

SONIA MARIA DOS SANTOS AGOSTINHO

SIALOTOXINA I: DETERMINAÇÃO DA DL₅₀, SUAS MANIFESTAÇÕES
BIOLÓGICAS E SUA INTERAÇÃO COM A TESTOS-
TERONA E ESTRADIOL EM CAMUNDONGOS

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campi-
nas, para obtenção do grau de
Mestre em Odontologia, Área de
"Bases Farmacológicas para a Te-
rapêutica Medicamentosa".

P I R A C I C A B A

- 1 9 8 7 -

Ag75s

8700/BC

SONIA MARIA DOS SANTOS AGOSTINHO

SIALOTOXINA I: DETERMINAÇÃO DA DL₅₀, SUAS MANIFESTAÇÕES
BIOLÓGICAS E SUA INTERAÇÃO COM A TESTOS-
TERONA E ESTRADIOL EM CAMUNDONGOS

*Este exemplar foi
devidamente certificado
conforme resolução
C.C.P.G. 103/036/83
Piracicaba, 24/05/84
L.S.G.S.*

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campi-
nas, para obtenção do grau de
Mestre em Odontologia, Área de
"Bases Farmacológicas para a Te-
rapêutica Medicamentosa".

P I R A C I C A B A

- 1 9 8 7 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais,

responsáveis pela minha formação e que me ensinaram: Receber bem a felicidade porque engrandece meu coração; tolerar a tristeza porque ela abre minha alma; aceitar os prêmios porque são minhas recompensas e receber os obstáculos porque eles são o meu desafio.

Aos meus sogros e irmãs,
pela compreensão e apoio.

Ao meu esposo;

pelo seu amor e por nos demonstrar, que as recompensas da vida estão no fim de cada jornada, não perto do começo; que não nos foi dado saber quantos passos são necessários para atingirmos nossos objetivos. O fracasso pode ser encontrado até no milésimo gesto, mas o sucesso se esconde atrás da própria curva da estrada. Nunca saberemos quão perto ele está, até contornarmos a próxima esquina.

Aos meus filhos:

Daniel, Natália e Leandro,
pelo carinho e por serem partes das minhas recompensas.

Ao Professor Doutor DÉCIO TEIXEIRA^{*}, Titular da Disciplina de Fisiologia e Biofísica do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela amizade, paciência, incentivo e dedicação durante a competente orientação deste trabalho e com quem tive a oportunidade de aprender: Que cada obstáculo eu considere como um mero desvio do meu objetivo e um desafio à minha profissão e que persistindo eu desenvolverei minhas habilidades como um marinheiro desenvolve as suas, aprendendo a remar na fúria de cada tempestade.

Ao Professor Doutor Samir Tufic Arbex, Coordenador Geral dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela amizade e principalmente pela sua habilidade de saber ouvir, compreender e responder a um apêlo quando este lhe é dirigido.

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Doutor Simonides Consani, Digníssimo Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela oportunidade e incentivo dado à pesquisa desta Faculdade;
- Ao Professor Doutor Carlos Eduardo Pinheiro, Titular da Disciplina de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade Estadual de São Paulo pela estimada colaboração e fornecimento da Fração I de Sialotoxina e pelo exemplo de homem da Ciência;
- Ao Professor Doutor Amado Leonízio de Azevedo, Chefe do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela atenção e por gentilmente nos permitir o uso dos laboratórios, bem como dos materiais utilizados nesse trabalho;
- Ao Professor Doutor Thales R. Mattos Filho, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Bases Farmacológicas para Terapêutica Medicamentosa, pelo apoio e compreensão;

- Ao Professor Doutor Roberto Simionato de Moraes, Professor Assistente Doutor do Departamento de Matemática e Estatística da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" pela programação e orientação estatística;
- Ao Professor Doutor Jaime Aparecido Cury, Professor Livre Docente da Disciplina de Bioquímica do Departamento de Ciências Fisiológicas, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela sugestiva colaboração nesse trabalho;
- Ao Professor Doutor João Leonel José, Professor Assistente Doutor da Área de Farmacologia do Departamento de Ciências Fisiológicas, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela amizade e por nos apoiar e incentivar a ingressar na carreira docente, onde está sempre nos transmitindo seus conhecimentos;
- Ao Professor Doutor Alcides Guimarães, Professor Adjunto da Disciplina de Fisiologia e Biofísica, do Departamento de Ciências Fisiológicas, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela amizade e desinteressada colaboração nesse trabalho;
- A Professor Maria Cecília Ferraz Arruda Veiga, Professor Assistente da Disciplina de Fisiologia e Biofísica do Departamento de

Ciências Fisiológicas, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela amizade carinhosa, companherismo e colaboração;

- Aos Professores da Área de Farmacologia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP: Doutor Jonas Vaz de Arruda; Doutor José Ranali; Doutor Eduardo D. de Andrade e Doutora Maria de Lourdes G. da Gama, pelos seus eficientes ensinamentos;
- À Professora Miriam Campos Boaventura, pela estimada amizade, companherismo e colaboração;
- Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, Srs.: Carlos A. A. Feliciano; Ulisses de Oliveira Martins, pela colaboração técnica; Waldomiro Vieira Filho pela confecção dos gráficos; Marisa de Jesus Carlos Soares e Sueli Soliani, pela desinteressada colaboração; e a Ivany do Carmo G. Gerola, pela revisão bibliográfica;
- À todos que possibilitaram a execução deste trabalho.

C O N T E Ú D O

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Glândulas Salivares e Seus Fatores Ativos	10
1.2. Glândulas Salivares e Gônadas	19
1.3. Fatores Tóxicos	23

CAPÍTULO II

2. MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1. Distribuição dos Grupos	28
2.2. Tratamento Estatístico	33

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS	37
---------------------	----

CAPÍTULO IV

4. DISCUSSÃO	62
--------------------	----

CAPÍTULO V

5. CONCLUSÕES	75
---------------------	----

CAPÍTULO VI

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
-------------------------------------	----

CAPÍTULO VII

7. RESUMO	96
-----------------	----

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Glândulas Salivares e Seus Fatores Ativos

Desde a descoberta da calicreína nas glândulas salivares por WERLE & RODEN (1936), muitas investigações têm sido feitas, "In Vitro" e "In Vivo", no sentido de elucidar a existência de outros polipeptídeos ou fatores biologicamente ativos.

Assim, JUNQUEIRA et alii (1949), através da histoquímica, demonstrou a atividade da fosfatase ácida nos grânulos secretórios dos ductos granulados e verificou que as glândulas salivares dos camundongos machos apresentavam duas vezes e meia mais atividade desta fosfatase que as salivares de fêmeas. Ainda, quanto a atividade celular, SREEBNY; NEYER; BACHEM (1955) e SREEBNY (1960) descreveram a participação de proteases andrógeno - dependentes nas glândulas submandibulares de ratos.

Subsequentemente, foram isolados das glândulas submandibulares de ratos e camundongos, diferentes enzimas (EKFORS, 1967 e 1969) e EKFORS et al 1972a,b). Duas proteases (A e D) também foram obtidos das glândulas submandibulares de camundongos

por SCHENKEIN et alii (1969), SCHENKEIN et alii (1974) e SCHENKEIN et alii (1977) onde demonstraram que essas enzimas além de hidrolizarem as ligações arginil das proteínas, apresentavam a atividades quimiolíticas, que devem estar relacionadas filogeneticamente com as calicreínas, as quais não parecem ser andrógeno - dependentes. Essas enzimas foram descritas como sendo proteases, peptidases, hidrolases peptidases, enzimas semelhantes a tripsina, esterases e esteropeptidases.

MAYNER & ACKERMAN (1963) demonstraram a presença da ribonuclease nos túbulos granulosos das glândulas submandibulares de camundongos.

Segundo SWIGART et alii (1965) a glândula submandibular de camundongo macho contém uma grande atividade amilase, a qual excede aquela observada na fêmea. A atividade da amilásica pode ser reduzida pela castração e aumentada pela administração de testosterona às fêmeas ou a camundongos machos castrados (SHEAR et alii, 1979).

Por outro lado, dentre os fatores relacionados com o crescimento e diferenciação, o Fator de Crescimento Nervoso é um dos mais estudado da glândula submandibular. A sua purificação a partir da glândula submandibular de camundongos machos por COHEN (1960) foi precedida pela purificação do Fator de Crescimen

to Nervoso a partir do veneno de cobra por COHEN & LEVI-MONTALCINI (1956), que possui um papel essencial no desenvolvimento e manutenção da integridade funcional do sistema nervoso simpático e de alguns neurônios sensitivos.

Depois do Fator de Crescimento Nervoso, o Fator de Crescimento Epidermal é o melhor caracterizado e também muito estudado. Foi descoberto por COHEN (1962) como sendo o principal extrato da glândula submandibular de camundongos machos, o qual, quando injetado em ratos ou camundongos recém-nascidos, produziu aceleração na erupção do incisivo e na abertura das pálpebras. O Fator de Crescimento Epidermal é um potente estimulante mitótico para uma variedade de tipos celulares, acelera a queratinização e inibe a secreção gástrica ácida.

O Fator de Crescimento Epidermal é primeiramente detectável na glândula em torno do 20º dia após o nascimento (GRESIK & BARKA, 1978). Após a puberdade a concentração desse Fator aumenta rapidamente (BYNY; ORTH; COHEN, 1972).

ATTARDI et alii (1965 e 1967) purificaram um fator da glândula submandibular de camundongo que causava diferenciação de fibras musculares com perda de miosina e cartilagens e estimulava o crescimento celular mesenquimal, o qual, denominaram de Fator de Crescimento Mesodermal.

ADLER & NARBAITZ (1965) identificaram o Fator de Crescimento do Tubo Neural e observaram que adições de extratos de glândulas submandibulares de ratos à culturas de tubo neural de embriões de galinha "In Vitro", resultavam no aparecimento da abertura dorsal com crescimento irregular e hiperplásico.

JONES (1966) e JONES & ASHWOOD-SMITH (1970) purificaram um fator da glândula submandibular de camundongo, o qual por estimular a proliferação de células epiteliais em cultura de órgãos, foi chamado de Fator de Crescimento Epitelial. Entretanto, BANKS & WALTER (1973) mostraram que este fator não estimula a proliferação de células epiteliais, porém, tem um efeito preferencial na desorganização das estruturas epiteliais.

HOFFMAN et alii (1976) purificaram um fator da glândula submandibular de camundongo, e outro da glândula parótida bovina, os quais, quando injetados em camundongos adultos e recém-nascidos, produziam crescimento hipertrófico e hiperplásico de células endoteliais em diferentes órgãos.

Subsequentemente, HUTSON; EVANS; FOWLER (1979) sugeriram que as glândulas submandibulares e sublinguais de camundongos contêm um fator, largamente utilizado quando o animal se lambe, que acelera, precocemente, o processo de reparo e denominaram-no de Fator de Contração Cicatricial.

Dos fatores relacionados com a homeostase, as calicreínas das glândulas salivares tem sido amplamente estudadas, são proteases séricas (peptidil hidrolases), as quais, liberam rápida e especificamente um decapeptídeo biologicamente ativo, a lisil-bradiginina, que a partir de uma proteína precursora, quimionogênio, é encontrada na maioria dos fluídos biológicos. A lisil-bradiginina tem um pronunciado efeito vasodilatador, e há muito tempo atribuí-se a esta enzima o importante papel na regulação local do fluído sanguíneo das glândulas salivares (HILTON, 1970).

OGATA et alii (1944 e 1945) e ITO (1954) isolaram e cristalizaram do extrato de parótida bovina, uma substância biologicamente ativa, de natureza proteica, que denominaram de "Parotin". ITO (1960) confere ao Parotin várias funções importantes tais como: estimular a proliferação das cartilagens, promover o desenvolvimento de fibras elásticas e tecido conjuntivo, estimular o sistema retículo endotelial e os órgãos hematopoiéticos.

Em 1957, WERLE; VOGEL; GOLDEL, identificaram um princípio da glândula submandibular de camundongo, o qual quando injetado em cachorros ou camundongos, provocava uma hipertensão arterial duradoura.

Do mesmo modo, TURRIAN (1960) demonstrou que extrato de glândula submandibular de camundongo, quando incubado

com soro de rato, produzia um fator hipertensivo semelhante a angiotensina. COHEN et alii (1972) obtiveram duas enzimas semelhantes a renina, a partir da glândula submandibular de camundongos machos, em forma pura e estável. As duas enzimas, renina A e renina C, ambas glicoproteínas, diferem pouco em sua composição de aminoácidos e demonstraram uma potente atividade hipertensiva em ratos.

Por outro lado, numerosas observações sugerem uma interação entre a glândula submandibular e o sistema linfóide. A glândula salivar, presumivelmente, contém fatores, os quais afetam o sistema linfóide em geral, e particularmente o timo. Entretanto, estes fatores não foram purificados.

Em 1964 e 1965, BUEKER & SCHENKEIN observaram que a administração de Fator de Crescimento Nervoso, parcialmente, purificado em camundongos, reduzia o peso do timo, a espessura de seu córtex e o número de linfócitos no timo, nódulos linfáticos e baço.

Todavia, DELANGE (1975), observou que injeções de extrato de glândula submandibular e sublingual causava um estímulo imunológico nos tecidos linfóides, e não atrofia do timo, baço ou nódulos linfáticos.

ANGELETTI et alii (1965) relataram a purificação parcial de um fator da glândula submandibular de camundongo, o

qual aumenta o número de leucócitos polimorfonucleares dentro de 2 a 3 semanas quando injetado em camundongos ou coelhos, denominam-no de Fator de Indução à Granulocitose.

SHERIDAN & STANLEY (1971) demonstraram que de diversos tecidos examinados de camundongos, a glândula submandibular continha a mais alta concentração de Fator Estimulante de Colônias da Medula Óssea. Uma purificação parcial deste fator, cuja concentração era três vezes maior nas glândulas dos animais machos do que nas fêmeas, sugeriu que este fator é diferente daqueles que ocorrem em outros órgãos.

A produção extra renal de eritropoetina (EP) é muito conhecida. Em 1973 ZANGHERI et alii, demonstraram que o aumento no nível de eritropoetina, que ocorre em ratos hipóxicos e hipóxicos associados a anemia, foi mais reduzido pela nefrectomia associada a Sialoadenectomia do que pela nefrectomia somente. Estas observações sugerem a glândula submandibular como um sítio extra-renal de produção de eritropoetina. Assim, FAVA DE MORAES; ZANGHERI; DOINE (1979) obtiveram sucesso em demonstrar, imunocitoquimicamente, a presença de eritropoetina nas células dos ductos glandulares das glândulas submandibulares de ratos e camundongos.

BARKA (1973) conseguiu purificar parcialmente uma proteína de glândulas salivares de camundongos machos e fê-

meas com atividade supressora da mitose celular.

