestações biológicas semelhantes às das fêmeas normais. Os resultados sugeriram que os efeitos tóxicos de SI sejam, possivelmente, andrógeno-de-

pendentes.

BOAVENTURA (1986) investigou os efeitos da Siatoxina I (SI) sobre a incorporação de glicose e o consumo de oxigênio pelo diafragma de ratos. Concluiu que a SI promove efetivamente a redução do consumo de oxigênio e diminui a incorporação de glicose pelo diafragma de ratos normais e induz a uma diminuição no consumo de oxigênio e redução na incorporação de glicose, mesmo em presença de insulina.

Mais recentemente, SHIMAMURA e cols. (1989) isolaram da glândula submandibular de camundongos uma proteína sérica citotóxica, pertencente à família da calicreina glandular, que tem efeito tóxico sobre linfócitos séricos; o diisopropil-fluorofosfato bloqueou esta atividade citotóxica.

2.3. Glândulas salivares e sistema linfoide

Uma possível interação entre as glândulas submandibulares e o sistema linfoide tem sido também pesquisada, admitindo-se a existência de fatores que afetam o sistema linfoide em geral e o timo em particular.

Desse modo, foi visto que a administração do Fator de Crescimento Nervoso, parcialmente purificado, das glândulas submandibulares de camundongos, reduziu o peso e o número de linfócitos do timo, dos nódulos linfáticos e do baço (BUEKER & SCHENKEIN, 1964 E 1967).

ANGELETTI e cols. (1965) demonstraram que a admí-

nistração interperitoneal de extrato de glândula submandibular em camundongos induziu a um aumento significativo de leucócitos circulantes. Nessa leucocitose transitória (em 24 horas declinava) havia predominância de neutrófilos.

Em 1968, TAKEDA & GROLLMAN verificaram o efeito inibitório do extrato de glândula submandibular de camundongos machos sobre o timo e órgãos linfóides. Observaram também, que 8 a 11 dias após a ligação dos ductos glandulares, o efeito inibitório desaparecia, e que a sialodnectomia protegia o timo e os tecidos linfóides de sua involução normal.

Por outro lado, HOFFMAN e cols. (1970), ao realizarem a extirpação das glândulas submandibulares de camundongos machos com 14 e 21 dias de idade, notaram o desenvolvimento rápido de linfopenia e um período transitório de regressão do timo, o qual, ao retornar ao tamanho normal, era constituído de grande número de plasmoblastos e de poucos linfócitos, já em fase de degeneração. Alterações similares foram observadas no baço e nos linfonodos.

Em 1971, SHERIDAN & STANLEY pesquisaram as possíveis fontes teciduais de Fator Estimulante de Colônias (FECS) existentes em soro de camundongos e que estimula *in vitro*, a formação de colônias por células da medula óssea, granulócitos e/ou macrófagos. Trabalharam com 16 tipos de tecidos diferentes, hematopoéticos ou não. Dentre eles, o extrato de glândula submandibular de camundongos foi o tecido mais rico em FECs, sendo que o extrato de camundongos machos

mostrou atividade 3 ou 4 vezes maior que o obtido em fêmeas. Os fatos sugeriram que o FECs possa ter agido como regulador humoral de granulopoese e formação de monócitos *in vivo* (BRADLEY, METACALF, SUMNER & STANLEY, 1969; METACALF & STANLEY, 1971).

NAUGHTON e cols. (1971) isolaram e purificaram um fator timotrópico das glândulas submandibulares de camundongos. A proteína purificada revelou ser uma estereoprotease com especificidade para ligações peptídeas tipo arginina. Verificaram também que o principal papel imunológico da proteína estava relacionado à transformação de pequenos linfócitos tímicos *in vivo* e *in vitro*, e que sua atividade enzimática e biológica estão correlacionadas.

LANGE (1975), realizando a ligação do ducto excretor das glândulas submandibulares de camundongos machos observou, em período de 7 dias, atrofia das mesmas. Analisando a histologia do baço, timo e linfonodos de animais que receberam extrato de glândulas submandibulares e sublinguais durante 7 dias, notou infiltração de células mononucleares e aumento do número de linfoblastos no córtex do timo. Quanto às glândulas salivares, esse autor encontrou uma reação na porção tubular e decréscimo no volume das submandibulares e sublinguais.

KOCH & ROWE (1976), trabalhando com frações do extrato de glândulas submandibulares de camundongos machos, verificaram que as mesmas tinham ação sobre o estágio inicial

da resposta imune em camundongos sensibilizados com eritrócitos de ovelhas, retardando e reduzindo a resposta a IgM e mais marcadamente na produção de IgG. Os autores chamaram a esse fator ativo, existente no extrato das glândulas submandibulares, de fator imunotranquilizador. A depressão da resposta primária não impede o desenvolvimento de memória imunológica, embora a produção de IgG seja inferior à encontrada nos animais que não receberam tratamento antes da imunização primária. Os resultados encontrados levaram os autores a sugerir que o imunotranquilizador possa provocar um bloqueio temporário no desenvolvimento das células T-helper.

BARKA (1976) demonstrou, nas glândulas submandibulares de ratos e camundongos, um fator ativo que suprime a síntese de DNA estimulada pelo isoproterenol. Esse fator foi parcialmente purificado e denominado de supressor mitótico das glândulas salivares.

A administração de extrato de glândula submandibular de camundongos machos trouxe a resposta de hipersensibilidade tardia a níveis normais, em camundongos que sofriam sialoadenectomia, ao passo que injeções de extrato de glândulas de fêmeas e de camundongos castrados não provocaram esse efeito. Esses resultados, segundo **HIRAMATSU** e cols. (1979), sugerem que as glândulas submandibulares de camundongos machos devem conter um fator endócrino, que regula a resposta da hipersensibilidade tardia.

COX & QUISSSEL (1985), trabalhando com glândulas

submandibulares de ratos, isolaram uma proteína ativadora de plaquetas, com atividade biológica comparável ao colágeno, capaz, *in vitro* de ativar plaquetas de ratos, coelhos e seres humanos, causando agregados e secreção de serotina.

Em 1968, KEMP, MELLOW E SABADINE purificaram do extrato de glândulas submandibulares de rato, um fator com propriedades imunossupressivas (SMG - ISF) capaz de inibir a proliferação *in vitro* de linfócitos mitógenos e antígeno-estimulados.

PAPPO, BERSOLE & TAUBMAN (1968), estudando a função de macrófagos de glândulas salivares de ratos, verificaram que essas células funcionam, efetivamente, como células que apresentam antígeno. Sugerem esses autores, a possibilidade dessas glândulas atuarem como uma via alternativa da resposta imunofuncional.

3 - PROPOSIÇÃO

Conforme pode ser notado pela revista da literatura, muitos trabalhos tem sido realizados no sentido de se procurar elucidar as reais funções das glândulas salivares e seus produtos de secreção. Com referência às substâncias consideradas tóxicas, propôs-se neste pesquisa:

- 1 - Analisar os possíveis efeitos da Sialotoxina I sobre o hemograma (contagem global de eritrócitos, contagem global e específica de leucócitos e hematócrito) de camundongos fêmeas.
- 2 - Estudar, através da análise histológica, as possíveis alterações morfológicas do fígado e baço desses mesmos animais.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente trabalho foram utilizados 30 camundongos fêmeas (*Mus musculus albinus*) com 30 e 45 dias de idade, e peso aproximado de 20 a 30g no início do experimento. Os animais foram alimentados durante o período experimental com ração balanceada padrão e água *ad libitum* sendo mantidos à temperatura ambiente.

Grupos experimentais:

Os animais foram distribuídos em 3 grupos experimentais:

GRUPO I - Controle normal - 10 animais que receberam uma dose de NaCl 0,9% diariamente, durante 10 dias, via intraperitoneal.

GRUPO II - Tratado - 10 animais que receberam uma dose de NaCl 20%/dia pela mesma via, durante 10 dias.

GRUPO III - Tratado - Constituído de 10 animais que receberam uma dose de Sialotoxina I, via intraperitoneal, na concentração de 20 µg/kg de peso/dia, também durante 10 dias. A dose de 20 µg/kg (em radicais fenólicos) de

sialotoxina I foi determinada a partir da DL50 da mesma que é de 1,08 mg/kg (AGOSTINHO, 1987), e que corresponde a 48 µg/kg em radicais fenólicos.

Ao fim dos dez dias de tratamento e antes do sacrifício, foi coletado sangue da cauda dos animais em tubos capilares heparinizados, para leitura do hematócrito e para realização dos esfregaços, objetivando a determinação da contagem diferencial dos leucócitos.

A seguir, os camundongos foram anestesiados com éter etílico em câmpula de vidro, e foi coletado sangue para a realização da eritrometria e leucometria da região do plexo braquial.

Foram retirados também o fígado e o baço dos animais para posterior análise histológica.

4.1 - Técnicas utilizadas

1 - Determinação do Hematócrito: técnica de micro-hematócrito de Wintrobe, que utiliza um volume de sangue igual a 0,1 ml. A leitura foi realizada segundo o índice hematimétrico de Haden.

2 - Determinação da contagem diferencial dos leucócitos: método Fanóptico de Pappenhein em lâminas previamente preparadas e coradas pelo corante de Giemsa simples. A contagem foi realizada em microscópio óptico em objetiva de imersão.

3 - Determinação da eritrometria e da leucometria: Técnica da câmara de contagem de Neubauer. O sangue foi coletado com pipeta de Thoma específica. As leituras foram feitas em microscópio óptico com aumento de 20 a 40 vezes.

4 - Análise histológica: O fígado e o baço foram cuidadosamente retirados, fixados em Bouin por um período de 24 horas, cortados e corados pela Hematoxilina-Eosina, segundo a técnica de rotina. Posteriormente as lâminas foram analisadas ao microscópio óptico. Empregou-se para as observações microscópicas o fotomicroscópio "ZEISS-POL II", no qual foram também obtidas as fotomicrografias.

4.2 - Tratamento estatístico

Foi realizada a análise de variância para o estudo das variáveis: eritrometria, leucometria, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e hematócrito.

Para a análise das 6 (seis) primeiras variáveis, foi utilizada a transformação $\sqrt{\text{contagem}}$ e para a variável hematócrito foi usada a transformação $\text{arc sen } \sqrt{\text{proporção}}$.

Além disso, foi realizado o teste de Tukey ao nível de 5% nos casos em que os resultados da análise de variância foram significantes. Apenas no caso da variável eritrometria foi feito o teste de Tukey ao nível de 10%.

Para efeito das análises denominou-se:

Grupo I - Controle normal (NaCl - 0,9%)

Grupo II - Tratado (NaCl - 20%)

Grupo III - Tratado (Sialotodina I - 20 µg/kg)

5 - RESULTADOS

5.1 - Análise hematológica

Os resultados obtidos através da análise hematológica dos animais dos três grupos experimentais (GRUPO I - NaCl - 0,9%; GRUPO II - NaCl 0 20% e GRUPO III - Sialotoxina 20 µg/kg de peso) estão expressos em valores individuais, valores médios, e segundo análise estatística realizada para as seguintes variáveis: a) eritrometria; b) leucometria; c) neutrófilos; d) eosinófilos; e) linfócitos; f) monócitos; g) hematócrito.

a) ERITROMETRIA

Quadro 1 - Valores individuais e médias da eritrometria encontradas nos animais dos grupos I, II e III.