LISKE & REBER (1976) encontraram, por radioimunoensaio e imunoflorescência, uma alta concentração de Atividade 'Insulina-Semelhante' não supressível em pâncreas e glândula submandibular de rato.

LAWRENCE et alii (1977) isolaram um fator hiperglicemiante existente nas glândulas submandibulares de ratos, camundongos e coelhos que recebeu o nome de Glucagon Salivar, tendo um pêso molecular próximo de 70.000. Injeção intravenosa desse fator provoca um efeito comparável ao obtido com administração de glucagon pancreático.

Essas observações foram confirmados por SMITH et alii (1979), que através das técnicas de radio-imunoensaio e imunócitoquímica, isolaram o glucagon das glândulas submandibulares com importante participação no metabolismo de carboidratos.

ARRUDA VEIGA (1979) isolou um peptídeo do extrato de glândula submandibular de camundongos machos, que quando injetado subcutâneamente provoca poliúria e albuminúria e uma série de alterações nas estruturas renais.

Mais recentemente, MURAKAMI; TANIGUCHI; BABA

(1982) tem demonstrado que as glândulas parótidas de ratos em seres humanos, contém um peptídeo de ação semelhante a insulina (in sulin-like) e que o mesmo é, cromatograficamente, similar a insulina pancreática com importantes funções na homeostase da glicose.

Além dessas evidências experimentais que suportam a teoria endócrina das glândulas salivares, PHILLIP; SMITH; PATEL (1984) revelaram que a população de células que produzem a insulina nas glândulas parótidas, são aquelas, principalmente, encontradas ao longo dos ductos intercalares e em menor quantidade nos acinos, não observando as reações de imunoreatividade nos ductos estriados e secretores.

1.2. Glândulas Salivares e Gônadas

Embora, inúmeros pesquisadores tem dedicado atenção a outras atividades destas glândulas, tem sido proposto que as glândulas salivares interferem na atividade metabólica de diversos órgãos, como também possuem interações endócrinas.

As relações entre as glândulas salivares e as gônadas vem sendo estudadas por vários autores. Desse modo, LACASSAGNE (1940) e LACASSAGNE & CHAMORRO (1940) demonstraram a existência de dimorfismo sexual na estrutura das glândulas submandibulares de camundongos, sendo estudados bioquímica e histoquimicamente por CARAMIA (1966).

Nos camundongos, os tubulos granulares não estão presentes por 3 ou 4 semanas pós-natais e, até essa idade, não há dimorfismo sexual (SHACKLEFOR & WILBORN, 1968; SMITH & FROMMER, 1972).

Desde a demonstração do dimorfismo sexual estrutural das glândulas submandibulares de camundongos, foram desenvolvidos inúmeros estudos, entretanto, a evidência desse dimorfismo em outros animais ainda é discutida.

Os mecanismos reguladores relacionados com o desenvolvimento e maturação das glândulas submandibulares são complexos (BOYKO & ZEBROWSKI, 1972). De fato, cuidadosos estudos quantitativos tem demonstrado que os diâmetros dos túbulos das glândulas submandibulares do rato são maiores nos machos do que nas fêmeas e que nos ratos, os túbulos granuloso estão sob a influência hormonal, particularmente dos hormônios sexuais masculinos.

BALDI & CHARREAU (1972) demonstraram que as submandibulares de ratos tem um sistema ativo 17-beta-hidroxisteroide-oxidoreductase, evidenciado pela conversão da testosterona e 17-beta-estradiol em androstenediona e estrona. Segundo esses autores, é concebível que a enzima responsável por essa transformação se localize, possivelmente, nos segmentos tubulares dessas glândulas.

Outros autores, tem relacionado a remoção das glândulas salivares com alterações nas funções gonadais masculinas quanto femininas. Assim, KATAGIRI & HIGASHIGO (1940) verificaram que a remoção das glândulas submandibulares e a ligação dos ductos da parótida em ratas jovens, leva a uma hipertrofia do útero.

Em 1942, GINN & VOLKER demonstraram que a ausência das glândulas salivares em ratas provoca distúrbios relaci

onados com o metabolismo hormonal das células sexuais, vitaminas do complexo B e diminuição da fertilidade.

BIXLER; MUHLER; SHAFER (1955) demonstraram que os ratos sialoadenectomizados apresentavam um aumento no peso dos testículos.

AFONSKY (1958) verificou uma queda na capacidade de fecundação em ratas que tiveram suas glândulas salivares removidas.

SUDDICK (1960) registrou que as glândulas possuem uma substância que pode aumentar a atividade dos órgãos reprodutores.

LOURIDES et alii (1970) demonstraram que as ratas sialoadenectomizadas, apresentavam um retardo na maturação ovariana e uma atrofia do útero e JOHNSON; KEKEH; YAPI (1970) notaram em camundongos machos também sialoadenectomizados, regressão dos testículos e diminuição da atividade sexual.

Ainda, estudando o efeito causado pela ausência das glândulas salivares na fertilidade de ratos, DOTTAVIANO; RAMALHO; NEGREIROS DE PAIVA (1974) observaram um menor índice na reprodução dos animais sialodenectionizados quando comparados com os casais normais.

Em 1977, ARCIERE & MARTINELLI também verificaram uma progressiva esterilidade em ratas que tiveram suas glândulas salivares extirpadas.

1.3. Fatores Tóxicos

Tem sido demonstrado que extratos de glândulas submandibulares de camundongos são extremamente tóxicos, mesmo com baixa concentração proteica.

LUIZZI & ANGELETTI (1968) demonstraram que a diálise desses extratos com tampão TRIS-HCl 50 mM, pH 7,2, não diminui o nível de toxicidade, sugerindo que o componente tóxico deve estar associado a macromoléculas, possivelmente, de natureza proteica, sendo que a propriedade tóxica desse extrato é grandemente destruída por fervura a 100°C, durante 10 minutos. Numa tentativa de localizar o componente tóxico dessas glândulas, estes mesmos autores, fracionaram o extrato bruto de glândulas submandibulares de camundongos em colunas de "Sephadex G-100" pH neutro, e verificaram que, embora todas as frações apresentassem certo grau de toxicidade, umas das frações proteicas (fração E), era bem mais tóxica que as outras. Dose sub-letais dessa fração induzem retardo do crescimento de ratos recém-nascidos e severa atrofia do timo.

LIN & HOSHINO (1969) relataram a existência de

um fator hemorrágico, evidenciado em transplantes subcutâneos de glândulas submandibulares de camundongos, que provoca hematoma local e severa hemorragia sistêmica.

HOSHINO & LIN (1968 e 1969) descreveram a existência de um fator letal nas glândulas submandibulares de camundongos machos que era liberado quando se transplantavam essas glândulas para um animal hospedeiro. O transplante de glândulas parótidas ou submandibulares de fêmeas ou machos imaturos, não apresenta toxicidade, o que os levaram a considerar que a manifestação do fator letal está, diretamente, relacionada com a maturação sexual do camundongo macho e também a uma ação da testosterona, por isso considerar que o fator letal é testosterona dependente.

LIN & HOSHINO (1970 e 1971) relataram que existe diferença na mortalidade entre camundongos machos e fêmeas intactos que receberam enxertos de glândulas submandibulares, sendo o macho mais resistente.

Notaram, ainda, que o hospedeiro macho sialoadenectomizados apresenta maior taxa de mortalidade quando comparados com os não sialoadenectomizados e que a testosterona protege as fêmeas hospedeiras contra o efeito letal, tanto nos animais sialoadenectomizados, quanto nos não sialoadenectomizados. Desse modo, não obstante os autores admitirem que o mecanismo de proteção contra o efeito letal, é ainda obscuro, alguns dados apresen-

tados sugerem, que a presença do hormônio androgênico endógeno tem a função de proteger o camundongo macho.

HUANG; HOSHINO; KIM; CHEBIB (1977) administrando extrato liofilizado de glândulas submandibulares de camundongos machos em fêmeas receptoras, e usando a análise de probitos, compararam a susceptibilidade dos efeitos do fator letal em três espécies de animais e em quatro diferentes linhagens de camundongos. Esses autores, confirmaram a existência de uma substância não conhecida, nas glândulas submandibulares de camundongos que exerce efeito letal, com sensibilidades diferentes para as espécies de animais.

HATAKEYAMA; HIRAMATSU; MINAMI (1981) analisando o efeito tóxico do extrato de glândulas submandibulares de camundongos, ratos, cobaias e também a atividade tóxica da saliva induzida por agente alfa-adrenérgico, confirmaram, além da presença de um componente altamente tóxico nos extratos das glândulas dos animais machos, a identificação de uma enzima na saliva, semelhante a calicreína, indicando que o fator letal das glândulas submandibulares do camundongo macho é uma proteína exócrina e sua secreção na saliva é controlada por receptores alfa-adrenérgicos.

Por outro lado, PINHEIRO (1984), isolou vários peptídeos de natureza tóxica, das glândulas submandibulares

de camundongos machos, o que representa novos conhecimentos a respeito da biologia das glândulas salivares, bem como amplo campo para o estudo de peptídios ativos. No momento, já foram identificados quatro frações de diferentes peptídios ativos, os quais foram denominados de Sialotoxina I, II, III e IV respectivamente.

Em decorrência disto, propusemo-nos a realizar esse trabalho, com os seguintes objetivos:

- a) Determinar a DL_{50} da Sialotoxina I, em camundongos machos e fêmeas e suas atividades biológicas;
- b) Determinar a DL_{50} da Sialotoxina I, em camundongos machos previamente tratados com hormônio estradiol e analisar as suas atividades no organismo;
- c) Determinar a DL_{50} , em camundongos fêmeas, previamente tratadas com hormônios testosterona e observar os efeitos biológicos;
- d) Determinar a DL_{50} da Sialotoxina I, em camundongos machos orquidectomizados e verificar as suas ações biológicas;
- e) Analisar o efeito da Sialotoxina I em camundongos fêmeas ovariectomizadas e determinar a sua DL_{50} .

C A P Í T U L O I
M A T E R I A L E M É T O D O S

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente trabalho foram utilizados 470 camundongos (Mus Musculus albinus), sendo 260 machos e 210 fêmeas, com 30 a 45 dias de idade, pesando aproximadamente entre 25 e 35 gramas no início do experimento.

Os animais foram alimentados antes e durante o período experimental com ração balanceada* e água "ad libitum" e mantidos em temperatura ambiente.

2.1. Distribuição dos Grupos

Os animais foram distribuídos casualmente da seguinte forma: (Quadro A)

GRUPO I - Fêmeas Normais e Sialotoxina I - constituído de 60 fêmeas, as quais foram redistribuídas em 6 subgrupos

* Ração Ceres S/A Piracicaba

de 10 camundongos cada, nos quais foram administrados Sialotoxina I nas concentrações de: 0,5; 0,75; 1,0; 1,3; 1,4 e 1,5 mg/kg de peso corporal, via intraperitoneal.

GRUPO II:- Machos Normais e Sialotoxina I - constituído de 100 machos, os quais foram redistribuídos em 10 subgrupos de 10 camundongos. Em cada subgrupo foi administrado, via intraperitoneal, Sialotoxina I nas concentrações de: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,3; 3,5; 3,6 e 3,7 mg/kg de peso respectivamente.

GRUPO III - Machos + Estradiol e Sialotoxina I - constituído de 80 camundongos machos, os quais foram redistribuídos em 8 subgrupos de 10 camundongos cada. Esses animais receberam, previamente, tratamento com hormônio estradiol*, via intraperitoneal, na concentração de 2,0 mg/kg de peso, diariamente, durante um período de 10 dias, num volume máximo de 0,1 ml por camundongo. Em seguida, foi administrado Sialotoxina I, dose única nas concentrações de: 0,5; 1,0; 1,3; 1,5; 1,7; 2,0; 2,3 e 2,5 mg/kg de peso corporal, via intraperitoneal.

GRUPO IV - Fêmeas + Testosterona e Sialotoxina I - composto por 90 camundongos fêmeas, os quais foram redistribuídos em 9 subgrupos de 10 camundongos cada. Esses animais

* Di-Menformon - Lab. Organon do Brasil Ltda.

receberam, previamente, tratamento com hormônio testosterona*, via intraperitoneal, na concentração de 2,0 mg/kg de peso, durante um período de 10 dias, num volume máximo de 0,1 ml por camundongo. Em seguida, foi administrado Sialotoxina I, dose única nas concentrações de: 0,5; 1,0; 1,5; 1,8; 2,0; 2,3; 2,5; 2,8 e 3,0 mg/kg de peso corporal, via intraperitoneal, num volume máximo de 0,5 ml.

GRUPO V - Machos Orquidectomizados e Sialotoxina I - constituído de 80 camundongos machos, redistribuídos em 8 subgrupos de 10 camundongos, os quais foram submetidos à excisão dos testículos. Após 30 dias da cirurgia, os animais receberam Sialotoxina I, nas concentrações de: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,2; 2,4; 2,5 e 2,6 mg/kg de peso corporal, dose única, pela mesma via que os grupos anteriores.

Para a realização da orquidectomia, os animais foram anestesiados por inalação de éter sulfúrico, em uma campânula de vidro, e fixados numa prancha cirúrgica com funil, na posição de decúbito dorsal, sendo a profundidade da anestesia controlada pelas reações do animal.

A seguir, tomando os cuidados de antissepsia,

* Durateston - Lab. Organon do Brasil Ltda.

foi feita uma incisão na parte inferior do escroto de modo a permitir a extrusão dos testículos. Uma simples ligadura com fio de algodão foi colocado em volta dos vasos espermáticos e ductos deferentes. O testículo junto com o epidídimo foi excisado. Em seguida, procedeu-se à sutura com fio de algodão. Os animais foram mantidos nas mesmas condições ambientais até o dia da aplicação da Sialotoxina I.

GRUPO VI - Fêmeas Ovariectomizadas e Sialotoxina I - constituído de 60 camundongos fêmeas, redistribuídos em 6 subgrupos de 10 camundongos cada, os quais foram submetidos à remoção bilateral dos ovários. Depois de 30 dias da cirurgia, os animais receberam Sialotoxina I, nas concentrações de: 0,5; 0,75; 1,0; 1,3; 1,4 e 1,5 mg/kg de peso corporal, pela mesma via dos grupos anteriores.

Para a remoção dos ovários, os animais foram anestesiados e fixados do mesmo modo que os do grupo anterior.

A seguir, tomando-se o cuidado de antissepsia, os animais sofreram uma incisão mediana na região pélvica, até a altura dos ovários, de modo a permitir a sua remoção.

Após a divulsão da pele e exposição dos ovários, uma simples ligadura com fio de algodão foi feita em sua volta e estes foram removidos. Em seguida procedeu-se à sutura com fio de algodão. Os animais foram mantidos no mesmo ambiente.

QUADRO A

DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS NOS GRUPOS E SUBGRUPOS

SEXO	GRUPOS	SUBGRUPOS	Nº DE CAM.	TRATAMENTO
FÊMEAS	I	1a	10	Sialotoxina I:- 0,5 mg/Kg de peso corporal
		1b	10	" " 0,75 mg/Kg de peso corporal
		1c	10	" " 1,0 mg/Kg de peso corporal
		1d	10	" " 1,3 mg/Kg de peso corporal
		1e	10	" " 1,4 mg/Kg de peso corporal
		1f	10	" " 1,5 mg/Kg de peso corporal
MACHOS	II	1a	10	Sialotoxina I:- 0,5 mg/Kg de peso corporal
		1b	10	" " 1,0 mg/Kg de peso corporal
		1c	10	" " 1,5 mg/Kg de peso corporal
		1d	10	" " 2,0 mg/Kg de peso corporal
		1e	10	" " 2,5 mg/Kg de peso corporal
		1f	10	" " 3,0 mg/Kg de peso corporal
		1g	10	" " 3,3 mg/Kg de peso corporal
		1h	10	" " 3,5 mg/Kg de peso corporal
		1i	10	" " 3,6 mg/Kg de peso corporal
		1j	10	" " 3,7 mg/Kg de peso corporal
MACHOS	III	1a	10	Estradiol - 2,0 mg/Kg de peso corporal + 0,5 mg/Kg Sial. I
		1b	10	" " " " " " + 1,0 " " "
		1c	10	" " " " " " + 1,3 " " "
		1d	10	" " " " " " + 1,5 " " "
		1e	10	" " " " " " + 1,7 " " "
		1f	10	" " " " " " + 2,0 " " "
		1g	10	" " " " " " + 2,3 " " "
		1h	10	" " " " " " + 2,5 " " "
FÊMEAS	IV	1a	10	Testosterona - 2,0mg/Kg de peso corporal + 0,5 mg/Kg Sial. I
		1b	10	" " " " " " + 1,0 " " "
		1c	10	" " " " " " + 1,5 " " "
		1d	10	" " " " " " + 1,8 " " "
		1e	10	" " " " " " + 2,0 " " "
		1f	10	" " " " " " + 2,3 " " "
		1g	10	" " " " " " + 2,5 " " "
		1h	10	" " " " " " + 2,8 " " "
		1i	10	" " " " " " + 3,0 " " "
MACHOS	V	1a	10	Orquidectomia + 0,5 mg/Kg de peso corporal de Sial. I
		1b	10	" + 1,0 mg/Kg de peso corporal " " "
		1c	10	" + 1,5 mg/Kg de peso corporal " " "
		1d	10	" + 2,0 mg/Kg de peso corporal " " "
		1e	10	" + 2,2 mg/Kg de peso corporal " " "
		1f	10	" + 2,4 mg/Kg de peso corporal " " "
		1g	10	" + 2,5 mg/Kg de peso corporal " " "
		1h	10	" + 2,6 mg/Kg de peso corporal " " "
FÊMEAS	VI	1a	10	Ovariectomia + 0,5mg/Kg de peso corporal de Sialotoxina I
		1b	10	" + 0,75 " " " " " " " "
		1c	10	" + 1,0 " " " " " " " "
		1d	10	" + 1,3 " " " " " " " "
		1e	10	" + 1,4 " " " " " " " "
		1f	10	" + 1,5 " " " " " " " "

2.2. Tratamento Estatístico

Com a finalidade de obter-se a chamada dose letal mediana (DL_{50}) das drogas administradas, a camundongos tratados diferentemente, usou-se os métodos de probitos. O método permitiu cálculo dos probitos esperados, a partir dos probitos empíricos, levando-se em conta o peso de cada observação (FINEY, 1964).

Para fins de cálculo foi utilizada a fórmula $Y = 5 + \frac{x - m}{\sigma}$, onde Y representa os probitos, m a taxa de mortalidade considerada e x a dose em escala logaritmica e σ o desvio padrão da distribuição. O uso dos valores das doses em escala logaritmica, lineariza a curva de distribuição das frequências em torno da média, de modo que, se as frequências de morte forem dadas em termos de desvios normais equivalentes ("t") ou na escala de probitos ($5 + t$), a curva de mortalidade poderá ser retificada de acordo com a equação indicada.

Para o cálculo dos probitos e obtenção das doses de mortalidades deve-se fazer o seguinte:

- 1º) Transforme as doses usadas (m/kg de peso) em logarítimo decimais;

- 2º) Através da fórmula $Y = 5 + \frac{x - m}{\sigma}$ acha-se o probito empírico ou pode se obter diretamente da tabela de probitos;
- 3º) Determina-se uma equação de regressão com os pontos $x = \log$ da dose e Y o probito esperado (Y_e);
- 4º) Para achar o Y esperado precisa-se determinar as estimativas dos parâmetros da equação de regressão linear (\hat{A} e \hat{B}):

$$\hat{A} = \bar{Y} - \hat{B}x \text{ e } \hat{B} = \frac{\sum x_i Y_i - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}{\sum x_i^2 - \frac{\sum (x_i)^2}{n}}$$

$\sum x_i$ = somatória dos log das doses.

$\sum x_i y_i$ = somatória dos probitos do logaritmo da dose vezes o probito empírico.

$\sum x_i^2$ = somatória dos logaritmos das doses ao quadrado.

$\sum y_i$ = somatória dos probitos empíricos.

5º) Calcula-se a seguir a média dos probitos empíricos:

$$\bar{Y} = \frac{\sum Y_i}{n} \text{ faz-se o mesmo com } \bar{x} \text{ (log da dose)}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum X_i}{n}$$

6º) Obtém-se então a equação $\bar{Y}_e = \hat{A} + \hat{B}x$ onde $x = \log$ da dose e $Y_e =$ probito esperado:

7º) Para determinação da DL_{50} usa-se a equação $Y = \hat{A} + \hat{B}x$, onde $y = 5$
 $Y = \hat{A} + \hat{B} \log_{10} X$, onde X é a porcentagem de mortalidade observada.

Exemplo: $5 = \hat{A} + \hat{B} \log_{10} X$

$$5 - \hat{A} = \hat{B} \log_{10} X$$

$$\frac{5 - \hat{A}}{\hat{B}} = \log_{10} X \quad \text{---} \quad X = 10^{\frac{5 - \hat{A}}{\hat{B}}}$$

8º) $x =$ dose que mata 50% da população.

Para valores negativos, foi somado 0,5 à dose para determinação do logarítmo decimal.

CAPÍTULO III
RESULTADOS

3. RESULTADOS

Os animais do Grupo I, constituído de fêmeas normais que receberam doses de Sialotoxina I nas concentrações de 0,5; 0,75; 1,0; 1,3; 1,4 e 1,5 mg/kg de peso corporal, apresentaram respectivamente, a taxa de mortalidade de 0, 20, 50, 70, 80 e 100%.

Pela análise de probitos obteve-se uma equação de regressão para os probitos esperados de $y = 3,37 + 8,56 \log_{10} X$, através do qual determinou-se a dose letal para 50% da população, $DL_{50} = 1,05 \pm 0,06$ mg/kg de peso corporal de Sialotoxina I quando administrada em camungondos fêmeas normais (Tabela e Gráfico I).

A análise das atividades biológicas (Quadro I) demonstrou que os animais, nos quais foram administrados doses de Sialotoxina I na concentração de 0,5 mg/kg de peso corporal, embora a taxa de mortalidade seja de 0%, notou-se reações de hiperexcitabilidade, apatia em 100% dos animais, festinação em 30% dos animais e poliúria em 20% dos animais.

Verificou-se também, que a medida que aumentavam as concentrações, as manifestações biológicas se

agravavam, e já na concentração de 1,4 e 1,5 mg/kg de peso corporal, quase todos os animais revelaram manifestações susceptíveis de: hiperexcitabilidade, apatia, festinação, hipotonia, piloereção, taquicardia, sudoração, cianose, midríase, exoftalmia, poliúria, epistótono da cauda, convulsões, contraturas e morte.

TABELA I

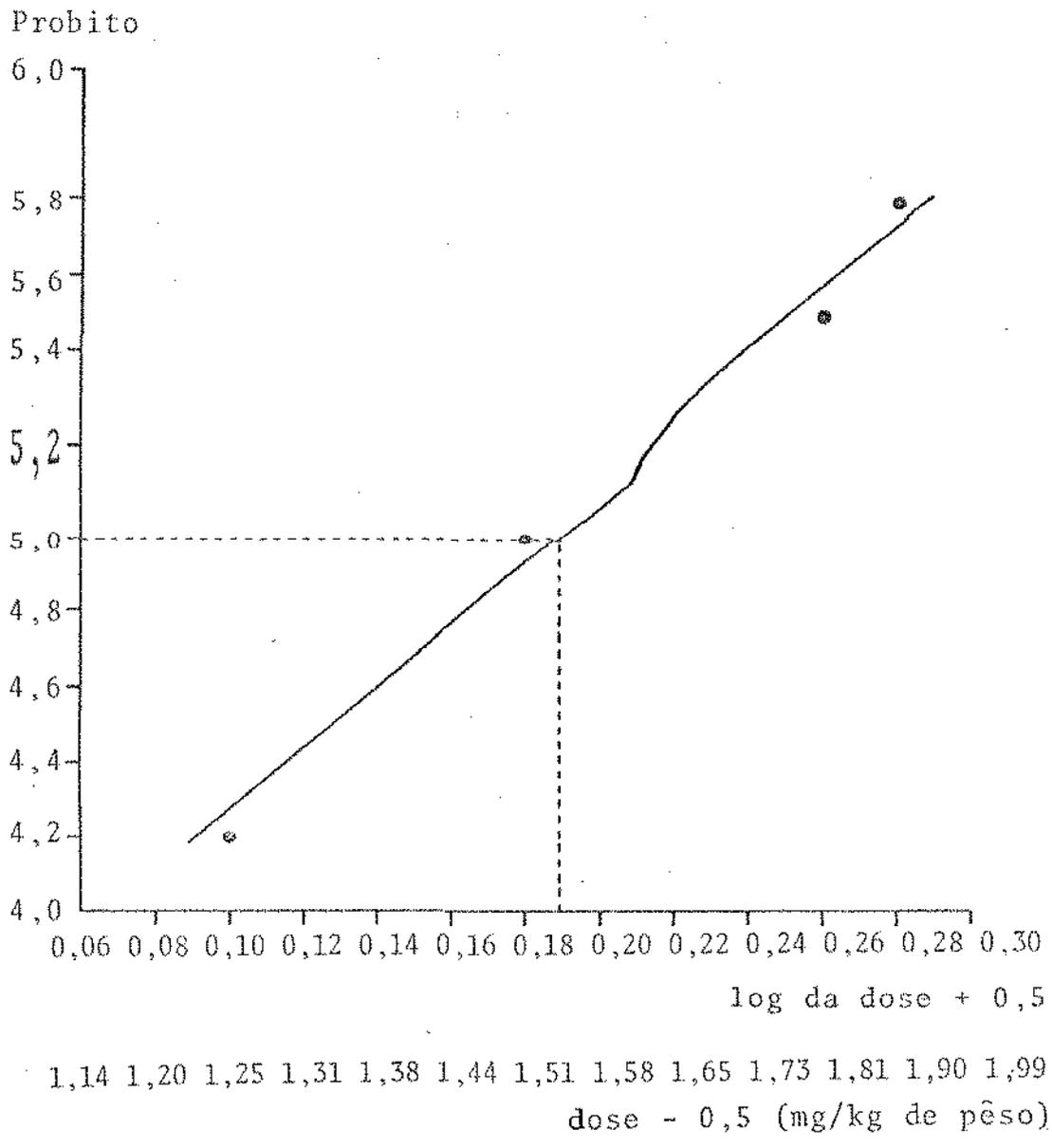
Fêmeas normais que receberam diferentes doses de Sialotoxina I

DOSE mg/kg	LOG ₁₀ DA DOSE+0,5	TAXA DE MORTALIDADE	PROBITO EMPÍRICO	PROBITO ESPERADO
0,50	0,00	0	-	-
0,75	0,10	20	4,2	4,23
1,00	0,18	50	5,0	4,91
1,30	0,26	70	5,5	5,60
1,40	0,28	80	5,8	5,77
1,50	0,30	100	-	-

Valores das doses (mg/kg de peso corporal), logarítimos das doses, suas taxas de mortalidade e seus respectivos probitos empírico e esperado ($DL_{50} = 1,05 \pm 0,06$).

QUADRO I:- Manifestações biológicas de camundongos fêmeas que receberam doses crescentes de Sialotoxina I.

DOSES DE SIALOTOXINA I mg/kg DE PESO	NÚMERO DE ANIMAIS					
	0,5	0,75	1,0	1,3	1,4	1,5
ATIVIDADES BIOLÓGICAS	10	10	10	10	10	10
HIPER-EXCITABILIDADE	10	10	10	10	10	10
APATIA	10	10	10	10	10	10
FESTINAÇÃO	3	5	10	10	10	10
HIPOTENIA	0	2	5	7	8	10
PILOEREÇÃO	0	2	5	7	8	10
TAQUICARDIA	0	2	5	7	8	10
SUDORAÇÃO	0	2	5	7	8	10
CIANOSE	0	2	5	7	8	10
MIDRIASE e ENOFTALMIA	0	2	5	7	8	10
POLIÚRIA	2	2	5	7	8	10
EPÍSTOTONO DA CAUDA	0	1	3	5	7	10
CONVULSÕES e CONTRATURAS	0	0	3	5	7	8



$DL_{50} = 1,05 \pm 0,06$ mg/kg de pêso corporal.

GRÁFICO I:- Função Linear dos probitos empíricos em relação aos logarítimos da dose, de camundongos fêmeas normais que receberam diferentes concentrações de Sialotoxina I.

Os resultados do Grupo II, formado de camundongos machos normais, que receberam concentrações crescentes de Sialotoxina I nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,3; 3,5; 3,6 e 3,7 mg/kg de peso corporal mostraram que somente a dose de 3,3 mg/kg de peso corporal apresentou índice de mortalidade de 10%, e para as doses subsequentes, notou-se, respectivamente, taxa de mortalidade de 30, 60 e 100%.

Desse modo, as concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mg/kg de Sialotoxina I não apresentaram nenhuma taxa de mortalidade.

A análise de probitos demonstrou que a equação de regressão para os probitos esperados de $Y = 12,58 + 31,5x$ e que a dose letal estimada de Sialotoxina I foi de $3,6 \pm 0,09$ mg/kg de peso corporal (Tabela e Gráfico II).

Observando-se os resultados do Quadro II, os quais demonstraram as manifestações biológicas, verificou-se que os efeitos iniciais de hiperexcitabilidade e apatia apareceram apenas com a dose de 2,0 mg/kg de peso corporal e que as demais manifestações biológicas ordenadas somente surgiram na dose de 3,5 mg/kg de peso corporal e na dose de 3,7 mg além de observar-se todos os sintomas descritos para as atividades biológicas, notou-se uma taxa de 100% de mortalidade.