Animais	ERITROMETRIA (milhões/mm ³)		
	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
1	9.070	7.880	7.380
2	7.100	6.870	5.830
3	8.310	7.980	8.980
4	7.770	6.670	7.180
5	7.830	8.880	6.990
6	5.950	8.060	4.360
7	6.710	8.780	5.410
8	6.930	6.370	6.870
9	7.940	6.730	6.700
10	9.860	5.970	5.760
Média	7.749	7.477	6.506

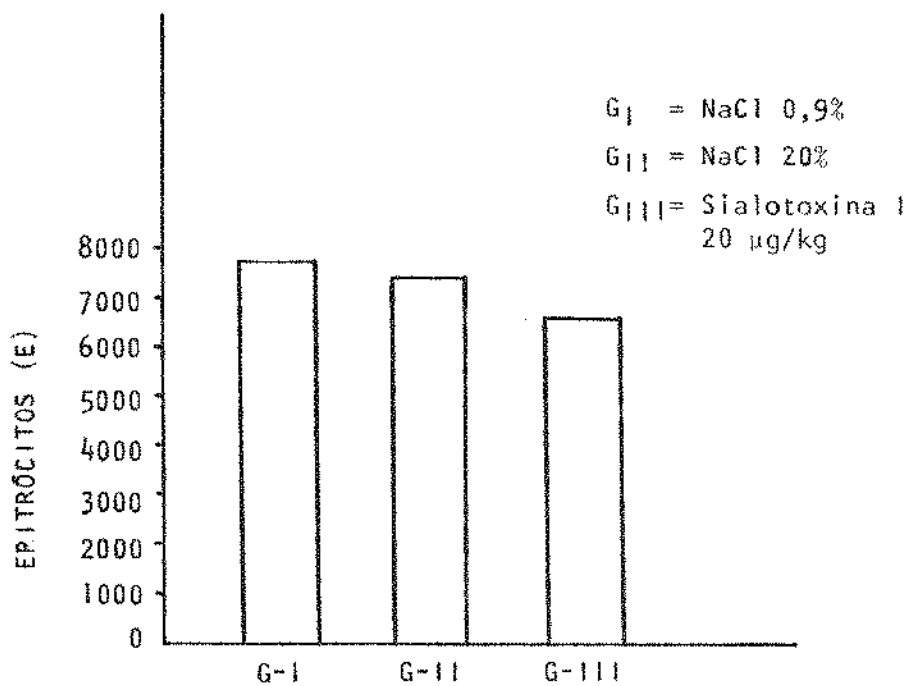


Gráfico 1 - Média dos valores dos eritrócitos (E) x 10³ dos animais dos três Grupos Experimentais por mm³ de sangue.

Tabela 1-Análise de variância relativa aos dados do quadro 1

CV	GL	SQ	QM	F
GRUPO	2	316,731	158,365	3,398*
RESIDUO	27	1262,164	45,747	
TOTAL	29	1578,895		

*Significante ao nível de 5%

Para comparar as médias dos grupos, duas a duas, foi aplicado o teste de Tukey. Ao nível de 5% não há diferença significativa entre as médias. O valor da diferença mínima significativa (d.m.s.), ao nível de 10%, obtido através deste teste é de 6,85. Com base neste resultado, pode-se afirmar que a média do Grupo I é significativamente maior que a média do grupo III. Não existe diferença significativa entre os valores médios encontrados para os grupos I e II, assim como entre as médias dos grupos II e III.

b) LEUCOMETRIA

Quadro 2 - Valores individuais e médias das leucometrias dos animais dos grupos I, II e III.

Animais	LEUCOMETRIA (mm ³)		
	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
1	3.250	8.650	13.000
2	6.050	8.150	14.500
3	7.600	7.420	12.350
4	8.850	8.850	14.900
5	4.100	10.300	13.250
6	8.650	8.700	14.050
7	6.100	9.850	13.550
8	7.350	6.800	14.500
9	5.200	8.550	12.150
10	6.700	7.250	15.400
Média	6.555	8.432	14.254

Os valores das médias referentes ao Quadro 2 estão representados no Gráfico 2.

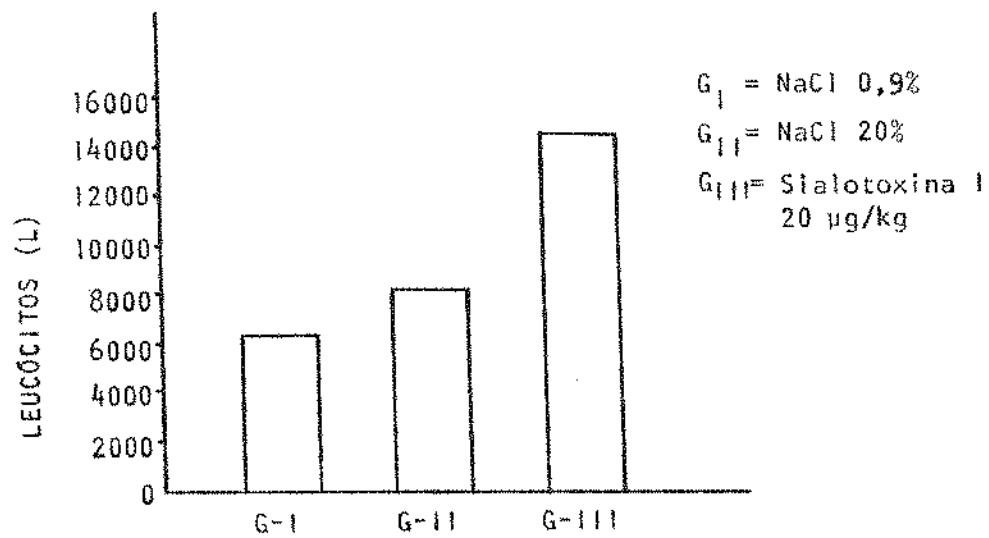


Gráfico 2 - Média dos valores dos leucócitos (L) dos animais dos três Grupos Experimentais, por mm³ de sangue

Os dados apresentados no Quadro 2 foram submetidos a análise de variância conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2-Análise de variância relativa aos dados do quadro 2

CV	GL	SQ	QM	F
GRUPO	2	7956,844	3978,422	64,905*
RESÍDUO	27	1654,990	61,296	
TOTAL	29	1578,898		

*Significante ao nível de 5%

Quando da aplicação do teste de Tukey, obteve-se uma d.m.s. = 8,6841, ao nível de 5%.

Nesse caso, pode-se afirmar que o valor médio encontrado para o grupo III é significativamente maior que o valor médio para o grupo II. Levando-se em conta esse resultado, observa-se que a média do grupo II é significativamente maior que a média do grupo I, e que o grupo III apresenta a maior média e o grupo I apresenta a menor média.

c) NEUTRÓFILOS

Quadro 3 - Valores individuais e valores médios do número de neutrófilos dos animais dos grupos I, II e III.

Animais	LEUCOMETRIA		
	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
1	1.050	1.557	2.470
2	1.633	2.119	5.075
3	1.292	2.449	2.223
4	684	1.681	2.980
5	779	4.120	2.385
6	1.038	3.045	1.405
7	793	1.873	4.081
8	661	1.848	2.755
9	780	1.504	2.308
10	938	1.305	3.342
Média	983	2.108	2.895

Os valores médios encontrados no Quadro 3, estão representados no Gráfico 3.

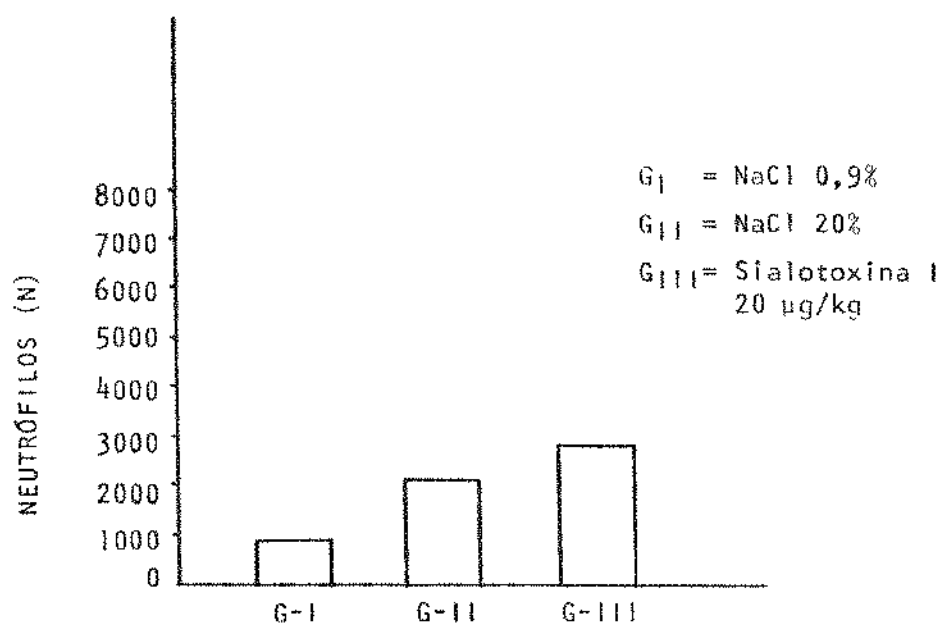


Gráfico 3 - Médias dos valores de neutrófilos (N) dos animais dos três grupos experimentais.

Os dados apresentados no Quadro 3 foram submetidos a uma análise de variância com critério de classificação conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3 - Análise de variância feita em relação aos valores expressos no Quadro 3.

CV	GL	SQ	QM	F
GRUPO	2	2629,463	1314,732	21,58*
RESIDUO	27	1677,738	62,138	
TOTAL	29	4307,201		

*O valor de F é significativo ao nível de 5%

Segundo o teste de Tukey, o valor da diferença mínima significativa ao nível de 5%, é de 8,7435. Esse resultado permite afirmar que não há diferença significativa em relação ao número de neutrófilos encontrados no esfregaço de sangue dos animais de Grupo II e III. Também se pode afirmar que a média de neutrófilos encontrada para o Grupo I é significativamente menor que as médias dos grupos II e III.

d) EOSINÓFILOS

Quadro 4 - Valores individuais e médias de eosinófilos encontrados para os animais dos grupos I, II e III.

Animais	LEUCOMETRIA		
	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
1	318	250	130
2	131	570	145
3	0	445	247
4	86	443	398
5	82	515	398
6	0	251	421
7	122	798	196
8	74	264	290
9	104	177	486
10	268	218	154
Média	131	422	285

As médias dos valores de eosinófilos para cada grupo experimental estão representados no gráfico 4.