TABELA II

Machos normais que receberam doses crescentes de Sialotoxina I.

DOSE mg/kg	LOG ₁₀ DA DOSE	TAXA DE MORTALIDADE(%)	PROBITO EMPÍRICO	PROBITO ESPERADO
3,0	0,48	0	-	-
3,3	0,52	10	3,7	3,8
3,5	0,54	30	4,5	4,4
3,6	0,56	60	5,2	5,1
3,7	0,57	100	-	-

Valores das doses (mg/kg de pêsso corporal), logarítimos das doses, suas taxas de mortalidade e seus respectivos probitos empírico e esperado ($DL_{50} = 3,6 \pm 0,09$).

QUADRO II:- Manifestações biológicas de camundongos machos que receberam doses crescentes de Sialotoxina I.

DOSES DE SIALOTOXINA I mg/kg DE PESO	NÚMERO DE ANIMAIS									
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,3	3,5	3,6	3,7
ATIVIDADES BIOLÓGICAS	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
HIPER-EXCITABILIDADE	0	0	0	10	10	10	10	10	10	10
APATIA	0	0	0	10	10	10	10	10	10	10
FESTIVAÇÃO	0	0	0	0	2	3	5	8	10	10
HIPOTONIA	0	0	0	0	0	0	2	3	6	10
PILORESEÇÃO	0	0	0	0	0	0	2	3	6	10
TAQUICARDIA	0	0	0	0	0	0	2	3	6	10
SUDORAÇÃO	0	0	0	0	0	0	2	3	6	10
CIANOSE	0	0	0	0	0	0	2	3	6	10
MIDRIASE e EXOPTALMIA	0	0	0	0	0	0	2	3	6	10
POLIÚRIA	0	0	0	0	0	1	2	3	6	10
EPISTÓTONO DA CAUDA	0	0	0	0	0	0	0	2	6	6
CONVULSÕES e CONTRATURAS	0	0	0	0	0	0	0	1	3	6

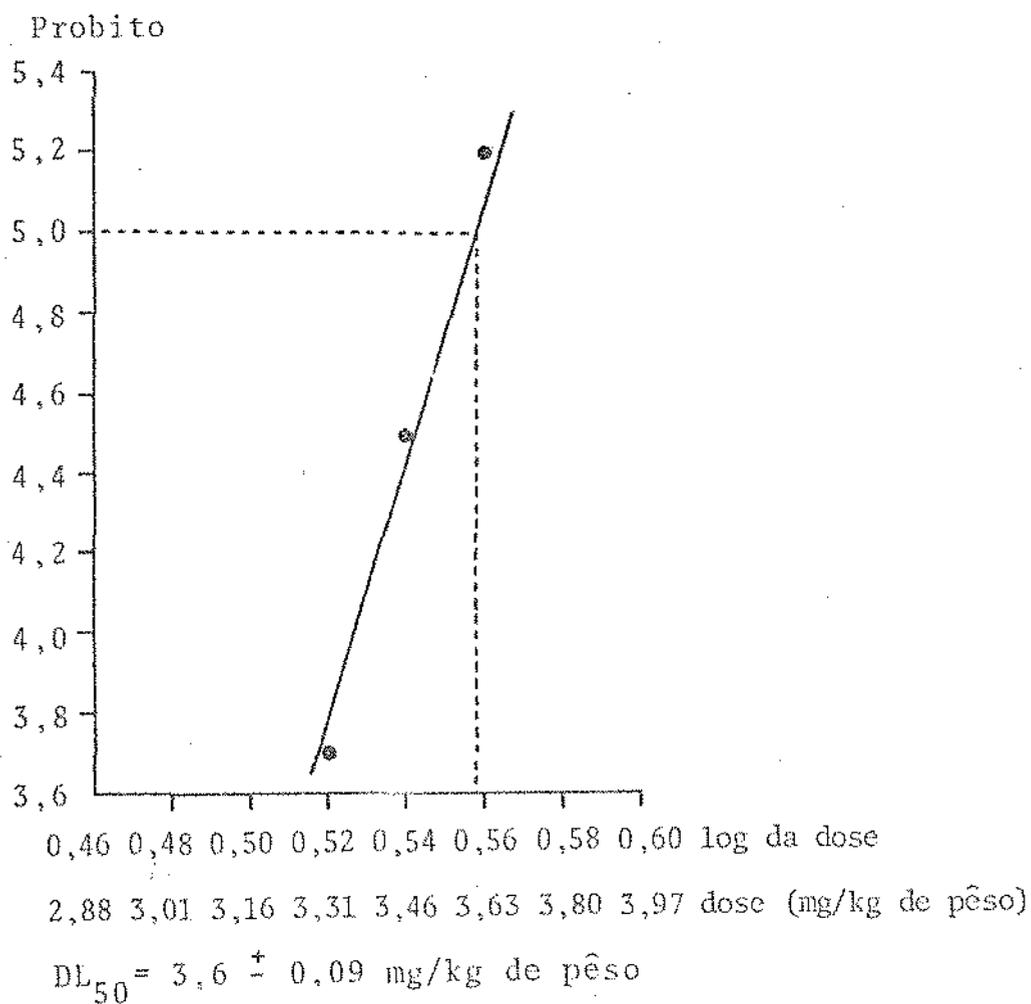


GRÁFICO II:- Função Linear dos probitos empí-
ricos em relação aos logarítimos
da dose, de camundongos machos
normais que receberam diferentes
concentrações de Sialotoxina I.

Para os animais do Grupo III, camundongos machos, previamente tratados com hormônio estradiol e Sialotoxina I nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,3; 1,5; 1,7; 2,0; 2,3 e 2,5 mg/kg de peso corporal, verificou-se que a taxa inicial de 40% de mortalidade apareceu na concentração de 1,3 mg/kg de peso corporal e que nas concentrações subsequentes a taxa foi de 60, 70, 80, 90 e 100% de mortalidade.

A análise de probitos apresentou uma equação de regressão para os probitos esperados de $Y = 3,50 + 6,9x$ e a dose mediana letal (DL_{50}) de Sialotoxina I, para camundongos machos que receberam estradiol, foi de $1,45 \pm 0,11$ mg/kg de peso corporal (Tabela e Gráfico III).

Quanto as manifestações das atividades biológicas, o Quadro III mostrou que as doses iniciais de 0,5 e 1,0 mg/kg de peso corporal de Sialotoxina I apresentaram apenas atividades de hiperexcitabilidade e apatia para todos os animais, sem ocorrência de mortes.

Todavia, a partir das concentrações de 1,3 mg/kg as manifestações foram crescentes a medida que se aumentavam as doses, alcançando o grau de convulsões, contraturas e morte na dose de 2,5 mg/kg de peso corporal.

TABELA III

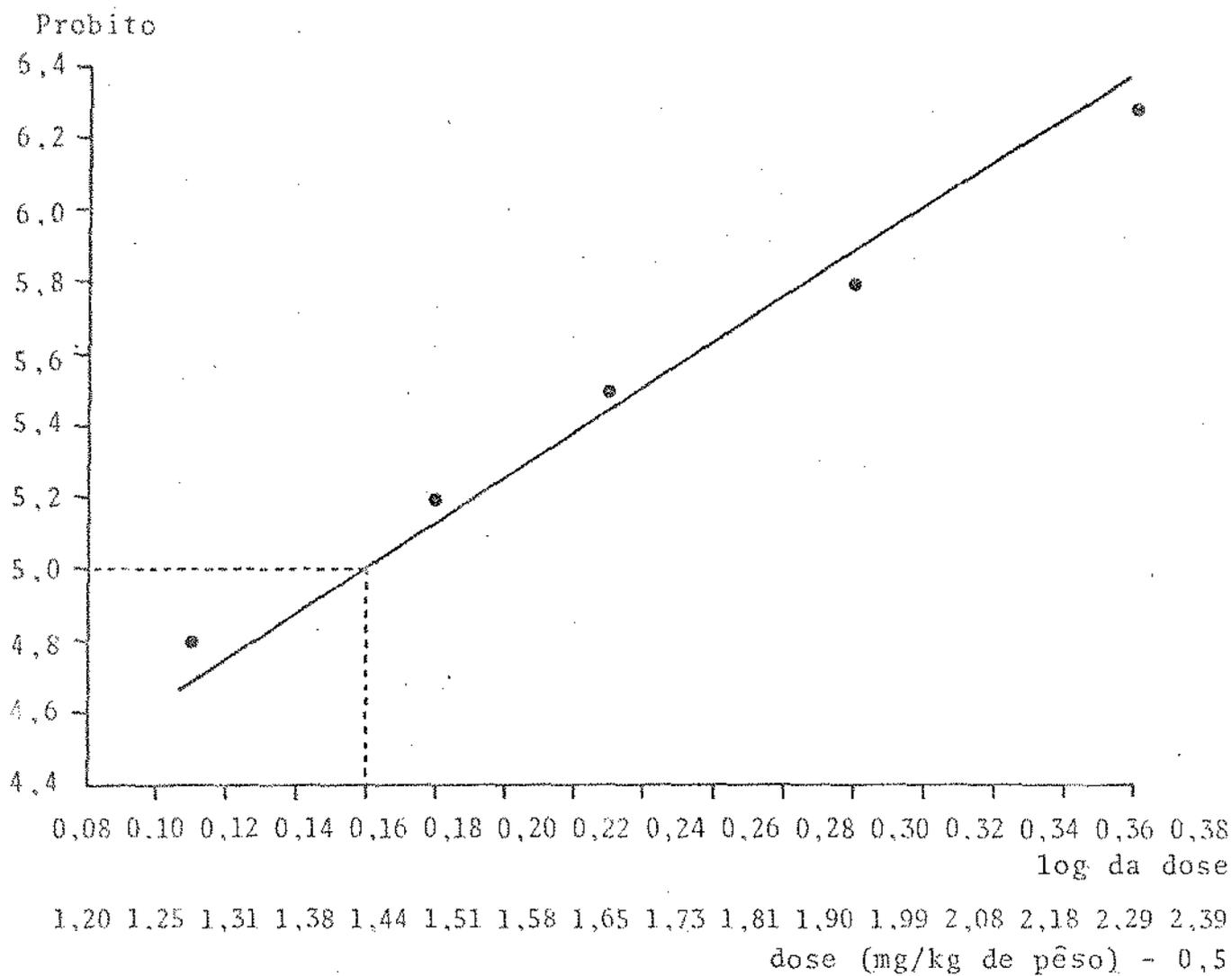
Camundongos machos previamente tratados com hormônio estradiol e que receberam doses crescentes de Sialotoxina I.

DOSE mg/kg	LOG ₁₀ DA DOSE	TAXA DE MORTALIDADE (%)	PROBITO EMPÍRICO	PROBITO ESPERADO
1,0	0,00	0	-	-
1,3	0,11	40	4,8	4,7
1,5	0,18	60	5,2	5,1
1,7	0,23	70	5,5	5,5
2,0	0,30	80	5,8	6,0
2,3	0,36	90	6,3	6,4
2,5	0,40	100	-	-

Valores das doses (mg/kg de peso corporal), logarítimos das doses, suas taxas de mortalidade e seus respectivos probitos empírico e esperado ($DL_{50} = 1,45 \pm 0,11$).

QUADRO III:- Manifestações biológicas de camundongos machos previamente tratados com hormônio Estradiol e que receberam doses crescentes de Sialotoxina I.

ATIVIDADES BIOLÓGICAS	DOSES DE SIALOTOXINA I mg/Kg DE PESO							
	0,5	1,0	1,3	1,5	1,7	2,0	2,3	2,5
NÚMERO DE ANIMAIS	10	10	10	10	10	10	10	10
HIPER-EXCITABILIDADE	10	10	10	10	10	10	10	10
APATIA	10	10	10	10	10	10	10	10
FESTINAÇÃO	0	0	3	4	5	7	8	10
HIPOTONIA	0	0	3	4	5	7	8	10
FILCERÇÃO	0	0	2	3	3	5	7	10
TAQUICARDIA	0	0	2	3	3	5	7	10
SUDORAÇÃO	0	0	2	3	3	5	7	10
CIANOSE	0	0	4	6	7	8	9	10
MIDRIASE e ENOFTALMIA	0	0	4	6	7	8	9	10
POLIÚRIA	0	0	2	5	7	8	9	10
EPISTÓTONO DA CAUDA	0	0	0	0	3	5	6	10
CONVULSÕES e CONTRATURAS	0	0	0	0	3	5	6	10



$$DL_{50} = 1,45 \pm 0,11 \text{ mg/kg de pêsso}$$

GRÁFICO III:- Função Linear dos probitos empíricos em relação aos logaritmos da dose, de camundongos machos, que foram previamente tratados com hormônio estradiol e que receberam diferentes concentrações de Sialotoxina I.

Os resultados do Grupo IV, camundongos fêmeas, previamente, tratadas com hormônios testosterona e que receberam Sialotoxina I nas doses de 0,5; 1,0; 1,5; 1,8; 2,0; 2,3; 2,5; 2,8 e 3,0 mg/kg de peso corporal, apresentaram uma taxa de mortalidade de 10% somente a partir da concentração de 1,8 mg/kg de peso. As doses subsequentes de Sialotoxina I mostraram uma mortalidade, respectivamente, de 20, 50, 60, 80 e 100%.

Por outro lado, a análise de probitos demonstrou uma equação de regressão para os probitos esperados de $Y = 1,46 + 10x$ e a dose mediana letal (DL_{50}) de Sialotoxina I, para camundongos fêmeas que receberam previamente testosterona, foi de $2,26 \pm 0,10$ mg/kg de peso corporal (Tabela e Gráfico IV).

Com relação as atividades biológicas, o Quadro IV demonstrou que as concentrações de 0,5 mg não apresentaram sintomas e que a dose de 1,5 mg de Sialotoxina I apareceram somente manifestações de hiperexcitabilidade e apatia.

Todavia, a partir da dose de 2,3 mg notou-se, além da taxa de 50% de mortalidade, sintomas de hiperexcitabilidade, apatia, festinação, hipotonia, piloereção, taquicardia, sudoração, cianose, midríase, exoftalmia, poliúria, epistôtono da cauda, convulsões e contraturas.

Verificou-se que a medida que as doses foram

aumentando, tanto as atividades biológicas quanto o número de mortes dos animais eram mais acentuados, alcançando o grau máximo na concentração de 3,0 mg/kg de peso corporal e 100% de mortalidade.

TABELA IV

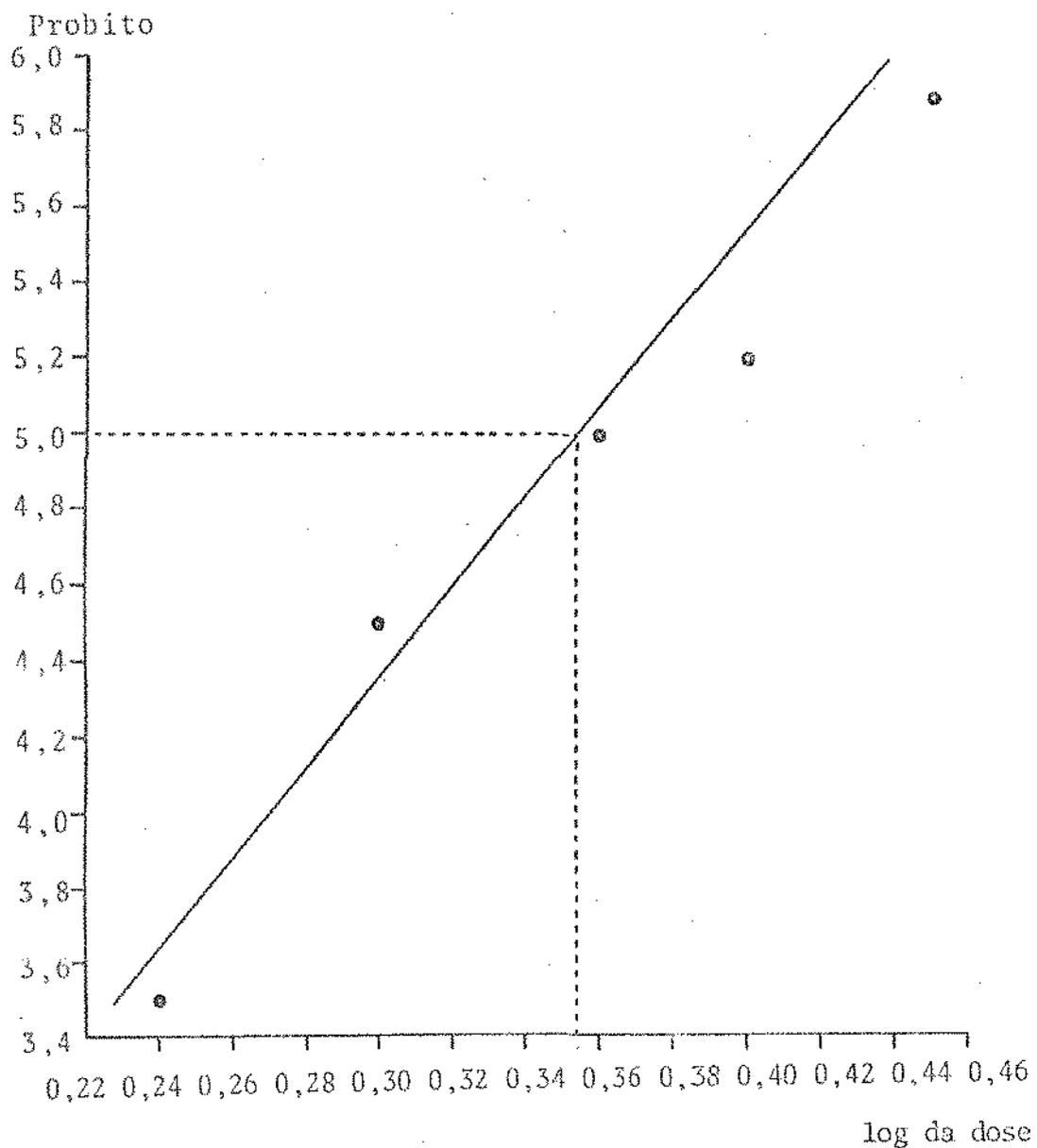
Camundongos fêmeas, previamente tratadas com hormônio Testosterona e que receberam doses crescentes de Sialotoxina I.

DOSE mg/kg	LOG ₁₀ DA DOSE	TAXA DE MORTALIDADE(%)	PROBITO EMPÍRICO	PROBITO ESPERADO
1,5	0,18	0	-	-
1,8	0,26	10	3,7	4,1
2,0	0,30	30	4,5	4,5
2,3	0,36	50	5,0	5,1
2,5	0,40	60	5,2	5,5
2,8	0,45	80	5,9	6,0
3,0	0,48	100	4,86	5,04

Valores das doses (mg/kg de peso corporal), logarítimos das doses, suas taxas de mortalidade e seus respectivos probitos empírico e esperado ($DL_{50} = 2,26 \pm 0,10$).

QUADRO IV:- Manifestações biológicas de camundongos fêmeas, previamente tratadas com hormônio testosterona que receberam concentrações crescentes de Sialotoxina I.

DOSES DE SIALOTOXINA I MG/KG DE PESO	NÚMERO DE ANIMAIS								
	0,5	1,0	1,5	1,8	2,0	2,3	2,5	2,8	3,0
ATIVIDADES BIOLÓGICAS	10	10	10	10	10	10	10	10	10
HIPER-EXCITABILIDADE	0	0	10	10	10	10	10	10	10
APATIA	0	0	10	10	10	10	10	10	10
FESTINAÇÃO	0	0	0	1	3	5	6	8	10
HIPOTONIA	0	0	0	0	2	3	5	8	10
PILOERECÇÃO	0	0	0	0	2	3	5	8	10
TAQUICARDIA	0	0	0	0	2	3	5	8	10
SUDORAÇÃO	0	0	0	0	2	3	5	8	10
CIANOSE	0	0	0	0	2	3	5	8	10
MIDRIASE e EXOPALMIA	0	0	0	0	2	3	5	8	10
POLIÚRIA	0	0	0	0	3	5	6	8	10
EPISTÓTONO DA CAUDA	0	0	0	0	0	2	4	6	7
CONVULSÕES e CONTRATURAS	0	0	0	0	0	2	4	6	7



1,65 1,73 1,81 1,90 1,99 2,08 2,18 2,29 2,39 2,51 2,63 2,75 2,88
dose (mg/kg de pêso)

$DL_{50} = 2,26 \pm 0,10$ mg/kg de pêso

GRÁFICO IV: - Função Linear dos probitos empíricos em relação aos logarítimos da dose, de camundongos fêmeas que foram previamente tratadas com hormônio testosterona e receberam diferentes concentrações de Sialotoxina I.

Os animais do Grupo V, camundongos machos submetidos, previamente, a orquidectomia e que durante o período experimental receberam doses crescentes de Sialotoxina I nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,2; 2,4; 2,5 e 2,6 mg/kg de peso corporal, apresentaram taxa de mortalidade de 30% somente a partir da dose de 2,2 mg/kg de peso e as doses subsequentes uma taxa respectivamente, de 60, 80 e 100% (Tabela V).

Quanto a análise de probitos, para obter-se o probito esperado, obteve-se a equação de regressão $Y = 2,54 + 21,7x$ indicando que cada unidade de aumento do logarítimo da dose causa um aumento no probito esperado de 21,7 vezes e a DL_{50} de Sialotoxina I, foi de $2,32 \pm 0,06$ mg/kg de peso corporal (Gráfico V).

Notou-se, portanto, que as concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg de Sialotoxina I não apresentaram nenhuma taxa de mortalidade, apenas manifestações de hiperexcitabilidade e apatia. Observou-se (Quadro V) que nas demais doses, além das duas atividades biológicas mencionadas, os sintomas de festinação, hipotonia, piloereção, taquicardia, sudoração, cianose, mi-dríase, exoftalmia, poliúria, epistôtono, convulsões, contraturas e mortes estavam presentes, atingindo o grau máximo na dose de 2,6 mg/kg de peso e a taxa de 100% de mortalidade.

TABELA V

Camundongos machos submetidos a orquidectomia e que receberam doses crescentes de Sialotoxina I.

DOSE mg/kg	LOG ₁₀ DA DOSE	TAXA DE MORTALIDADE (%)	PROBITO EMPÍRICO	PROBITO ESPERADO
2,0	0,30	0	-	-
2,2	0,34	30	4,5	4,4
2,4	0,38	60	5,2	5,3
2,5	0,40	80	5,8	5,7
2,6	0,41	100	-	-

Valores das doses (mg/kg de peso corporal), logarítimos das doses, suas taxas de mortalidade e seus respectivos probitos empírico e esperado ($DL_{50} = 2,32 \pm 0,06$).

2

QUADRO V:- Manifestações biológicas de camundongos machos orquidectomizados, que receberam concentrações crescentes de Sialotoxina I.

DOSES DE SIALOTOXINA I mg/kg DE PESO	NÚMERO DE ANIMAIS							
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,2	2,4	2,5	2,6
ATIVIDADES BIOLÓGICAS	10	10	10	10	10	10	10	10
HIPER-EXCITABILIDADE	10	10	10	10	10	10	10	10
APATIA	10	10	10	10	10	10	10	10
FESTINAÇÃO	0	0	0	2	3	6	8	10
HIPOTONIA	0	0	0	0	3	6	8	10
PILOERECÇÃO	0	0	0	0	3	6	8	10
TAQUICARDIA	0	0	0	0	3	6	8	10
SUDORAÇÃO	0	0	0	0	3	6	8	10
CIANOSE	0	0	0	0	3	6	8	10
MIDRIASE e EXOPTALMIA	0	0	0	0	3	6	8	10
POLIÚRIA	0	0	0	1	3	6	8	10
EPISTÓTONO DA CAUDA	0	0	0	0	0	2	4	5
CONVULSÕES e ONTEMERAS	0	0	0	0	0	2	4	5

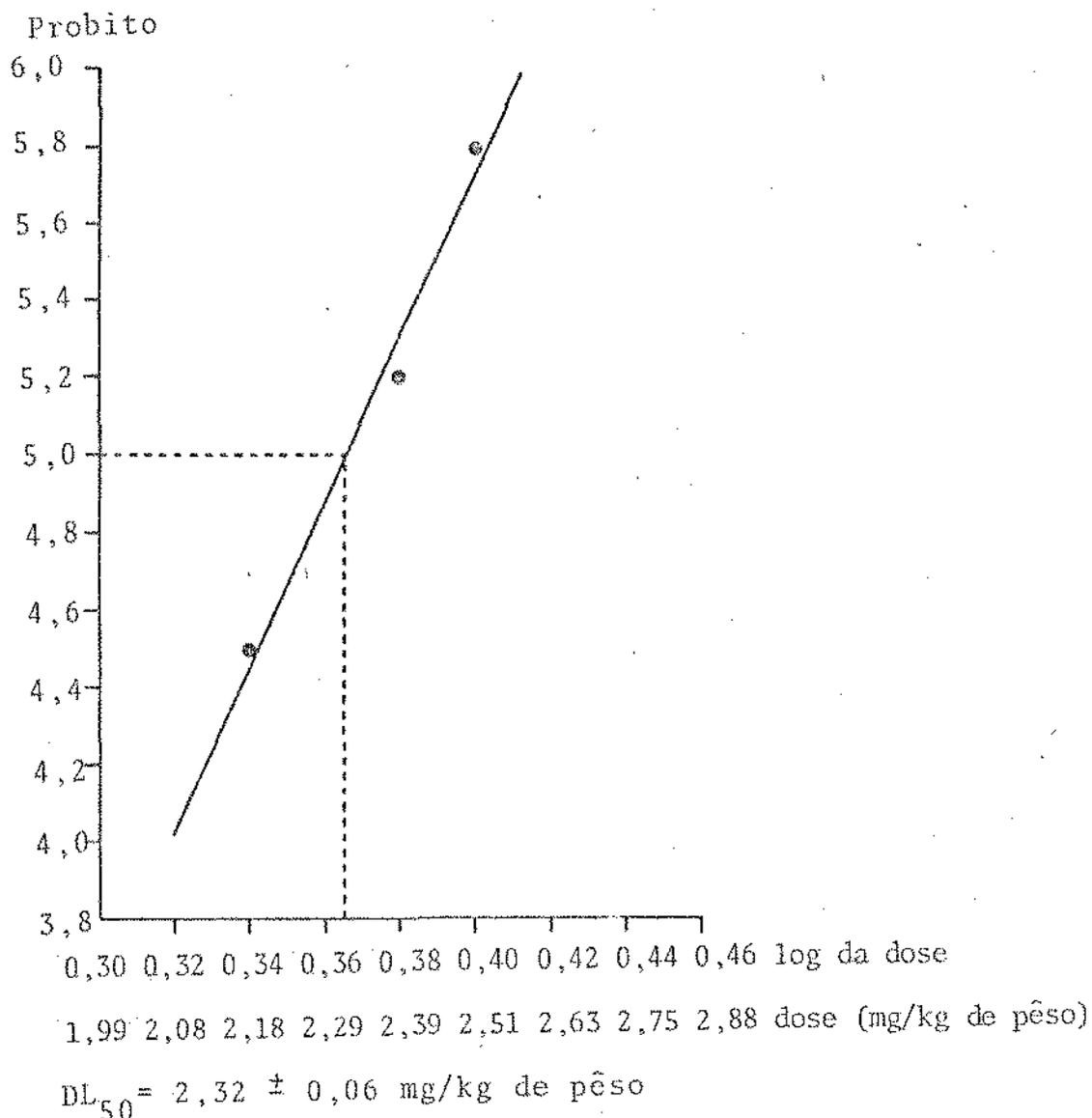


GRÁFICO V:- Função Linear dos probitos empíricos em relação aos logarítimos da dose de camundongos machos orquidectomizados que receberam diferentes concentrações de Sialotoxina I.

Os animais do Grupo VI, camundongos fêmeas submetidos, previamente, à ovariectomia e que durante a fase experimental receberam doses de Sialotoxina I, nas concentrações de 0,5; 0,75; 1,0; 1,3; 1,4 e 1,5 mg/kg de peso corporal, apresentaram, respectivamente, taxa de mortalidade de 0, 30, 50, 80, 90 e 100 % (Tabela VI).

A análise de probitos, que determinou a equação de regressão para os probitos esperados $Y = 3,12 + 11,3x$ significando que cada unidade de aumento do logarítimo da dose causava um aumento no probito esperado de 11,3 vezes e a dose letal (DL_{50}) de Sialotoxina I para os camundongos fêmeas, previamente, ovariectomizadas foi de $0,97 \pm 0,07$ mg/kg de peso corporal (Gráfico VI).

Com relação às atividades biológicas, a análise do Quadro VI, notou-se que houve um aumento de sensibilidade e que na concentração de 0,75 mg/kg de peso corporal de Sialotoxina já aparecem sintomas de hiperexcitabilidade, apatia, festinação, hipotonia, piloereção, taquicardia, sudoração, cianose, miíase, exoftalmia e poliúria em percentual significativo de animais e que nas doses subsequentes o complemento do quadro de manifestações foi crescente tanto nas atividades biológicas quanto na taxa de mortalidade.

TABELA VI

Camundongos fêmeas ovariectomizadas que receberam concentrações doses de Sialotoxina I.