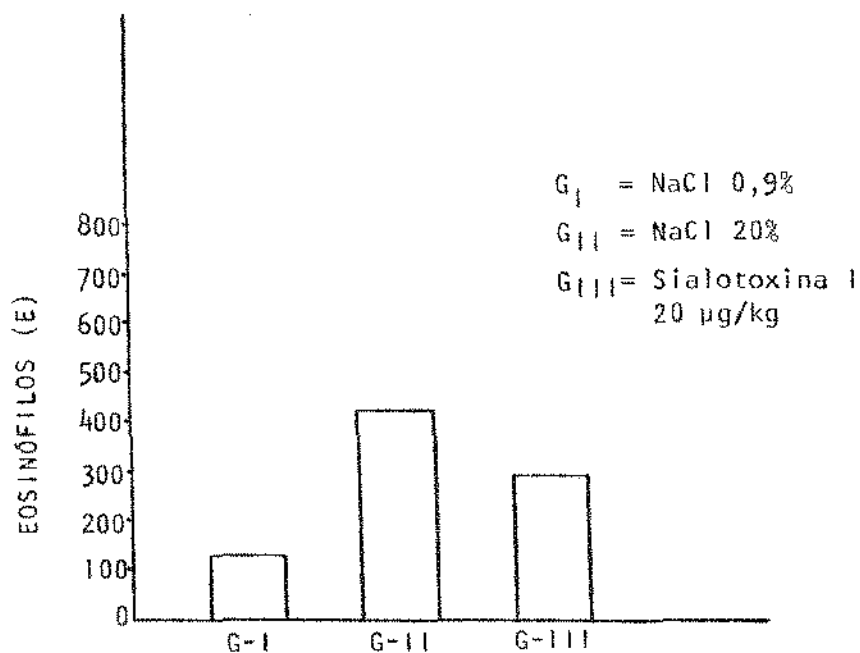


Gráfico 4 - Médias dos valores de eosinófilos (E) dos animais dos três Grupos Experimentais.

A Tabela 4 ilustra a análise de variância a que foram submetidos os dados do Quadro 4.

Tabela 4-Análise de variância relativa aos dados do Quadro 4

CV	GL	SQ	QM	F
GRUPO	2	523,839	261,919	11,164
RESÍDUO	27	633,450	23,461	
TOTAL	29	1157,289		

Neste grupo, a análise de variância foi significativa ao nível de 5%. Com base nos resultados numéricos, observa-se um aumento do número de eosinófilos para os grupos II e III. A análise estatística veio confirmar esta tendência de aumento. Para o teste de Tukey ao nível de 5%, foi encontrada uma d.m.s. de 5,3725. Frente a esses resultados, pode-se afirmar que não há diferença significativa entre as médias de eosinófilos dos grupos II e III. Verifica-se ainda que o valor médio encontrado para o Grupo I é significativamente menor que as médias dos grupos II e III.

e) LINFÓCITOS

Quadro 5 - Valores individuais e médias do número de linfócitos dos animais dos grupos I, II e III.

Animais	LEUCOMETRIA		
	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
1	3.412	6.488	9.490
2	4.114	5.379	7.830
3	6.308	4.304	9.386
4	7.886	6.637	10.579
5	3.116	5.047	9.937
6	7.612	5.220	11.803
7	4.819	6.993	12.985
8	6.321	4.422	10.585
9	3.952	6.840	8.019
10	5.293	5.437	10.780
Média	5.173	5.733	10.156

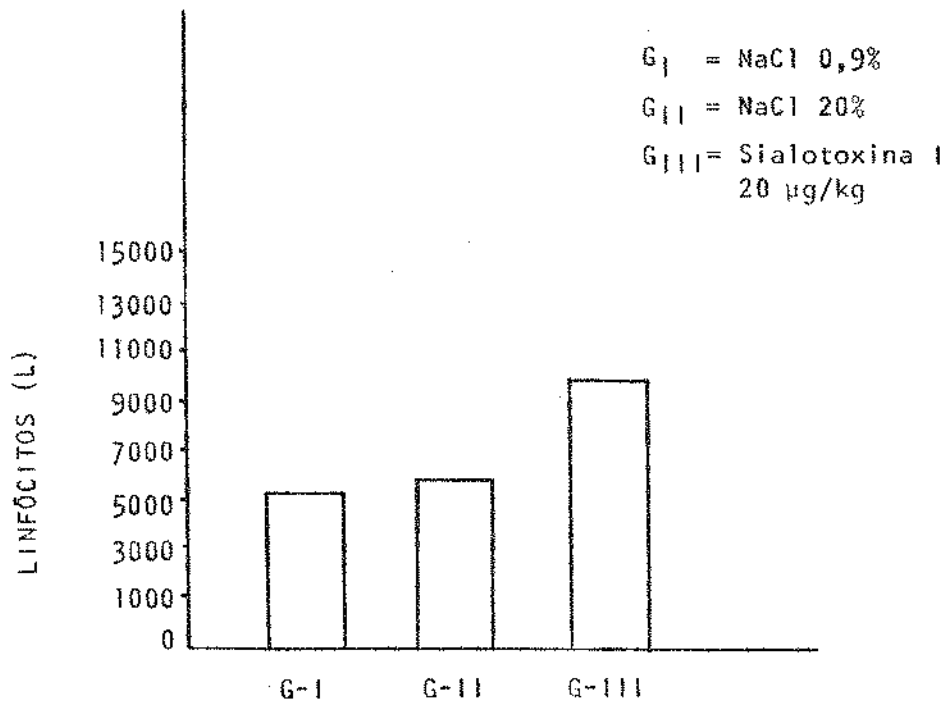


Gráfico 5 - Médias dos valores de linfócitos (L) dos animais dos três Grupos Experimentais.

A análise de variância feita a partir dos dados do Quadro 5, pode ser observada na Tabela 5.

Tabela 5-Análise de variância relativa aos dados do Quadro 5

CV	GL	SQ	QM	F
GRUPO	2	4909,978	2454,989	30,742
RESIDUO	27	2156,170	79,858	
TOTAL	29	7066,148		

O valor de F apresentado na Tabela 5 é significativo ao nível de 5%. A comparação das médias duas a duas foi feita através do teste de Tukey. O valor da diferença mínima significativa (d.m.s.) ao nível de 5% obtido através deste teste é de 9,9122. Em relação a estes resultados, pode-se afirmar que não existe uma diferença significativa entre o valor final médio da contagem do número de linfócitos dos grupos I e II. A tendência de aumento do número de linfócitos dos animais do grupo III foi confirmada também pela análise estatística, através da qual foi verificado que a média encontrada para o grupo III é significativamente maior que as médias dos grupos I e II.

C) MONÓCITOS

Quadro 6 - Valores individuais e médias do número de monócitos dos animais dos grupos I, II e III.

Animais	LEUCOMETRIA		
	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
1	473	346	910
2	182	82	1.450
3	0	222	494
4	0	89	1.043
5	123	619	530
6	0	174	421
7	366	197	1.298
8	294	66	870
9	364	86	1.377
10	201	290	924
Média	196	169	927

Os valores médios para cada grupo encontrados no Quadro 6, podem ser observados no Gráfico 6.

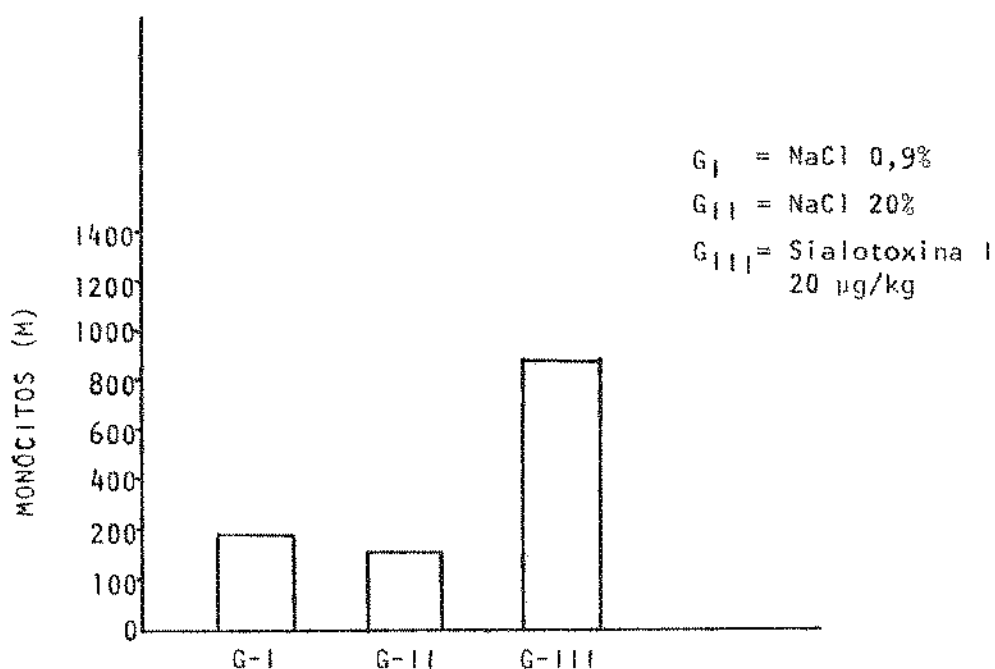


Gráfico 6 - Média dos valores de monócitos (M) dos animais dos três Grupos Experimentais.

A Tabela 6 mostra a análise de variância feita a partir dos dados do Quadro 6.

Tabela 6-Análise de variância relativa aos dados do Quadro 6

CV	GL	SQ	QM	F
GRUPO	2	1998,941	999,470	21,284
RESÍDUO	27	1261,542	46,724	
TOTAL	29	3260,483		

O valor de F apresentado na Tabela 6 é significativo ao nível de 5%. Foi realizado também o teste de Tukey, para a qual se obteve um valor de diferença mínima significativa (d.m.s.) ao nível de 5% de 7,5919.

Em razão destes resultados, verificou-se que a tendência revelada pelo grupo tratado, de aumento de número de monócitos, foi confirmada pela análise estatística, sendo que a média do grupo III é significativamente maior que as médias do Grupo I e II; ainda, baseando-se nos mesmos resultados, não há diferença significativa entre as médias dos Gru-

○ HEMATÓCRITO

Quadro 7 - Valores individuais e valores médios de hematócrito dos animais dos grupos I, II e III.

Animais	LEUCOMETRIA		
	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
1	53	49	46
2	57	45	43
3	53	47	51
4	53	43	48
5	50	42	49
6	51	47	49
7	56	47	47
8	55	50	49
9	52	51	43
10	55	50	48
Média	53	47	47

O gráfico 7 apresenta os valores médios do hematócrito dos animais do Grupo I, II e III.