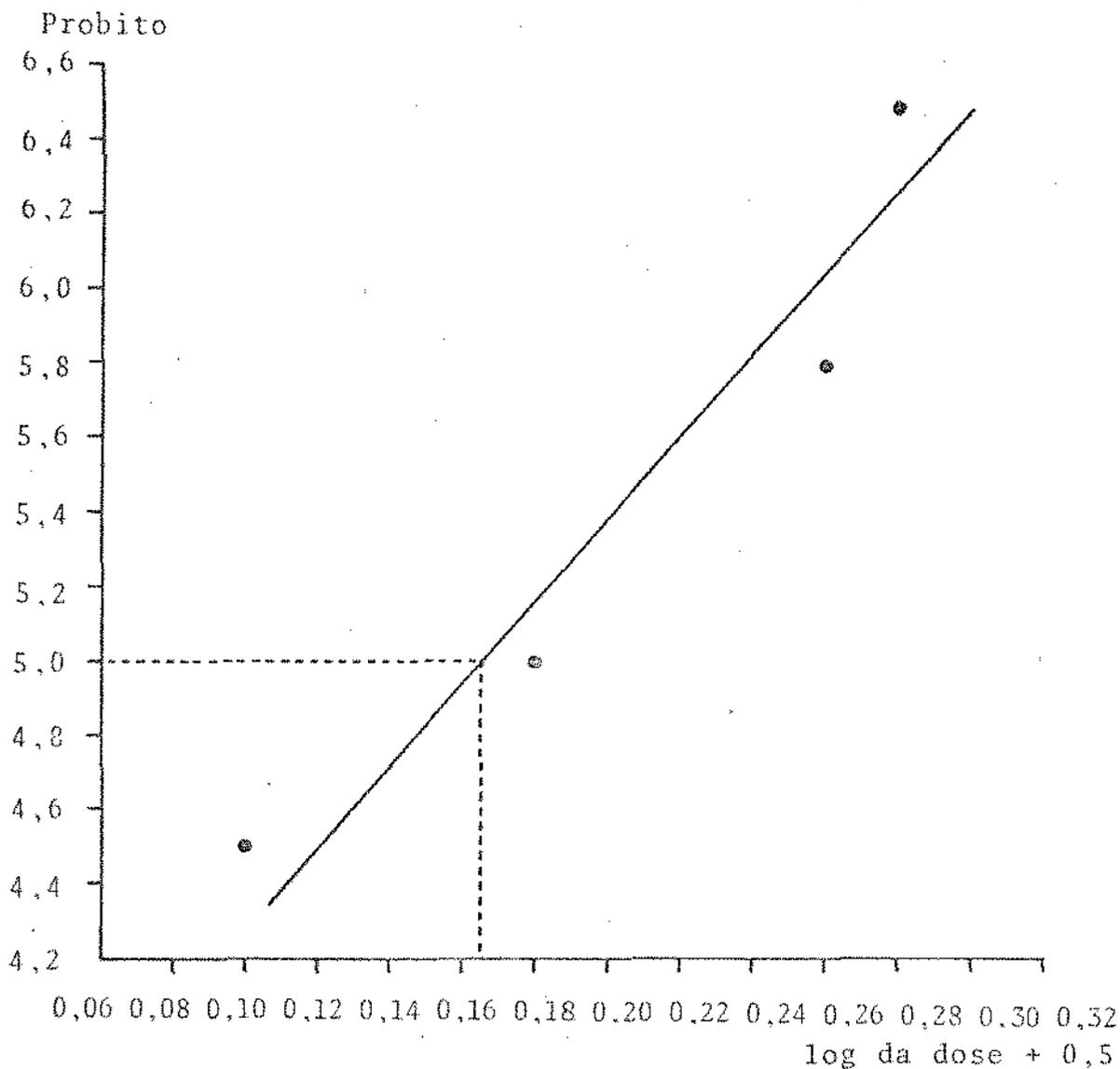
DOSE mg/kg	LOG_{10} DA DOSE+0,5	TAXA DE MORTALIDADE(%)	PROBITO EMPÍRICO	PROBITO ESPERADO
0,50	0,00	0	-	-
0,75	0,10	30	4,5	4,2
1,00	0,18	50	5,0	5,2
1,30	0,26	80	5,8	6,1
1,40	0,28	90	6,3	6,3
1,50	0,30	100	-	-

Valores das doses (mg/kg de peso corporal), logarítimos das doses, suas taxas de mortalidade e seus respectivos probitos empírico e esperado ($\text{DL}_{50} = 0,97 \pm 0,07$).

2

QUADRO VI:- Manifestações biológicas de camundongos fêmeas ovariectomizadas, que receberam concentrações crescentes de Sialotoxina I.

DOSES DE SIALOTOXINA I mg/kg DE PESO	NÚMERO DE ANIMAIS					
	0,5	0,75	1,0	1,3	1,4	1,5
ATIVIDADES BIOLÓGICAS	10	10	10	10	10	10
HIPER-EXCITABILIDADE	10	10	10	10	10	10
APATIA	10	10	10	10	10	10
RESTINAÇÃO	3	5	10	10	10	10
HIPOTONIA	0	3	5	8	9	10
PILOERREÇÃO	0	3	5	8	9	10
TAQUICARDIA	0	3	5	8	9	10
SUDORAÇÃO	0	3	5	8	9	10
CIANOSE	0	3	5	8	9	10
MIDRIASE e EXOPALMIA	0	4	5	8	9	10
POLIÚRIA	1	4	5	8	9	10
EPISTÓTONO DA CAUDA	0	0	2	5	7	7
CONVULSÕES e CONTRATURAS	0	0	2	5	7	7



1,14 1,20 1,25 1,31 1,38 1,44 1,51 1,58 1,65 1,73 1,81 1,90 1,99 2,08
 dose (mg/kg de pêsso) - 0,5

$$DL_{50} = 0,97 \pm 0,07 \text{ mg/kg de pêsso}$$

GRÁFICO VI:- Função Linear dos probitos empíricos em relação aos logarítimos da dose, de camundongos fêmeas ovariectomizadas que receberam diferentes concentrações de Sialotoxina I.

CAPÍTULO IV

DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

Ao analisar os resultados referentes aos efeitos da Sialotoxina I verifica-se que, efetivamente, trata-se de uma substância que provoca tanto em camundongos machos, quanto em fêmeas, inúmeras manifestações biológicas, culminando com o efeito tóxico mais drástico que é a mortalidade dos animais utilizados neste trabalho.

Assim sendo, além das observações farmacológicas, procurou-se, através da análise de probitos, determinar a dose letal que atingisse a metade da população (DL_{50}) em camundongos fêmeas normais, machos normais, machos que receberam, previamente, estradiol; fêmeas que receberam, previamente, testosterona; machos castrados e fêmeas ovariectomizados.

Para tanto, foi necessário determinar-se primeiro a dose que provocasse 100% de mortalidade e em seguida diminuí-la até que a taxa de mortalidade apresentada seja igual a 0%.

O que pode ser facilmente observado é que os resultados referentes aos valores do Grupo I, mostram que as fêmeas

normais que receberam Sialotoxina I, apresentam uma DL_{50} de $1,05 \pm 0,06$ mg/kg de peso corporal, enquanto que os camundongos machos também normais, ou seja, sem nenhuma intervenção cirúrgica, revelam uma DL_{50} de $3,60 \pm 0,09$ mg/kg de peso, o que representa uma sensibilidade de 70,83% menor quando comparados com as fêmeas.

Do visto, pode-se depreender que as fêmeas normais necessitam, para alcançar a DL_{50} , de uma dose de Sialotoxina I bem menor que a do macho, mostrando uma grande variação de sensibilidade entre ambos, sendo a sensibilidade inversamente proporcional a dose.

Esse fato, poderia ser explicado pela especulação de que os camundongos machos adultos, durante a sua fase de desenvolvimento e crescimento tenham sido exposto ao fator tóxico letal em doses fisiológicas, e porisso, possivelmente, tenham atingido um certo grau de tolerância ou imunidade. Esses dados, encontram suporte pelas observações das manifestações biológicas e pela análise da inclinação da equação linear dos probitos dos grupos I e II (Gráficos I e II) e pela concentração de Sialotoxina I que induz a 100% de mortalidade, onde é necessário administrar-se uma dose de 147% mais concentrada no macho que na fêmea normal, respectivamente, 3,7 mg/kg para o macho e 1,5 mg/kg de peso corporal

para a fêmea.

Quanto as manifestações biológicas analisadas entre os grupos I e II verifica-se também a maior tolerância dos machos, onde as primeiras manifestações que surgem como, hiperexcitabilidade e apatia, aparecem nos machos numa concentração de 2,0 mg/kg de peso (Quadro II) enquanto que as fêmeas já apresentam esses efeitos, somados com a hipotonia e poliúria já na concentração de 0,5 mg/kg de peso corporal (Quadro I).

O aparecimento das outras manifestações é diretamente proporcional às doses, atingindo o máximo das manifestações como hiperexcitabilidade, apatia, festinação, hipotonia, piloereção, taquicardia, sudoração, cianose, medríase com exoftalmia, poliúria, epistôto da cauda, convulsões com contraturas e 100% de mortalidade na concentração de 147% maior para o macho do que para a fêmea.

Outro fator que poderia explicar a maior resistência dos camundongos machos seria a comprovação de que as glândulas submandibulares desses animais apresentam grânulos secretórios dos ductos granulosos duas vezes e meia maior que das fêmeas (JUNQUEIRA et alii, 1949).

Dados da literatura demonstram que os ductos granulosos das glândulas submandibulares representam uma rica

fonte produtora de diferentes proteínas biologicamente ativas (EKFORS et alii, 1967 e EKFORS et alii 1972a,b; COHEN, 1960, 1962, e 1972; SCHENKEIN, 1969, 1974 e 1977; MAYNER & ACKERMAN, 1963; ATTARDI et alii, 1965 e ATTARDI & SCHESINGER, 1967; ADLER & NARBAITZ, 1965; JONES, 1966 e JONES & ASHWOOD-SMITH, 1970; HOFFMAN et alii, 1976; GRESIK & BARKA, 1977 e 1978; HUTSON; EVANS; FOWLER, 1979; SMITH et alii, 1979; MURAKAMI; TANIGUCHI; BABA, 1982 e PHILLIP; SMITH; PATEL, 1984). Todas as enzimas ou fatores de crescimento descritos pelos pesquisadores citados, são mais evidentes no macho que nas fêmeas e isso se deve ao fato de serem andrógenos dependentes (ANGELETTI & ANGELETTI, 1967 e ANGELETTI & BRADSHAW, 1971; BYYNY et alii, 1974).

O parenquima da glândula submandibular de camundongos apresentam dimorfismo sexual caracterizado pela predominância dos ductos granulosos nas glândulas dos animais machos.

Inúmeras evidências demonstraram que esse dimorfismo está vinculado, principalmente, aos hormônios androgênicos (PASQUINI et alii, 1974; SCHWAB et alii, 1976; GRESIK & BARKA, 1977), e que os tubulos granulosos das glândulas submandibulares estão sob influência hormonal, particularmente dos hormônios sexuais masculinos (BOYKO & ZEBROWSKI, 1972).

Desse modo, tem sido sugerido que os componen-

tes tóxicos das glândulas submandibulares de camundongos machos são também localizados nos ductos granulosos e sua secreção junto a saliva é feita de maneira semelhante aos fatores de crescimento e enzimas proteolíticos (HATAKEYAMA et al, 1980).

Com o objetivo de estabelecer algumas eventuais relações hormonais e as ações da Sialotoxina I, foram administradas também diferentes concentrações dessa substância em animais machos que receberam estradiol numa concentração de 2,0 mg/kg de peso corporal durante 10 dias (Grupo III) LIN & HOSHINO, 1971) e camundongos fêmeas que receberam testosterona na mesma concentração durante o mesmo período.

A análise dos resultados revela que a ação do estradiol no macho foi a de aumentar sua sensibilidade à Sialotoxina I, pois a DL_{50} para o macho normal que era de $3,60 \pm 0,05$ mg passou para $1,45 \pm 0,11$ para os animais machos que receberam estradiol, o que representa uma sensibilidade de 248% menor (Gráfico III).

Quanto aos animais do Grupo IV, fêmeas previamente tratados com testosterona e que receberam Sialotoxina I, observa-se, nitidamente, a participação da testosterona em diminuir a sensibilidade desses animais (Gráfico IV). Isso é notado pela comparação dos resultados entre o Grupo I e Grupo IV, onde

tanto a DL_{50} , quanto a taxa que atinge 100% de mortalidade, que mostram valores respectivamente, de $1,05 \pm 0,06$ e $1,50$ mg/kg para o Grupo I e DL_{50} de $2,26 \pm 0,10$ e dose de $3,0$ mg/kg de pêso corporal para 100% de mortalidade para os animais do Grupo IV.

Portanto, as fêmeas que receberam testosterona passaram a ter um aumento de resistência à Sialotoxina I de 115% para a DL_{50} e 100% para a taxa de mortalidade.

Outros aspectos interessantes, quanto a participação do estradiol no Grupo II e de testosterona no Grupo IV podem ser caracterizados pelas manifestações biológicas (Quadros III e IV). Observa-se que os animais do Grupo III, já na concentração de $0,5$ mg/kg de pêso, apresentavam hiperexcitabilidade e apatia (Quadro III), fatos esses revelados nos camundongos machos normais somente com a dose de $2,0$ mg/kg, ou seja os animais machos previamente tratados com estradiol passaram a apresentar um comportamento semelhante aos animais fêmeas normais (Gráfico I).

Por outro lado, as fêmeas tratadas com testosterona revelaram que as concentrações de $0,5$ e $1,0$ mg não apresentaram sintomas ou manifestações biológicas, surgindo hiperexcitabilidade e apatia somente a partir da concentração de $1,5$ mg/kg de pêso corporal (Quadro IV), mostrando assim um aumento na sua resistência.

BURGUS et alii (1972) descreveram a sequência de aminoácidos de um peptídeo com a atividade de liberar o fator liberador dos hormônios luteinizantes e folículos estimulantes. Ainda não está bem esclarecido se este peptídeo é o único fator de liberação para ambos hormônios gonadotrópicos ou se ambos fatores serão isolados. Teoricamente, as concentrações de esteroides as quais estão expostas as células hipofisárias, secretoras de LH e FSH, poderiam determinar sua respectiva sensibilidade a um único fator liberador de LH ou de FSH.

Uma possível explicação para participação do estradiol seria a de inibir, através de retroalimentação de alça longa, o hipotálamo na liberação de fatores liberadores de hormônio luteinizante (LRF), que por sua vez limitaria a secreção do hormônio luteinizante pela hipófise, diminuindo o nível sérico desse hormônio, conseqüentemente diminuindo sua ação de transformar e estimular os fibroblastos das células de LEYDIG em células secretoras de testosterona (GARNIER et alii, 1974; JAYTEPPERMAN, 1977; GENDREL et alii, 1980).