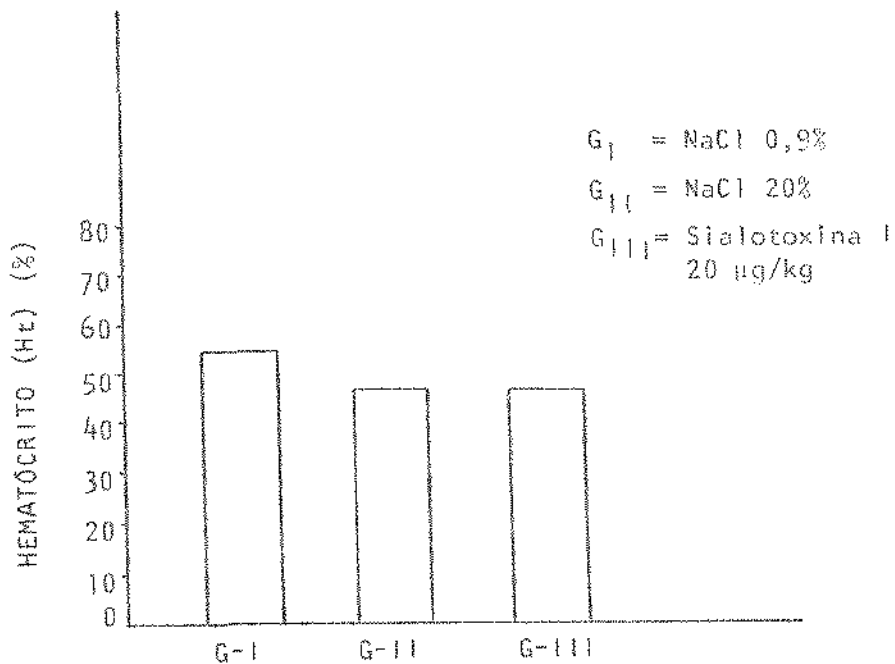


Gráfico 7 - Valores médios do hematócrito (Ht) dos animais dos três Grupos Experimentais (porcentagem).

A Tabela 7 mostra a análise de variância feita a partir dos dados do Quadro 7.

Tabela 7-Análise de variância relativa aos dados do Quadro 7

CV	GL	SQ	QM	F
GRUPO	2	87,218	43,609	20,040
RESIDUO	27	58,753	2,176	
TOTAL	29	145,971		

A análise de variância foi significativa ao nível de 5%. O valor da diferença mínima significativa (d.m.s.) ao nível de 5% obtido através deste teste é de 1,8382. Com base nestes resultados, verifica-se que não há diferença significativa entre as médias dos grupos II e III. Pode-se afirmar também que a média do grupo I é significativamente maior que as médias dos Grupos II e III.

5.2 - Exame histológico

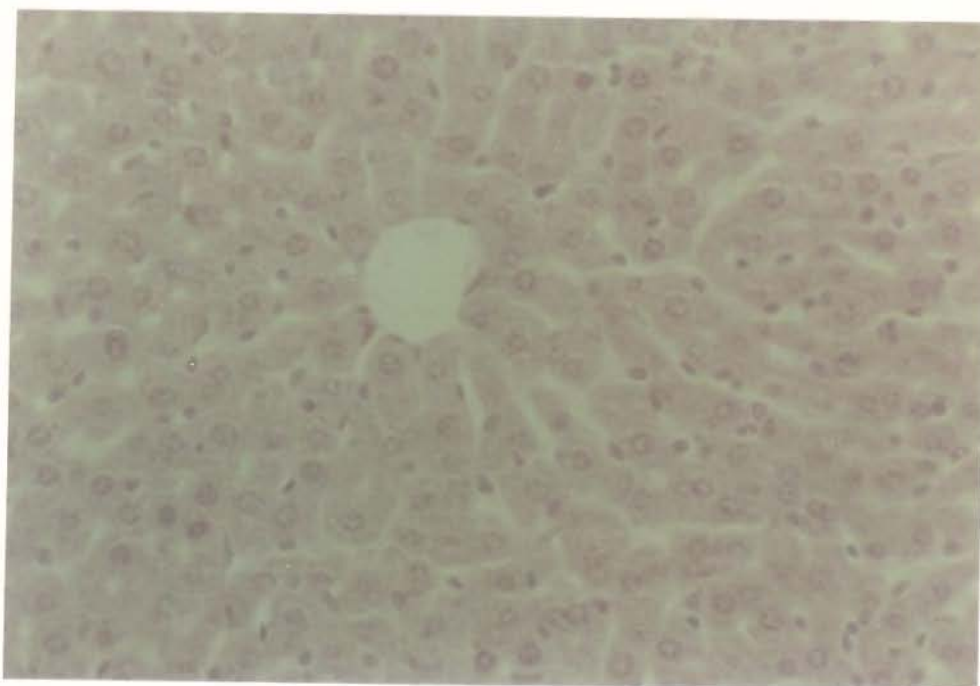
Tomando-se por base os tecidos obtidos dos órgãos dos animais do Grupo I (controle) observou-se que tanto o fígado quanto o baço destes animais apresentaram aspectos de normalidade, o que pode ser verificado nas fotomicrografias 1 e 2.

em relação ao Grupo II, os resultados obtidos através da análise histológica de fígado e baço foram similares aos do Grupo I. Não foram encontradas alterações significativas nos órgãos analisados, como se pode ver através das foto

micrografias 3 e 4.

Dos tecidos de fígado e baço estudados, os pertencentes ao Grupo III e obtidos de animais tratados com a sialotocina I a 80 µg/kg, verificou-se que, no fígado houve um certo comprometimento circulatório do órgão, manifestado por ectasia e congestão sinusoidal. Aparecem também infiltrados inflamatórios linfohistiocitários, multifocais e periportais. Podem também ser observadas a picnose e cariorrexe dos núcleos das células hepáticas, indícios claros de sofrimento celular. O material nuclear aparece escuro, fortemente condensado. Foram encontradas também áreas dispersas de necrose dos hepatócitos em todo o material examinado.

Ainda com respeito aos hepatócitos, observou-se também inchaço turva citoplasmática e degeneração microgolgiular. Foi também constatada uma tendência à hiperplasia das células de Kupffer, participantes do sistema mononuclear fagocitário celular. O baço dos animais tratados com a sialotocina apresentou hiperplasia de polpa branca. Todas as alterações citadas podem ser vistas nas fotomicrografias 5, 6, 7, 8, 9 e 10.



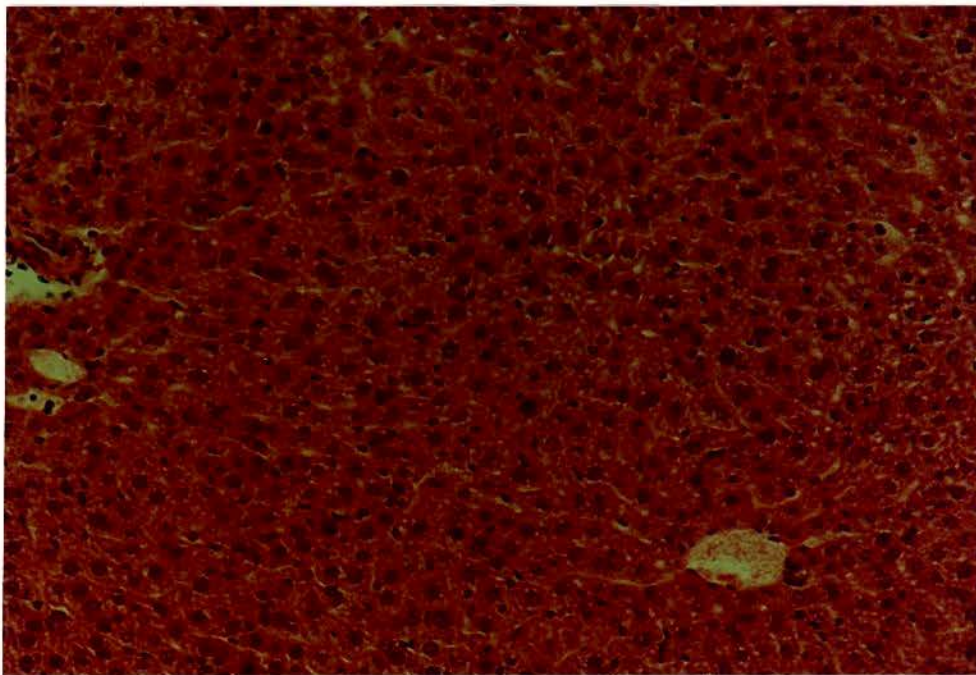
Fotomicrografia 1:

Grupo I - Observa-se a organização citoarquitetural do fígado preservada: veia centrolobular, trabéculas com hepatócitos e sinusóides sem alterações (400x)

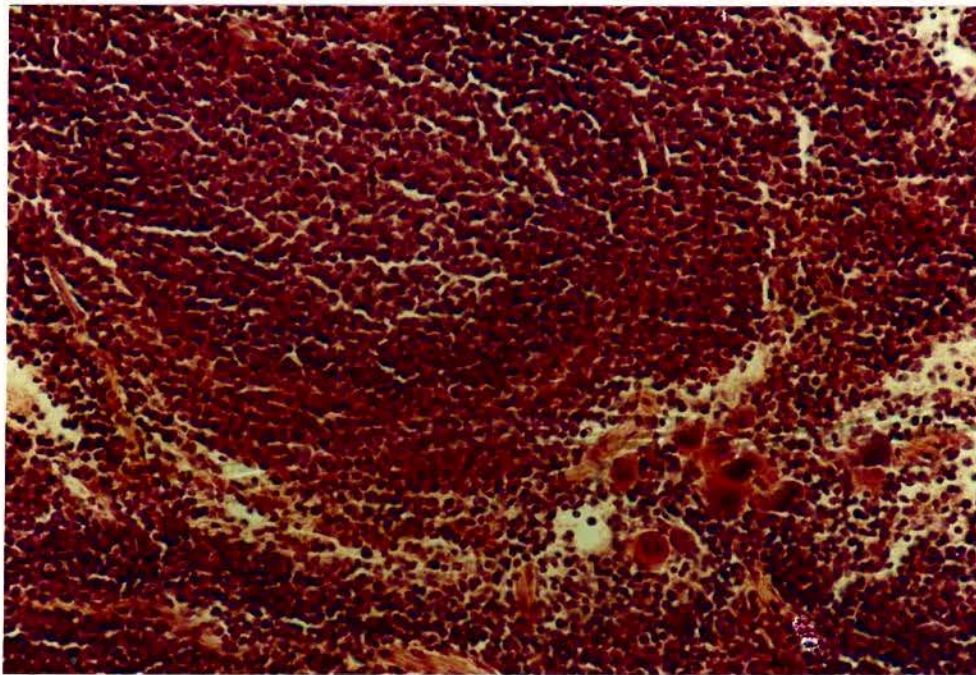


Fotomicrografia 2:

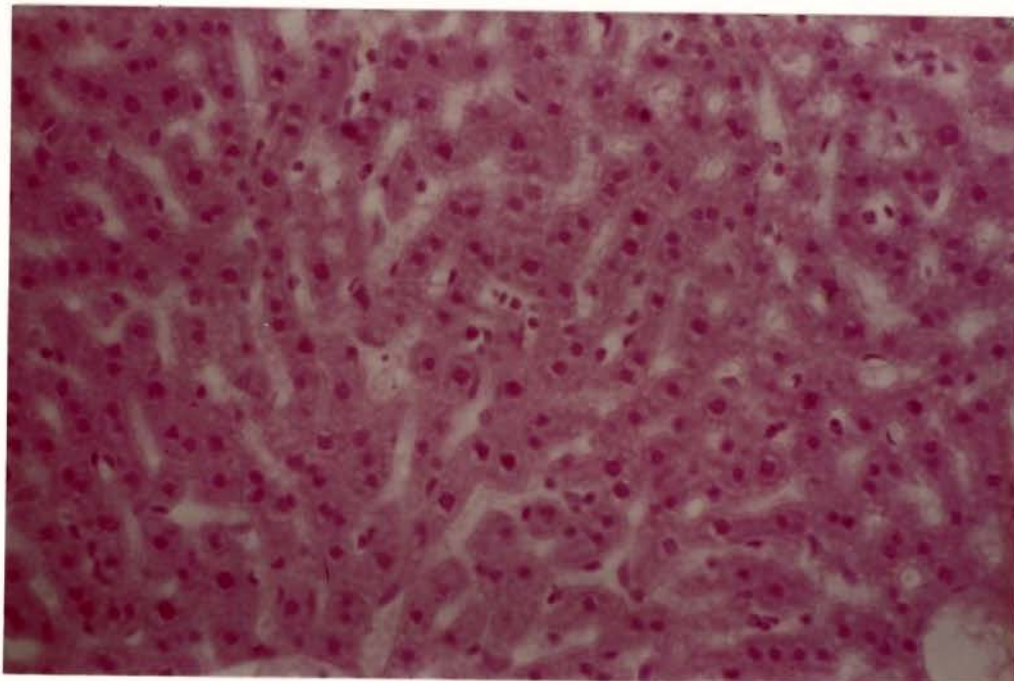
Grupo I - Os fragmentos de tecido do baço analisados aparentam normalidade, existindo distribuição equitativa entre polpa branca e vermelha (180x).



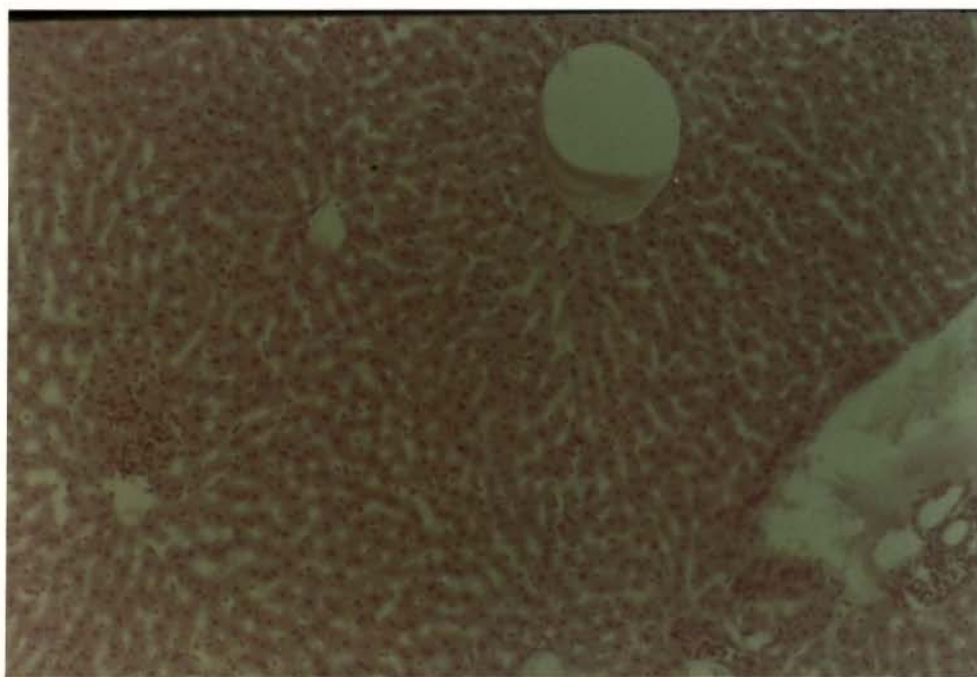
Fotomicrografia 3:
Grupo II - Fígado: observa-se um aspecto normal da estrutura do órgão (200x).



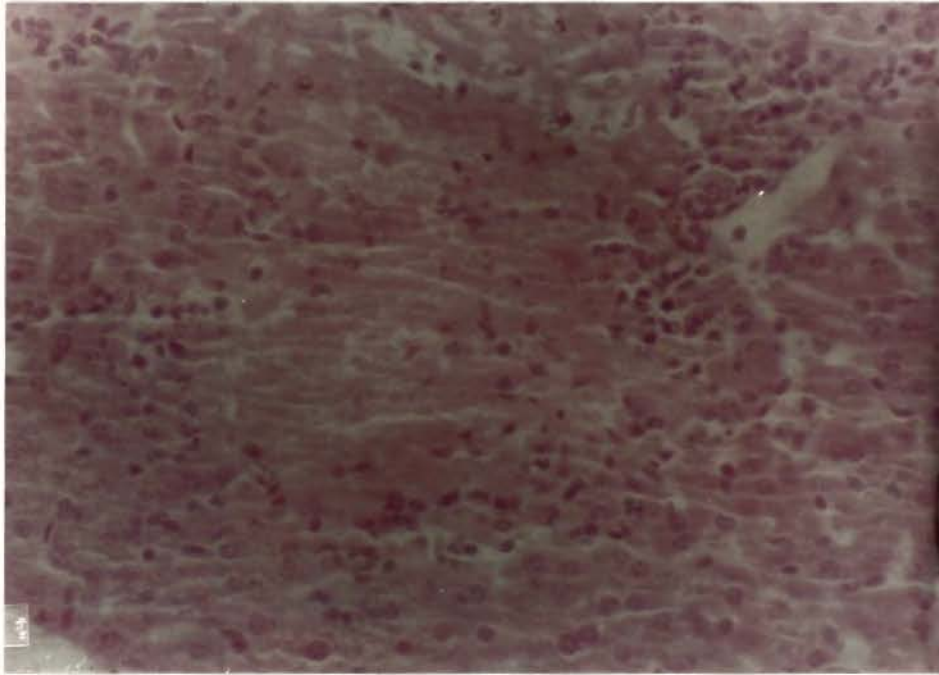
Fotomicrografia 4:
Grupo II - Observa-se o baço apresentando equilíbrio na relação entre polpa branca e vermelha (200x).



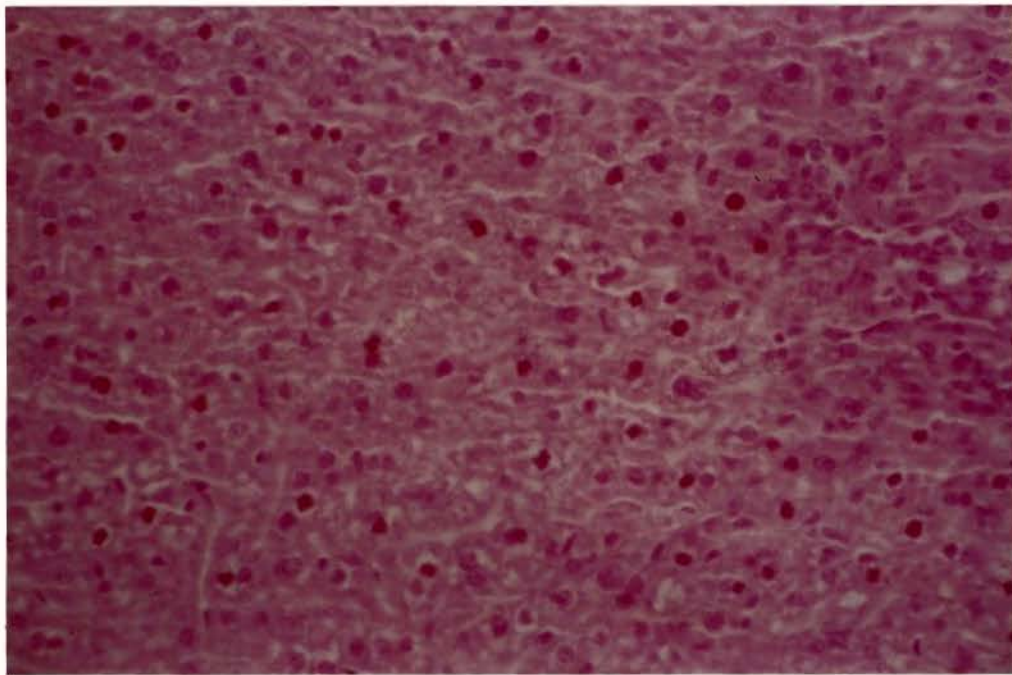
Fotomicrografia 5:
Grupo III - Fígado: ectasia dos capilares sinusóides (400x)



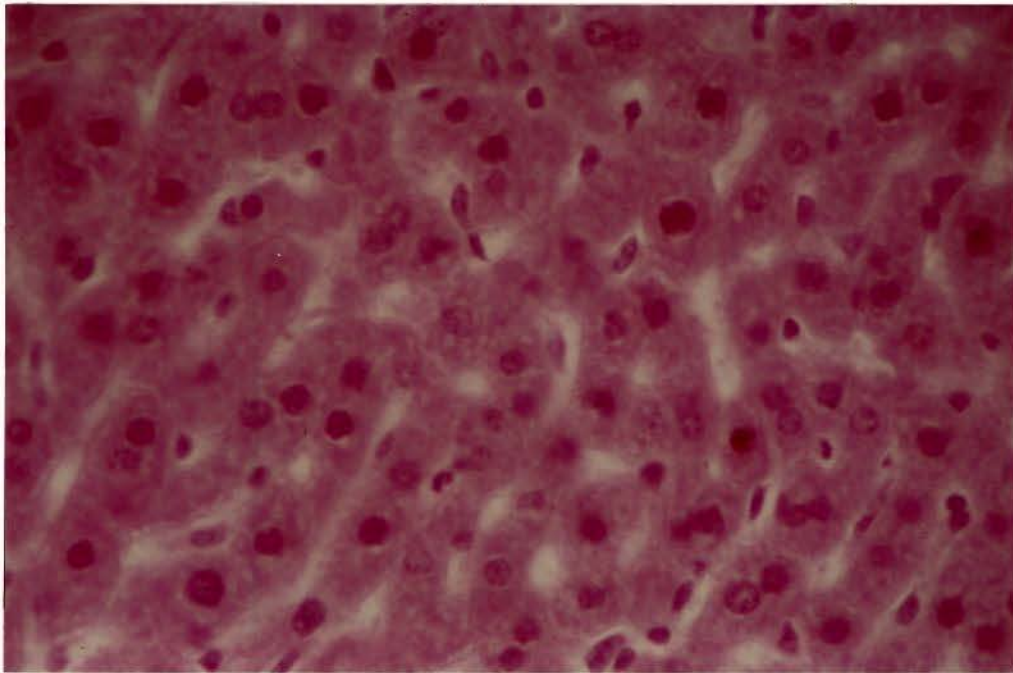
Fotomicrografia 6:
Grupo III - Fígado: infiltrado inflamatório periportal (180x)