Além disso, deve-se levar também em consideração a ação direta dos estrogênios, no qual o estradiol é o paradigma do grupo de esteroides, aos quais corresponde o modelo de receptor móvel. Assim, há muito tempo, com base nas evidências

anatômicas e histológicas, sabe-se que os estrogênios estimulam seletivamente a síntese proteica em órgão alvo, promovendo aumento de RNA, proteínas e DNA em tecidos estimulados por estrógenos.

KARLSON (1963) verificou que os cromossomos gigantes, existentes nas células da glândula salivar das larvas de certos insetos, mostravam-se entumescidos após injeção de pequenas quantidades de um hormônio esteroide, a ecdisona.

BALDI & CHARREAU (1972) demonstraram que as glândulas submandibulares de ratos apresentam enzimas responsáveis pela conversão da testosterona.

Outros autores, tem procurado demonstrar, a presença da testosterona salivar, determinando a sua concentração (LANDMAN et alii, 1976) e a sua correlação inversa com o fluido do fluxo de Parótida (KATZ & SHANNON, 1969) que pode alterar a concentração da mesma, ou seja quanto mais fluída for a saliva, menor seria a concentração da testosterona salivar, tornando-se difícil uma avaliação exata da sua concentração devido as alterações circadianas.

Recentemente, CHO et alii (1985) descreveram que o aumento transitório dos testículos e a sua correlação com a testosterona salivar, em meninos, se deve ao fato dos testícu-

los representarem a principal origem dos andr6genos. A ocorr6ncia de um curto e violento crescimento e o aumento r6pido da testosterona salivar demonstram a estreita rela76o entre o crescimento da altura do corpo e a testosterona em garotos.

No que concerne dos efeitos da Sialotoxina I em machos castrados (Grupo V) observa-se que a aus6ncia dos test6culos, maior fonte geradora da testosterona, promove maior sensibilidade, apresentando uma DL_{50} de $2,32 \pm 0,06$ mg/kg de p6so corporal, que corresponde a uma concentra76o de 35,5% menor que a do macho normal.

Da mesma forma, atingiu-se uma taxa de 100% de mortalidade com uma concentra76o de 27,9% menor que os animais do Grupo II.

Quanto as manifesta76oes biol6gicas (Quadro V) verifica-se que os machos orquidectomizados na concentra76o de 0,5 mg/kg de p6so j6 apresentaram os sintomas de hiperexcitabilidade e apatia, caracter6sticas semelhantes 6s f6meas normais, enquanto que o mesmo comportamento nos machos normais s6 apareceram na concentra76o de 2,0 mg/kg de p6so.

Os animais do Grupo V n6o atingiram os mesmos 6ndices da DL_{50} das f6meas normais, possivelmente devido a pequena taxa de andr6geno remanescente produzido pelas c6lulas da zona

reticular da cortex da supra renal, ou ainda pela ação imunológica restante de sua fase de desenvolvimento antes da castração, que teria assim uma ação protetora.

Essas afirmativas, encontram suporte nas observações de ANGELETTI & BRADSHAW, (1971) e BYYNY et alii, (1974) onde verificaram que as enzimas e fatores de crescimento são mais evidentes nos machos devido a sua indução por andrógenos.

Ainda deve ser lembrado o fato da castração, que após 30 dias, além de promover uma excepcional queda na testosterona circulante, leva a uma subsequente atrofia dos ductos granulosos, fonte produtora de inúmeros fatores biologicamente ativos (TAMES; FAVA DE MORAES; DOINE, 1985).

Recentemente, BLIDLINGMAIER et alii, (1983); MULLER & SKAKKEBAEK, (1984) e CHO et alii, (1985) trabalhando em crianças recém-nascidos e na fase puberal, demonstraram uma correlação entre a participação dos testículos e a produção de testosterona salivar. Com as alterações dos ductos granulosos em animais castrados seria interessante associar até que ponto as alterações de uma modulação histo-funcional poderia ter efeito nas variações da sensibilidade à Sialotoxina I.

Assim, o aumento da susceptibilidade à Sialotoxina I em camundongos machos castrados, em comparação com os ma-

chos normais, reafirmam as evidências de tratar-se de um peptídeo andrógênio dependente.

Essas observações recebem forte apoio ao analisar-se os dados dos animais pertencentes ao Grupo VI, fêmeas ovariectomizadas, cuja DL_{50} foi de $0,97 \pm 0,07$ mg/kg de peso corporal com uma concentração de 1,50 mg/kg de peso para atingir-se a taxa de 100% de mortalidade (Tabela VI, Quadro e Gráfico VI), dados e comportamentos biológicos semelhantes as fêmeas normais que receberam Sialotoxina I.

O presente estudo confirma ação letal de um peptídeo produzido pelas glândulas submandibulares de camundongos machos (Sialotoxina I), cuja DL_{50} e taxa de 100% de mortalidade são variáveis com o sexo, com os níveis hormonais de estradiol e testosterona, mostrando haver uma interação entre os efeitos biológicos e os referidos hormônios.

Esses resultados são concordantes com aqueles encontrados por HOSHINO & LIN (1968 e 1969) quando descreveram o efeito letal das glândulas submandibulares transplantadas em camundongos hospedeiros; bem como as assertivas de LIN & HOSHINO (1969a,b) que mostraram, através de isoenxertos de glândulas submandibulares em camundongos, que o fator letal é testosterona dependente.

As observações verificadas no presente trabalho coincidem também com aquelas citadas por LIUZZI & ANGELETTI (1968) onde demonstraram que o extrato de glândulas submandibulares de camundongos adultos contém proteínas básicas com efeito tóxico mais acentuado nas fêmeas, embora os efeitos da Sialotoxina I tenham revelado uma toxicidade de 30 vezes maior.

Quanto a DL_{50} encontrada para a Sialotoxina I em todos os grupos experimentais demonstrou ter ações mais potentes, portanto necessitando de concentração menores que aquelas encontradas por HIRAMATSU; HATAKEYAMA; MINAMI (1980) e HATAKEYAMA; HIRAMATSU; MINAMI (1981) quando determinaram a dose letal de uma enzima semelhante a calicreína encontrada na saliva de glândulas submandibulares de camundongos induzida por fenilefrina e controlada por receptores alfa adrenérgicos.

Do exposto depreende-se que há necessidade de uma melhor caracterização bioquímica desses peptídeos, determinação da DL_{50} das Sialotoxinas II, III e IV, o que facilitará o esclarecimento do seu modo de ação bem como suas reais funções fisiológicas.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

As condições experimentais utilizadas, a análise e a discussão dos resultados substanciados neste estudo, subsidiam as seguintes conclusões:

- 1 - A Sialotoxina I promove, efetivamente, a morte de camundongos machos e fêmeas;
- 2 - Existe diferença na DL_{50} da Sialotoxina I, entre camundongos machos e fêmeas normais, sendo as fêmeas muito mais sensíveis que os machos, cuja DL_{50} é respectivamente de $1,05 \pm 0,06$ mg/kg de peso para as fêmeas e de $3,6 \pm 0,09$ mg/kg de peso, para os machos;
- 3 - A administração de estradiol nos camundongos machos aumenta a sua sensibilidade à Sialotoxina I, mostrando uma DL_{50} significativamente menor que a dos machos normais, $DL_{50} = 1,45 \pm 0,11$ mg/kg de peso corporal;
- 4 - A testosterona protege, parcialmente, às fêmeas, diminuindo a sua sensibilidade, indicando, portanto, uma DL_{50} significativamente maior que as fêmeas normais, $DL_{50} = 2,26 \pm 0,10$ mg/kg de peso corporal;

- 5 - Os camundongos machos castrados apresentam maior sensibilidade à Sialotoxina I, com uma DL_{50} , significativamente, menor que a dos machos, $DL_{50} = 2,32 \pm 0,06$ mg/kg de peso corporal;
- 6 - Entre fêmeas ovariectomizadas e fêmeas normais não ocorrem diferenças significantes, tanto nas manifestações biológicas, quando na DL_{50} cujo valor é $DL_{50} = 0,97 \pm 0,07$ mg/kg de peso corporal.

C A P Í T U L O VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADLER, R. & NARBAITZ, R. Action of rat submaxillary glands extracts on neural tube growth in organ culture. J. Embryol.exp.Morph., 14: 281, 1965.
2. AFONSKY, D. Effects of desalivation in reproduction. J. dent.Res., 37(5): 965, 1958.
3. ANGELETTI, P.V. & ANGELETTI, R.H. Androgen-dependent esterase activity in the mouse submaxillary gland. Biochim.biophys.Acta, 136: 187, 1967.
4. _____ & BRADSHAW, R.A. Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence. Proc.Natn.Acad.Sci.U.S.A., 68: 2417, 1971.
5. _____; SALVI, M.L.; CAPANI, F.; FRATO, L. Granulocytosis-inducing factor from the mouse submaxillary gland. Biochim.biophys.Acta, 111: 344-6, 1965.

6. ARCIERI, R.M. & MARTINELLI, C. Influence of salivary glands extirpation on procreation in rats. Tohoku J.exp. Med., 121: 105-10, 1977.
7. 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) - Inst.Biologia - Unicamp].
8. ATTARDI, D.G. & SCHESINGER, R. Submaxillary gland of mouse; properties of a purified protein affecting muscle in vitro. Science, 157: 1253-5, 1967.
9. _____; LEVI-MONTALCINI, R.; WENGER, B.S.; ANGELETTI, B. S. Submaxillary gland of mouse. Effects of a fraction on tissues of mesodermal origin in vitro. Science, 150: 1307-9, 1965.
10. BALDI, A. & CHARREAU, E.H. 17-beta-hidroxy steroid dehydrogenase activity rat submaxillary glands. Its relation to sex and age. Endocrinology, 90(6): 1643-6, 1972.
11. BANKS, B.E.C. & WALTER, S.J. Protein fractions from mouse

- salivary glands affecting epithelial cells in organ culture. J.Physiol., 234: 241, 1973.
12. BARKA, T. Partial purification of a mitotic suppressor from the salivary gland. Expl.molec.Path., 18: 225-33, 1973.
13. BIXLER, D.; MUHLER, J.C.; SHAFER, W.G. The effects of castration, sex hormones and desalivation on dental caries in the rat. J.dent.Res., 34(6): 889-94, 1955.
14. BLIDLINGMAIER, F.; DÖRR, H.G.; EISENMENGER, W.; KUHNLE, U.; KNORR, D. Testosterone and androstenedione concentrations in human testis and epididymis during the first two years of life. J.clin.Endocr.Metab., 57: 311-5, 1983.
15. BOYKO, J. & ZEBROWSKI, E.J. Influence of age, ovariectomy and submandibular-sublingual Sialoadenectomy on submandibular gland metabolism in sexually mature and immature female rats. Archs oral Biol., 17: 1021-8, 1972.
16. BUEKER, E.D. & SCHENKEL, I. Effects of daily subcutaneous injections of nerve growth stimulating protein fractions

- on mice during postnatal to adult stage. Ann.N.Y. Acad. Sci., 118: 183, 1964.
17. BUEKER, E.D. & SCHENKEIN, I. Sexual dimorphism of mouse submaxillary glands and its relationship to nerve growth stimulating protein. Proc.Soc.exp.Biol.Med., 118: 204, 1964.
18. BURGUS, R.; BUTCHER, M.; AMOSS, M.; LING, N.; MONAHAN, M.; RIVIER, J.; FELLOWS, R.; BLACKWELL, R.; VALE, W.; GUILLEMIN, R. Primary structure of the ovine releasing factor (LRF). Proc.Natn.Acad.Sci.U.S.A., 69: 278, 1972.
19. BYYNY, R.L.; ORTH, D.N.; COHEN, S. Radioimmunoassay of epidermal growth factor. Endocrinology, 90: 1261, 1972.
20. _____; _____; _____; DOYNE, E.S. Epidermal growth factor: effects of androgens and adrenergic agents. Endocrinology, 95: 776, 1974.
21. CARAMIA, F. Ultrastructure of mouse submaxillary gland I. Sexual differences. J.Ultrastruct.Res., 16: 505-23, 1966.
22. CHO, H.; SANAYAMA, K.; SASAKI, N.; NAKAJIMA, H. Salivary

- testosterone concentration and testicular volume in male infants. Endocr.jap., 32(1): 135-40, 1985.
23. COHEN, S. Purification of a nerve growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neuro-cytotoxic antiserum. Proc.Natn.Acad.Sci.U.S.A., 46: 302, 1960.
24. _____. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new born animal. J.Biol.Chem., 237: 1555, 1962.
25. _____. Epidermal growth factor. J.invest.Derm., 59: 13, 1972.
26. _____ & LEVI-MONTALCINI, R. A nerve growth stimulating factor isolated from snake venom. Proc.Natn.Acad.Sci.U.S.A., 42: 571, 1956.
27. DELANGE, 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.
28. DOTTAVIANO, E.J.; RAMALHO, A.C.; NEGREIROS DE PAIVA, C.E.

Glândulas salivares e reprodução estudo preliminar. Reu-
nion de la Asociacón Latinoamericana de Investigaciones
en reproducción humana, VI.(Ailin) Lima, 1974.

29. EKFOR, T.O. & HOPUSU-HAVU, V.K. Properties of the estero-
peptidase purified from the mouse submandibular gland.
Enzymologia, 43: 177, 1972b.
30. _____; CHANG, W.W.L.; BRESSLER, R.S.; BARKA, T. Isopro-
terenol accelerates the postnatal differentiation of
rat submandibular gland. Devl Biol., 29: 38, 1972a.
31. _____; RIEKKINEN, P.J.; MALMIHARJU, T.; HOPUSU-HAVU, V.K.
Four izozymic forms of a peptidase resembling kallikre
in purified from therat submandibular gland. Hoppe-Sey-
lers Z.physiol.Chem., 348: 111, 1967.
32. FAVA DE MORAES, F.; ZANGHERI, E.O.; DOINE, A.L. Immunohis-
tochemical localization of eritropoietin in the rat and
mouse submandibular gland. Histochem.J., 11: 97, 1979.
33. FINNEY, D.J. Statistical methods in biological assay. Lon-
don, Griffin, 1964.

34. GARNIER, P.E.; CHAUSSAIN, E.J.L.; BINET, A.; SCHLUMBERGER, JOB, J.C. Effect of synthetic luteinizing hormone-releasing hormones release of gonadotropins in children and adolescents: relations to age, sex and puberty. Acta Endocr., 77: 422-34, 1974.
35. GENDREL, D.; CHAUSSAIN, J.L.; ROGER, M.; JOB, J.C. Simultaneous postnatal rise of plasma LH and testosterone in male infants. J.Pediatr., 97: 600-2, 1980.
36. GINN, J.T. & VOLKER, J.F. Rustings indesalivated albino rats. Endocrinology, 31: 282-3, 1942.
37. GRESIK, E. & BARKA, T. Immunocytochemical localization of epidermal growth factor in mouse submandibular gland. J.Histochem.Cytochem., 25: 1027-35, 1977.
38. _____ & _____. Immunocytochemical localization of epidermal growth factor in the developing submandibular gland of the mouse. Am.J.Anat., 151: 1, 1978.
39. HATAKEYAMA; K.; HIRAMATSU, M.; MINAMI, N. Lethal factor in the male mouse submandibular gland. Can.J.Physiol.Pharm.

mac., 59: 1134-8, 1981.

40. HILTON, S.M. The physiologic role of glandular kallikreins. In Bradykinin, Kallidin and Kallikrein. In: ERDOS, E.G. Handbook of Experimental Pharmacology, 25: 389, 1970.
41. HIRAMATSU, M.; HATAKEYAMA, K.; MINAMI, N. Male mouse submaxillary gland secretes highly toxic proteins. Experientia, 36: 940-2, 1980.
42. HOFFMAN, A.; Mc AUSLAN, B.; ROBERTSON, D.; BURNETT, E. An endothelial growth-stimulating factor from salivary glands. Expl.Cell Res., 102: 269. 1976.
43. HOSHINO, K. & LIN, C.O. Transplantability of salivary of mice and its lethal effects on the host. Anat.Rec., 160: 474. 1968.
44. _____ & _____. Lethal factor released from submandibular grafts in mice. Can.J.Physiol.Pharmac., 47: 329, 1969.
45. HUANG, J.C.C.; HOSHINO, K.; KLIN, Y.T.; CHEBIB, F.S. Species and strain differences in the lethal factor of the mouse

- submandibular gland. Can.J.Physiol.Pharmac., 55: 1107-11, 1977.
46. HUTSON, J.M.; EVANS, D.; FOWLER, R. Effect of salivary glands on wound contraction in mice. Nature, 279: 793, 1979.
47. ITO, Y. Biochemical studies on salivary gland hormone. Endocr.jap., 1: 1, 1954.
48. _____. Parotin: A salivary gland hormone. Ann.N.Y.Acad.Sci., 85: 228-310, 1960.
49. JAY TEPPERMAN, M.D. Fisiologia endócrina e metabólica. 3 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1977.
50. JOHNSON, G.; KEKEH, J.; YAPI, M. Sur l'activité endocrine des glandes salivares sous-maxillaires sensu stricto de la souris. Annls Endocr., 31: 573-7, 1970.
51. JONES, R.O. The in vitro effect of epithelial growth factor on rat organ cultures. Expl.Cell Res., 43: 645, 1966.

52. JONES, R.O. & ASHWOOD-SMITH, M.J. Some preliminary observations on the biochemical and biological properties of an epithelial growth factor. Expl. Cell Res., 59: 161, 1970.
53. 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: 129-58, 1949.
54. KARLSON, P. New concepts on the mode of action of hormones. Perspect. Biol. Med., 6: 203, 1963.
55. KATAGIRI, S. & HIGASHITO, T. Histologische studien uber die einflusse der speicheldresen - eistirpation auf die wirkung des geschlechtshormones. Trans. Soc. Path. jap., 30: 252-60, 1940.
56. KATZ, F.H. & SHANNON, I.L. Parotid fluid cortizol and cortisone. J. clin. Invest., 48: 848-57, 1969.
57. LACASSANE, A. Dimorfnisme sexual de la gland sous-maxillai-re chez la souris. C.r. Soc. Biol., 133: 180-1, 1940.

58. LANDMAN, A.D.; SANFORD, L.M.; HOWLAND, C.B.E.; DAWES, A.; PRITCHARD, T. Testosterone in human saliva. Experimenti a, 32: 940-1, 1976.
59. LAWRENCE, A.M.; TAN, S.; HOJVAT, S.; KIRSTEINS, L. Salivary gland hiperglicemic factor: An extrapancreatic source of glucagon - like material. Science, 195: 70-2, 1977.
60. LEVI-MONTALCINI, R. & BOOKER, B. Excessive growth of the sympathetic ganglia evoked by a protein isolated from mouse salivary glands. Proc.Natn.Acad.Sci.U.S.A., 46: 373, 1960.
61. LIN, C.D. & HOSHINO, K. Hemorrhagic phernomena caused in the host mice by submandibular gland isografs from males. Proc.Can.Fed.Biol.Soc., 12: 8, 1969.
62. _____ & _____. Testosterona dependency of the lethal factor in mouse submandibular gland isografts. Can.J. Physiol.Pharmac., 47: 335, 1969.
63. _____ & _____. Strain differences in the lethal fac-

- tor exerted by submandibular glands transplanted from male mice. Experientia, 26: 753, 1970.
64. LIN, C.D. & HOSHINO, K. Testosterone protection against the lethal factor in grafts of mouse submandibular gland. Toxicicon, 9: 299-300, 1971.
65. LISKE, R. & REBER, K. Nonsuppressible insulin-like activity rat organ as detected by fluorescent antibody and radioimmunoassay techniques. Horm.Res., 7: 214, 1976.
66. LOURIDES, O.; THEODOSSIOU, A.; BAZOPOULOU KIRKANIDAE, E.; DEMETRIOU, N. Total sialoadenectomy effect on the uterus and ovaries of the albino rat. Odontiatrîke, 5: 258-60, 1970.
67. LUIZZI, A. & ANGELETTI, P.V. Studies on the toxic effects of mouse submaxillary gland extracts. Experientia, 24: 1034, 1968.
68. MAYNER, D.A. & ACKERMAN, G.A. Tissue localization of ribonuclease activity by the substrate film technique. J.Histochem.Cytochem., 11: 573, 1963.

69. MULLER, J.C. & SKAKKEBAEK, N.E. Fluctuations of the number of germ cells during late foetal and early postnatal periods in boys. Acta endocr., 105: 271-4, 1984.
70. MURAKAMI, K.; TANIGUCHI, H.; BABA, S. Presence of insulin-like immunore - activity and its biosynthesis in rat human parotid gland. Diabetologia, 22: 358-61, 1982.
71. OGATA, A.; ITO, Y.; OKABE, S. Studies on the salivary gland hormones. Reports I-XII. J.pharm.Soc.Japan, 64: 79-88, 114-26, 146-53, 325-40, 1944; ibid, 65: 9-13, 1945. Apud Ogata, T., op.cit.ref. 72.
72. OGATA, T. The internal secretion of salivary glands. Endocr.jap., 2: 247-61, 1955.
73. PASQUINI, F.A.; PETRIS, G.; SBARAGLIA, G.; SCOPELLITI, G.; CENCIANO, G.; FRATI, F. Biological activities in the granules isolated from the mouse submaxillary gland. Expl.Cell Res., 86: 223-36, 1974.
74. PHILLIP, H.; SMITH; PATEL, D.G. Immunochemical studies of the insulin-like material in the parotid gland of rats.

Diabetes, 33, July 1984.

75. PINHEIRO, C.E. Caracterização química e biológica das Sialo toxinas. Simpósio Anual da Academia de Ciências do Estado de São Paulo, X. Resumos. São Paulo, 1985. p. 17.
76. SCHENKEIN, I.; LEVI, M.; BUEKER, E.D.; WILSON, J.D. Immunological and enzymatic evidence for the absence of an estero proteolytic enzyme, protease D, in the submandibular gland of the mouse. Endocrinology, 94: 840, 1974.
77. _____; _____; FRANKLIN, E.C.; FRANGIONE, B. Proteolytic enzymes from the mouse submaxillary gland. Archs Biochem.Biophys., 182: 64, 1977.
78. _____; BOESMAN, M.; TOKARSKY, E.; FISHMAN, L.; LEVY, M. Proteases from mouse submaxillary gland. Biochem. Biophys. Res. Commun., 36: 156, 1969.
79. SCHWAB, M.E.; STOCKEL, K.; THOENEN, H. Immunocytochemical localization of nerve growth factor (NGF) in the submandibular gland of adult mice by light and electron microscopy. Cell Tissue Res., 169: 289-99, 1976.

80. SHACKLEFOR, J.M. & WILBORN, W.H. Structural and histochemical diversity in mammalian salivary glands. Ala. J. Med. Sci., 5: 180-203, 1968.
81. SHEAR, M.; CHRISTENSEN, L.V.; HARALAMBOUS, M.; BARBAKOW, F. Changes in amylase activity in submandibular salivary glands of puberal male mice following, castration. Archs oral Biol., 24: 185, 1979.
82. SHERIDAN, J.W. & STANLEY, E.R. Tissue sources of bone marrow colony stimulating factor. J. cell Physiol., 78: 451, 1971.
83. 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: 1561-71, 1972.
84. SMITH, S.; MAZUR, A.; VOYLES, N.; BHATHENA, S.; RECANT, L. Is submaxillary gland immunoreactive glucagon important in carbohydrate homeostasis. Metabolism, 28: 343, 1979.
85. SREEBNEY, L.M. Studies of salivary gland proteases. Ann. N.

Y.Acad.Sci., 85: 182, 1960.

86. SREEBNY, L.M.; MEYER, J.; BACHEM, E.; WEINMANN, J.P. Postnatal changes in proteolytic activity and in the morphology of the submaxillary gland in male and female albino rats. Growth, 19: 57, 1955.
87. SUDDICK, R.P. Effect of salivariadenectomy and administration of salivary gland homogenates upon the reproductive organs of the female rats. J.dent.Res., 30(3): 554-71, 1960.
88. SWIGART, R.H.; HILTON, F.K.; DICKIE, M.M.; FOSTER, B.J. Effect of gonadal hormones on submandibular gland amilase activity in male and female (57 BL 16) mice. Endocrinology, 76: 776, 1965.
89. TAMES, D.R.; FAVA DE MORAES, F.; DOINE, A.I. Efeito da castração na modulação histo-funcional dos ductos granulosos da glândula submandibular do camundongo. Simpósio Anual da Academia de Ciências do Estado de São Paulo, X. Resumos. São Paulo, 1985. p. 15.

90. TURRIAN, H. Quelques caracteristiques du principe hypertensif contenu dans les glandes salivaires de la souris. Helv.phys.Acta, 18: 259, 1960.
91. WERLE, E. & RODEN, P. Ueber das vorkommen von kalikrein in der spercheldruesen und in munds perchel. Biochemie, 286: 213, 1936.
92. _____; VOGEL, R.; GOLDEL, L.F. Ueber ein blutdrucksteigerndes prinzip in extrakten aus der glandula submaxillaris der weissen maus. Arch exp.Path.Pharmak., 230: 236, 1957.
93. ZANGHERI, E.O.; FAVA-DE-MORAES, F.; LOPEZ, O.I.; MARIAS, I. The role of submandibular glands on extrarenal erythropoietin production. Experientia, 29: 706, 1973.

C A P Í T U L O V I I

R E S U M O

7. RESUMO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de determinar-se, através da análise de probitos, a DL_{50} da Sialotoxina I e avaliar as suas eventuais manifestações biológicas em camundongos fêmeas normais, machos normais, machos com administração de estradiol, fêmeas com administração de testosterona, machos castrados e fêmeas ovariectomizadas.

Foram utilizados 470 camundongos (Mus Musculus albinus), sendo 260 machos e 210 fêmeas, com 30 a 45 dias de idade, pesando entre 25 e 35 gramas no início do experimento.

Os animais foram distribuídos, casualmente, da seguinte forma:

GRUPO I - Fêmeas Normais - constituído de 60 animais, redistribuídos em 6 subgrupos de 10 camundongos cada, nos quais foram administrados Sialotoxina I, via IP nas concentrações de: 0,5; 0,75; 1,0; 1,3; 1,4 e 1,5 mg/kg de peso corporal.

GRUPO II - Machos Normais - formado por 100 machos, redistribuídos em 10 subgrupos de 10 camundongos. Cada

subgrupo recebeu, via IP, Sialotoxina I nas concentrações: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 3,6 e 3,7 mg/kg de peso, respectivamente.

GRUPO III - Machos + Estradiol + Sialotoxina I - formado por 80 camundongos machos, redistribuídos em 8 subgrupos de 10 animais cada. Esses animais receberam hormônio estradiol, via IP, na concentração de 2,0 mg/kg de peso diariamente, durante 10 dias. Em seguida foi administrado, pela mesma via Sialotoxina I nas concentrações de: 0,5; 1,0; 1,3; 1,5; 1,7; 2,0; 2,3 e 2,5 mg/kg de peso corporal.

GRUPO IV - Fêmeas + Testosterona + Sialotoxina I - composto por 90 camundongos fêmeas, redistribuídos em 9 subgrupos de 10 camundongos cada. Esses animais receberam, previamente, tratamento com hormônio testosterona, via IP na concentração de 2,0 mg/kg de peso, durante 10 dias. A seguir foi administrado Sialotoxina I nas concentrações de: 0,5; 1,0; 1,5; 1,8; 2,0; 2,3; 2,5; 2,8 e 3,0 mg/kg de peso corporal.

GRUPO V - Machos Orquidectomizados + Sialotoxina I - constituído de 80 machos, redistribuídos em 8 subgrupos iguais, os quais foram submetidos à castração. Após um pós-operatório de 30 dias administrou-se concentrações de Sialotoxina I: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,2; 2,4; 2,5 e 2,6 mg/kg de peso corporal.

GRUPO VI - Fêmeas Ovariectomizadas + Sialotoxi
na I - composto de 60 fêmeas, redistribuídos em 6 subgrupos i-
guais, os quais foram submetidos à retirada dos ovários. Após 30
dias da cirurgia, os animais receberam, via IP, Sialotoxina I nas
concentrações de: 0,5; 0,75; 1,0; 1,3; 1,4 e 1,5 mg/kg de peso
corporal.

A análise dos efeitos da Sialotoxina I quanto
as alterações biológicas e a determinação da taxa de mortalidade
foram feitas, baseadas no período de 24,0 horas.

Nas condições experimentais utilizadas com a
metodologia empregada, concluiu-se que o peptídeo produzido pelas
glândulas submandibulares de camundongos machos, separado por
gel de acrilamida, denominado Sialotoxina I promove, efetivamente
a morte de camundongos machos, e fêmeas. Existem diferenças de
reações biológicas e na DL_{50} da Sialotoxina I, entre machos e fê-
meas normais, mostrando ser as fêmeas muito mais sensíveis que os
machos.

A administração de estradiol nos camundongos
machos aumenta a sua sensibilidade à Sialotoxina I, revelando
uma DL_{50} significativamente menor que a dos machos normais.

A testosterona protege, parcialmente, às fê-
meas, diminuindo a sua sensibilidade, indicando uma DL_{50} signifi-

cantemente maior que as fêmeas normais e chegando aos níveis dos machos castrados, oferecendo o suporte de que a Sialotoxina I é também andrôgeno-dependente.

Os camundongos machos castrados apresentam maior sensibilidade à Sialotoxina I, com uma DL_{50} significativamente menor que a dos machos normais.

As fêmeas ovariectomizadas apresentam, tanto a DL_{50} , quanto as manifestações biológicas semelhantes às das fêmeas normais.