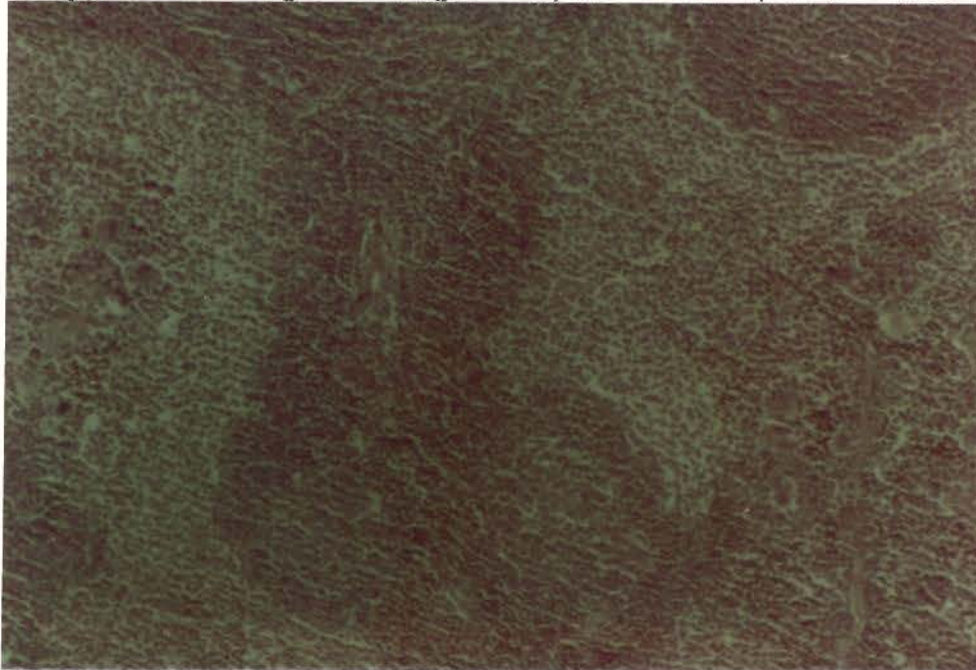
Fotomicrografia 7:
Grupo III - Fígado: necrose de hepatócitos (180x)



Fotomicrografia 8:
Grupo III - Fígado: picnose nuclear disseminada (400x)



Fotomicrografia 9:
Grupo III - Fígado: degeneração hidrópica microvesicular.



Fotomicrografia 10:
Grupo III - Baço apresentando hipertrofia com hiperplasia de
polpa branca (180x).

6 - DISCUSSÃO

Esforços tem sido feitos no sentido de se compreender um pouco do mecanismo de ação das sialotoxinas e na tentativa de se explicar seus efeitos biológicos.

Nesse aspecto, AGOSTINHO (1987) determinou a DL₅₀ da sialotoxina I de camundongos e verificou sua ação biológica, encontrando um quadro clínico variável dependente da dose utilizada, e caracterizado por hiper-reatividade, apatia, festinação, hipotonia, pilo-ereção, taquicardia, sudoreção, cianose, midriase, exoftalmia, poliúria, epistótomo da cauda, convulsão e morte, sendo as fêmeas bem mais sensíveis que os machos. A indução da cianose, tanto em fêmeas quanto em machos demonstrou um possível envolvimento de processos oxidativos no mecanismo de ação da toxina estudada.

O trabalho de BOAVENTURA (1988) confirma essa hipótese, demonstrando que há, efetivamente, uma diminuição da utilização de O₂ pelo diafragma de rato *in vitro*, em presença da sialotoxina I. O autor sugeriu que a mesma pode provocar um bloqueio no sistema de transporte de elétrons, impedindo a formação de ATP e diminuindo a utilização de O₂. Este efeito da sialotoxina I poderia oferecer subsídios para explicar a mortalidade causada pela substância no experimen-

fo realizado por AGOSTINHO (1987).

Essa redução do metabolismo aeróbico, bem como a cianose e a hipóxia descrita por AGOSTINHO (1987), poderiam provocar uma tentativa de compensação do organismo, aumentando a disponibilidade de O_2 para os tecidos via aumento do número de eritrócitos circulantes. Na tentativa de se verificar esse processo de adaptação, foram administradas neste trabalho, subdoses de zialotoxina I durante 10 dias consecutivos, procedendo-se, a seguir, à análise hematológica dos animais envolvidos. Os resultados obtidos nos permitem dizer que não foram encontradas alterações estatisticamente significantes do número de eritrócitos nos três grupos experimentais. Na realidade, ocorreu uma ligeira diminuição do número de eritrócitos nos animais dos Grupos II e III em relação ao Grupo I. As médias dos hematócritos apresentados pelos Grupos I, II e III confirmaram essa tendência, sendo que a média do Grupo I foi significativamente maior que as dos Grupos II e III.

A análise da série branca revelou um aumento acentuado no total global do número de leucócitos para o Grupo tratado, Grupo III, da ordem de 117% em relação ao Grupo I, que recebeu soro fisiológico. As médias encontradas para os Grupos I e II estão dentro dos padrões de normalidade, embora o Grupo II tenha acusado um pequeno aumento em relação ao Grupo I.

Dentro do aumento global dos leucócitos, encontrou-se um aumento mais acentuado em relação ao número de monóci-

tos e linfócitos. Nos dois casos, não houve diferença significativa entre os valores médios dos Grupos I e II, mas a média do Grupo III foi significativamente maior que a do Grupo I, aumentando 96% em relação aos linfócitos e 372% em relação aos monócitos. Em relação aos neutrófilos, houve diferença significativa entre os resultados dos Grupos II e III quando comparados ao Grupo I, porém, entre os Grupos II e III, não houve diferença significativa. Possivelmente, o tratamento com solução salina a 20% foi irritante ao peritônio causando lesões capilares e uma possível neutrofilia como resposta à agressão. Entretanto não se observou, nesse Grupo II, os fenômenos característicos de inflamação visualizados no fígado dos animais tratados com a sialotoxina I.

Com relação aos eosinófilos, células principalmente relacionadas às reações alérgicas e de importância pouco significativa na proteção contra os tipos comuns de infecção, observou-se também uma tendência de aumento no valor absoluto nos animais dos Grupos II e III em relação ao Grupo I. Estes resultados levam a crer que tanto a solução salina a 20% quanto a sialotoxina administradas, possam ter induzido a uma reação tipo antígeno-anticorpo por liberação de substâncias alérgicas.

Com base na literatura, poder-se citar outros trabalhos que também relacionam substâncias presentes nas glândulas submandibulares com alterações numéricas de leucócitos. ANGELETTI e cols. (1965) sugeriram a existência de um fator indutor de granulocitose em extratos de glândulas submandib

lares de camundongos machos parcialmente purificados. Esse aumento era transitório e mensurável, duas a três horas após tratamento dos camundongos por injeção do extrato, via intraperitoneal ou endovenosa. O número de polimorfonucleares foi o que mais aumentou e o percentual relativo destas células chegou a 80% do total de leucócitos. Pode-se ainda associar esses resultados a trabalhos como o de SHERIDAN & STANLEY (1971), os quais verificaram que, dentre vários tipos de tecidos de camundongos analisados, o extrato de glândulas submandibulares foi o mais rico em atividade do Fator Estimulante de Colônias, responsável pela proliferação de colônias de leucócitos *in vitro*.

Um dos fatores estimulantes de colônia mais abundante é o produzido por macrófagos de tecido inflamado, em resposta a toxinas bacterianas, à produtos de degradação de neutrófilos ou a outros produtos do tecido inflamado. Esse fator age a nível de medula óssea estimulando a produção de leucócitos e contribuindo dessa maneira para a manutenção da granulocitose por períodos prolongados. Pode-se então sugerir que o FEC encontrado nas glândulas submandibulares, também tenha capacidade de agir diretamente na medula óssea.

O aumento de monócitos e linfócitos verificado neste experimento encontra respaldo em pesquisas como a de LANGE (1975). O autor, trabalhando com extratos de glândulas submandibulares injetado via intra-peritoneal, encontrou nos animais tratados um aumento de peso do baço e uma hipertrofia da palpa branca, tecido intimamente relacionado com arma

zenamento e produção de linfócitos. Esses resultados estão em concordância com os obtidos neste trabalho, onde através da análise histológica do baço verificou-se uma hiperplasia e hipertrofia da polpa branca. Esses dados poderiam estar relacionados ao aumento do número de linfócitos também registrado no grupo tratado com sialobexina I.

Esse mesmo autor observou também que as mudanças histológicas verificadas no timo foram pequenas mas houve um aumento do número de linfoblastos a nível de córtex. Neste trabalho, não se analisou o timo, mas os resultados indicam que possa haver modificações a nível deste órgão.

Os resultados obtidos por LANGE (1975) e os obtidos neste experimento são basicamente discordantes em relação a trabalhos prévios, realizados por outros autores como TAKEDA & GROLLMAN (1968), que relataram uma ação inibitória do extrato de glândulas submandibulares cru ou purificado, sobre o timo e tecidos linfóides. De acordo com esses autores é possível que esse efeito supressor sobre timo e tecidos linfóides seja atribuído em parte a uma ação desses constituintes sobre a glândula adrenal.

As diferenças entre os resultados encontrados poderiam talvez ser explicadas pela variação dos métodos utilizados, na preparação dos extratos e pela diferença de idade dos camundongos, utilizados nos experimentos. LANGE sugere ainda que as mudanças observadas são típicas de uma resposta provocada por estimulação antigênica. Nesse caso, as propriedades antigênicas do extrato das glândulas submandibulares é

que provocariam essas alterações.

Em 1975, ROBERTS, FRESTON & READE, também trabalhando com extrato de glândulas submandibulares de camundongos, constataram que o mesmo tinha a capacidade de deprimir a resposta de hipersensibilidade tardia e que possivelmente o FEC (fator de crescimento epidermal) contido no extrato poderia ser também parcialmente responsável por essa ação supressora. HIRAMATSU e cols. (1979), sugeriram que as glândulas submandibulares de camundongos machos, contenham um fator endócrino que regula a resposta de hipersensibilidade tardia, deprimindo-a. Ainda no mesmo experimento, os autores encontraram aumento do peso do timo e do baço após remoção das citadas glândulas.

Devenas entretanto, salientar que os trabalhos acima relatados utilizaram-se do extrato de glândulas cru ou parcialmente purificado. O presente experimento foi feito com um fator purificado retirado desse extrato, que é a siarlotoxina. Seria acentável admitir a existência de fatores com ação antagônica nessas mesmas glândulas, que estimulem ou inibam órgãos linfóides. O trabalho realizado por KEMP, MELLOW & SABADINI (1985) questiona essa hipótese de maneira mais objetiva. Os autores identificaram e purificaram parcialmente a partir de extratos de glândulas submandibulares de ratos, fatores que revelaram atividade supressora da atividade proliferativa de cultura de linfócitos *in vitro*. Esses fatores apresentaram pesos moleculares mais altos (50.000 - 96.000). Ao mesmo tempo, fracionaram também fator-

res com atividade antagônica aos primeiros, que têm peso molecular variando de 13.000 a 38.000. Poder-se-ia talvez, admitir que o mesmo ocorra em camundongos, levando-se em conta que, de acordo com PINHEIRO (1989), as sialotoxinas são compostos de baixo peso molecular.

Os dados obtidos pela análise hematológica vem ao encontro dos resultados obtidos nos exames histológicos. O fígado e baço dos animais do Grupo I (controle normal) e Grupo II (salina a 80%) apresentaram aspecto normal. Já os animais do Grupo III revelaram alterações significantes a nível de fígado e baço. Em relação ao baço, verificou-se uma hiperplasia e hipertrofia de polpa branca.

As alterações histopatológicas encontradas no fígado dos animais sugerem que a sialotoxina I tenha efeito tóxico sobre as células hepáticas. A degeneração celular observada em suas diferentes etapas, os focos de infiltrados inflamatórios linfohistiocitários disseminados, e as áreas de necrose e desorganização estrutural do órgão sugerem que as injeções intra-peritoneais de sialotoxina I, na dosagem utilizada de 20 µg/kg surtiram um efeito de envenenamento crônico do animal. O comprometimento funcional do órgão seria progressivo e cumulativo, chegando à total disfunção e, consequentemente, podendo ser um dos fatores que levariam à morte dos animais.

Poder-se-ia ainda, relacionar esse quadro de inflamação crônica aos achados da análise hematológica. O aumento de monócitos e linfócitos observados, assemelha-se ao quadro

típico encontrado nos processos crônicos. A presença de produtos necróticos poderia estar relacionado à hiperplasia observada nas células de Kupffer e a um aumento generalizado do sistema mononuclear fagocitário celular, do qual fazem parte os monócitos. Essas células participariam na eventual degradação do material necrótico existente.

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, evidencia-se a necessidade de novas pesquisas, principalmente a nível de outros órgãos hematopoéticos, como medula óssea e timo, para poder-se analisar mais especificamente os efeitos letais da sialotoxina I.

7 - CONCLUSÕES

A análise e discussão dos resultados obtidos neste trabalho subsidiam as seguintes conclusões:

- 7.1 - A sialotoxina I, na dose utilizada, não induziu alterações na contagem dos eritrócitos;
- 7.2 - Com relação à série branca, a substância provocou um aumento acentuado do número de leucócitos circulantes, principalmente de linfócitos e monócitos;
- 7.3 - A sialotoxina I provocou hiperplasia e hipertrofia da polpa branca do baço e,
- 7.4 - A sialotoxina I apresentou efeitos tóxicos sobre as células hepáticas, representados por degeneração celular, infiltrados linfohistiocitários disseminados e áreas de necrose e desorganização estrutural.

B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, E. & NARBAITZ, R. Action of rat submaxillary gland extracts on neural tube growth in organ culture. *J. Embryol. exp. Morph.*, 114: 231-6, 1965.
- AGOSTINHO, S.M.S. Sialotoxina I: determinação da DL50, suas manifestações biológicas e sua interação com a testosterona e estradiol em camundongos. Piracicaba, 1987, 99p. [Tese (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP].
- ANDERSON, L.C. Peroxidase release from rat submandibular salivary acinar cells *in vitro*. *Archs. oral Biol.*, 31: 501-3, 1986.
- ANGELETTI, P.U.; SALVI, M.L.; CAPANI, F.; FRATO, L. Granulocytosis inducing factor from the mouse submaxillary gland. *Biochim. Biophys. Acta.*, 3: 344-6, 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].
- ATTARDI, D.G.; LEVI-MONTALCINI, R.; WENGER, B.S.; ANGELETTI, P.U. Submaxillary gland of mouse. Effects of a fraction on tissue of mesodermal origin *in vitro*. *Science*, 150: 1307-9, 1965.

- ATTARDI, D.G. & SCHESSINGER, R. Submaxillary gland of mouse; properties of a purified protein affecting muscle *in vitro*. *Science*, 157: 1253-5, 1967.
- BALDISSERA, F.G.A.; POULSEN, K.; HOLET, J.J. Mouse salivary glands secrete a glucagon-degrading enzyme, not glucagon. *Endocrinology*, 171(1): 84-7, 1985.
- BARKA, T. Biologically active polypeptides in submandibular glands. *J. Histochem. Cytochem.*, 29: 835-59, 1980.
- BARKA, T. Partial purification of a mitotic suppressor from the salivary gland. *Expl molec. Path.*, 19: 225-33, 1978.
- BERG, T.; HOLCK, M.; JOHANSEN, L. Isolation, characterization and localization of antigen γ , a serine proteinase of the "Kallikrein-Family" in the rat submandibular gland. *Biol. chem. Hoppe-Seyler*, 368: 1455-67, 1987.
- BOAVENTURA, M.C. Efeitos da sialotoxina I sobre a incorporação de glicose e consumo de oxigênio pelo diafragma de ratos. Piracicaba, 1988. 125p. [Tese (Doutoramento) Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP].
- BUEKER, E.D. & SCHENKEIN, I. Effect of daily subcutaneous injection of nerve growth stimulating protein fractions on mice during post natal to adult stage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 118: 163, 1964.
- BYYNT, R.L.; ORTH, D.N.; COHEN, S. Radioimmunoassay of epidermal growth factor. *Endocrinology*, 90: 1261, 1972.
- CALDAS, M.B.J. Efeitos da sialotoxina III sobre o quadro hematológico em camundongos. Piracicaba, Faculdade de Odontologia (no prelo).

- COHEN, S. Purification of a nerve growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocitotoxic antiserum. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 46: 308-11, 1960.
- COHEN, S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in new born animals. *J. biol. Chem.*, 237(52): 1555-62, 1962.
- COHEN, S.; TAYLOR, J.M.; MURAKAMI, K.; MICHELAKIS, A.M.; INAGAMI, T. Isolation and characterization of renin-like enzymes from mouse submaxillary glands. *Biochemistry*, 11: 4386, 1972.
- COX, C.F. & QUISSEL, D.O. A novel platelet-activating protein derived from rat submandibular glands. *Thromb. Res.*, 39(3): 343-53, 1983.
- DEAN, D.H. & HIRAMOTO, R.N. Lethal effect of male rat submandibular gland homogenate for rat neonates. *J. oral Path.*, 14: 686-9, 1985.
- EKFORS, T.O.; RIEKKINEN, P.J.; MALMIHARJU, T.; HOPPU-HAVU, V.K. Four isozymic forms of a peptidase resembling kallikrein purified from the rat submandibular gland. *HOPPE-SEYLER'S Z. physiol. Chem.*, 348: 111, 1967.
- EKFORS, T.O. & HOPPU-HAVU, V.K. Properties of the esteropeptidase purified from the mouse submandibular gland. *Enzimologia*, 43: 177, 1972.
- EKSTROM, 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): 933-49, 1988.

- FRATTI, L.; GENCI, G.; SBARAGLIA, G.; TETTI, D.V. & COVELLI, I. Levels of epidermal growth factor in mice tissues measured by a specific radio receptor assay. *Life Sci.*, 18: 905-912, 1976. Apud KASHIMATA, W. op. cit. ref. 7.
- GRESIK, E. & BARKA, T. Immunocytochemical localization of epidermal growth factor in the developing submandibular gland of the mouse. *Am. J. Anat.*, 161: 1, 1978.
- GUTMAN, Y.; LEVY, M.; SHORR, I. Renin-like activity of the rat submaxillary gland: characterization and the effect of several drugs and stimuli. *Br. J. Pharmac.*, 47: 69, 1973.
- GYSIN, B.; MULLER, K.M.; OTTEN, U.; FISCHLI, A.E. Epidermal growth factor content of submandibular glands is increased in rats with experimentally induced gastric lesions. *Scand. J. Gastroenterol.*, 23: 665-671, 1988.
- HATAKEYAMA, K.; HIRAMATSU, M.; MINAMI, N. Lethal factor in the male mouse submandibular gland. *Can. J. Physiol. Pharmac.*, 59: 1134-8, 1981.
- HILTON, S.M. The physiologic role of glandular kallikreins. In *Bradykinin, kallidin and kallikrein*. In: ERDOS, E.G. *Hand exp. Pharmac.*, 25: 389, 1970.
- HIRAMATSU, K.; HATAKEYAMA, K.; HOSOI, K. & MINAMI, N. Regulation of delayed-hipersensitivity response by the submandibular gland of male mice. *Immunology*, 37: 869-71, 1976.
- HIRAMATSU, M.; HATAKEYAMA, K.; MINAMI, N. Male mouse submaxillary gland secretes highly toxic proteins. *Experientia*, 36: 940-2, 1980.

- HOFFMAN, H. & MCDUGALL, T. Some biological properties of proteins of the mouse submaxillary gland as revealed by growth of tissues of electrophoretic acrylamide gels. *Expl Cell Res.*, 51: 485, 1968.
- HOFFMAN, H.; ROCH, J.; NAUGHTON, M.A.; SYDNEY, D. Effects of submaxillary gland extirpation on the lymphoid system of the mouse. *En. J. Anat.*, 106: 193, 1970.
- HOFFMAN, H.; McAUSLAN, B.; ROBERTSON, D.; BURNETT, E. An endothelial growth-stimulating factor from salivary glands. *Expl. Cell Res.*, 102: 289, 1976.
- HUANG, J.C.C.; HOSHINO, K.; LIN, C.D. Effect of ligation of the mouse submandibular excretory duct on the production of the lethal factor. *Anat. Rec.*, 172: 456-8, 1972.
- HUANG, J.C.C.; HOSHINO, K.; KIM, Y.T.; CHEDIA, F.S. Species and strain differences in the lethal factor of the mouse submandibular gland. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 55: 1107-11, 1977.
- HUTSON, J.N.; EVANS, D.; FOWLER, R. Effect of salivary glands on wound contraction in mice. *Nature*, 279: 793, 1979.
- JONES, R.O. The *in vitro* effect of epithelial growth factor on rat organ cultures. *Expl Cell Res.*, 43: 645, 1966.
- JONES, R.O. & ASHWOOD-SMITH, M.J. Some preliminary observations on the biochemical and biological properties of epithelial growth factor. *Expl Cell Res.*, 59: 161, 1970.

- JUNQUEIRA, L.C.; FAJER, A.; RABINOVITCH, M.; FRANKENTHAL, L.
Biochemical and histochemical observations on the sexual dimorphism of mice submaxillary glands. *J. cell. comp. Physiol.*, 34: 129-38, 1949.
- KASAYAMA, S.; YOSHIMURA, M.; OKA, T. Regulation by thyroid hormones and androgen of epidermal growth factor synthetases in the submandibular gland and its plasma concentration in mice. *J. Endocr.*, 121: 269-75, 1989.
- KASHIMATA, M.; HIRAMATSU, M.; MINAMI, N. Biochemical properties of growth factor in the mouse kidney. *Comp. Biochem. Physiol.*, 96BC(4): 681-3, 1987.
- KEMP, A.; MCELROW, L.; SABBAGHNE, E. Suppression and enhancement of *in vitro* lymphocyte reactivity by factors in rat submandibular gland extracts. *Immunology*, 56: 261-67, 1985.
- KOCH, J.H. & FOWE, J. Immunosuppressive activity of submaxillary gland extracts of the mouse. Effect on antibody formation in response to sheep red blood cells. *Eur. J. Immun.*, 6: 583-4, 1976.
- KONGSHAVN, P.A.L. & BLISS, J. Effect of mouse submandibular gland extracts on survival of H-2 incompatible skin allografts. *Immunology*, 19: 363, 1970.
- KONGSHAVN, P.A.L. & LAPP, V.S. Immunosuppressive effect of male mouse submandibular gland extracts on plaque-forming cells in mice: abolition by orchidectomy. *Immunology*, 22: 227, 1972.

- LANGE, G.L. The effect of salivary gland extracts on the histology of lymphoid organs and salivary glands in mice. *Archs. oral Biol.*, 20: 515, 1975.
- LEVI-MONTALCINI, R. & BOOKER, E. Excessive growth of the sympathetic ganglia evoked by a protein isolated from mouse salivary gland. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 46L: 373, 1960.
- LEVI-MONTALCINI, R. & ANGELETTI, P.U. Hormonal control of the NGF content in the submaxillary glands of mice. In: *Salivary glands and their secretions*. Edited by L.M. Screenby and J. Meyer. Pergamon Press Book, The Macmillan Company, New York, 1984, pp. 129-39.
- LIN, C.D. & HOSHINO, K. Hemorrhagic phenoma caused in the host mice by submandibular gland isografts from males. *Proc. Can. Fedn Biol. Socs.*, 12: 8-21, 1969.
- 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.
- LIUZZI & ANGELETTI, P.U. Studies on the toxic effect of mouse submaxillary glands extracts. *Experientia*, 24: 1034, 1968.
- 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): 126-38, 1989.

- MAYNER, D.A. & ACKERMAN, G.A. Tissue localization of ribonuclease activity by substrate film technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 11: 573, 1962.
- MENGTI, G.; LAI, G.; PICIOTTI, D.; MATEPAEZI, G. Characterization and anticoagulant properties of rodent sublingual gland extracts. *Cell. Molec. Biol.*, 34(3): 279-85, 1978.
- NAUGHTON, M.A.; GECZY, C.; BENDER, V.; HOFFMAN, H.; HAMILTON, E. Esterasepeptidase and thymotropic activity of a protein isolated from the mouse submaxillary gland. *Biochim. Biophys. Acta*, 263: 106-14, 1972.
- NAUGHTON, M.A.; KOCH, J.; HOFFMAN, H.; BENDER, U.; HAGOPIAN, N. & HAMILTON, E. Isolation and activity of a thymocyte - transforming factor from the mouse submaxillary gland. *Espl Cell Res.*, 57: 95, 1969.
- PANTHIER, J.J.; FOOTE, S.; CHAMBRAUD, B.; STROSBERG, A.D.; CORVOL, P. & ROUGEON, F. The submaxillary gland of mouse strains constitutes an important source of renin-2. *Nature*, 298: 80-2, 1982. Apud Ladenheim, G.R. et alii. Stable and transient expression of mouse submaxillary gland renin cDNA in At T20 cells: proteolytic processing and secretory pathways. *Febs Letters*, 245(1,2): 70-4, 1989.
- PAPPO, J.; EBERSOLE, J.L.; TAUBMAN, M.A. Resident salivary gland macrophages function as accessory cells in antigen-dependent T-cell proliferation. *Immunology*, 63: 99-104, 1988.
- PINHEIRO, C.E. Caracterização química e biológica das sialotoxinas. In: Simposio Anual da Academia de Ciências do Estado de São Paulo. São Paulo, 1983. *Anais*, p.17.

- PINHEIRO, C.E. Sialotoxins: a family of toxic substances isolated from the submandibular glands of the male mice. *Revta Odont. Univ. S. Paulo*, 20(3): 157-60, 1978.
- ROBERTS, M.L.; FRESTON, J.A.; READ, P.C. Suppression of immune responsiveness by a submandibular salivary gland factor. *Immunology*, 30: 811-4, 1975.
- SCHACHTER, M. Vasodilatation in the submaxillary gland of the cat, rabbit and sheep. In *Bradykinin, kallikrein*. In: ERDOS, E.G. *Handb. expl. Pharmac.*, 25: 400, 1970.
- SCHENKEIN, J.; BOESMAN, M.; TOKARSKY, E.; FISHMAN, L. Proteases from mouse submaxillary gland. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 36: 156, 1969.
- SCHENKEIN, I.; LEVI, M.; BUEKER, E.D. & WILSON, J.D. Immunological and enzymatic evidence for the absence of an esterolytic enzyme, protease D, in the submandibular gland of the mouse. *Endocrinology*, 94: 840, 1974.
- SCHENKEIN, I.; LEVI, M.; FRANKLIN, E.C.; FRANGLONE, B. Proteolytic enzymes from the mouse submaxillary glands. *Archs Biochem. Biophys.*, 182: 64, 1977.
- SHEAR, M.; CHRISTENSEN, L.V.; MARALAMBOUS, M.; BARBAKOW, F. Changes in amylase activity in submandibular salivary glands of puberal male mice following castration. *Archs oral Biol.*, 24: 1979.
- SHERIDAN, J.W. & STANLEY, R.E. Tissue sources of bone marrow colony stimulating factor. *J. Cell. Physiol.*, 78: 451-60, 1971.

- SHIMAMURA, T.; NAGUMO, N.; IKIGAI, H.; MURAKAMI, K.; OKUBO, S.; TODA, M.; OHNISHI, P.; TOMITA, M. A cytotoxic serine proteinase isolated from mouse submandibular gland. *Immun. Lett.*, 22: 155-60, 1989.
- SREEBNY, L.M. Studies of salivary gland proteases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 85: 192, 1980.
- SREEBNY, L.M.; MEYER, J.; BACHEM, E.; WEINMANN, J.P. Post-natal changes in proteolytic activity and in the morphology of the submaxillary gland in male and female albino rats. *Growth*, 19: 57, 1955.
- SWIGART, R.H.; HILTON, F.K.; DICKIE, M.M.; FOSTER, B.J. Effect of gonadal hormones on submandibular gland amylase activity in male and female (57 BL 18) mice. *Endocrinology*, 76: 775, 1965.
- TAKEDA, T. & SPOLLMAN, A. Inhibitory action of a submaxillary gland on thymus and lymphoid tissue of the mouse. *Am. J. Physiol.*, 215(6): 1327-42, 1968.
- TURRIAN, H. Quelques caractéristiques de hypertensif contenu dans les glandes salivaires de la souris. *Helv. phys. Acta*, 18: 259, 1950.
- WERLE, E. & RODEN, P. Ueber das vorkommen von kalikrein in der speichel druesen und in munda perchel. *Biochemie*, 286: 213, 1966.
- WERLE, E.; VOGEL, E.; GOLDEL, L.F. Ueber ein bludrucks-
teigerndes prinzip in extrakten aus der glandula sub-
macillaris der weissen maus. *Arch. exp. Path. Pharmak.*, 230: 226, 1957.

ZIMOWKA-MODELEWSKA, V. A lipolytic factor from the submaxillary salivary glands of the rat. *Acta physiol. pol.*, 35(1): 15-22, 1984.

De acordo com

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Rio de Janeiro, Normas ABNT sobre documentação, Rio de Janeiro, 1978, p.13-29.

WORLD LIST OF SCIENTIFIC PERIODICALS. 4ed. London, Butterworths, 1968, 3v.

9.1 - RESUMO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar-se os efeitos da sialotoxina I sobre o hemograma de camundongos fêmeas, bem como possíveis alterações na histologia do fígado e baço destes animais.

Foram utilizados para o experimento 30 camundongos fêmeas (*Mus musculus albinus*) com 30 e 45 dias de idade, pesando entre 20 a 30 g. Os animais foram distribuídos casualmente em três Grupos Experimentais:

GRUPO I - Controle - constituído por 10 animais que receberam NaCl 0,9% via intraperitoneal por 10 dias;

GRUPO II - 10 animais que receberam NaCl 20% via intraperitoneal também por 10 dias;

GRUPO III - Constituído de 10 animais que receberam sialotoxina I na dose de 20 µg/kg via intraperitoneal por 10 dias.

Ao final do tratamento, foi coletado sangue para a realização do microhematócrito, para confecção dos esfregaços de sangue e para a eritrometria e leucometria. Foram retirados ainda o fígado e baço para análise histológica.

Face aos resultados obtidos, verificou-se que não houve alteração no número de eritrócitos circulantes, mas em

relação aos leucócitos observou-se aumento acentuado no número total dessas células, principalmente ao nível de linfócitos e monócitos. Ainda, segundo análise histológica, a sialotóxina I provocou hiperplasia e hipertrofia da polpa branca do baço e agiu tóxicamente sobre as células hepáticas causando degeneração celular, presença de infiltrados linfohistiocitários disseminados e áreas de necrose e desorganização estrutural.

9.2 - SUMMARY

The purpose of this work was to verify the effects of stalotoxin I (a substance purified from submandibular gland extract of male mice) on the number of circulating erythrocytes and leukocytes and on the liver and spleen histology of female mice.

Thirty animals divided into three distinct groups were used for this evaluation. Female mice were i.p. injected during 10 consecutive days with NaCl 0,9% (Group I), NaCl 30% (Group II) and SI 20 µg/kg (Group III). Over the 10th day blood samples were collected in order to proceed hematological analysis. The animals were killed and liver and spleen were removed and fixed for histological studies.

The results showed that there was no significant change in the number of circulating erythrocytes. However, there was a marked increase on the number of leukocytes, mostly mononuclear cells. The histological studies revealed a hypertrophic and hyperplastic growth of spleen's white pulp. The SI also proved to be toxic to hepatic cells, by provoking cellular necrosis, cellular degeneration, presence of lymphocytes and histiocytes diffuse infiltrate and areas of structural disorganization and necrosis.