

ANA LÚCIA BOURREAU LONGHINI

Este exemplar foi devidamente corrigido conforme
resolução CCPG/036/83

Piracicaba, 11 de Fevereiro de 1992



DETERMINAÇÃO DA DL-50 DA SIALOTOXINA III
SUAS MANIFESTAÇÕES BIOLÓGICAS E SUA INTE
RAÇÃO COM A TESTOSTERONA EM CAMUNDONGOS

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da U-
niversidade Estadual de Campi-
nas, para obtenção do grau de
Mestre em Ciências - Área de Fi-
siologia e Biofísica do Sistema
Estomatognático.

P I R A C I C A B A

* 1 9 9 1 *

À Professora Doutora Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga, Professora Assistente Doutora junto ao Departamento de Ciências Fisiológicas, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela participação constante, amizade, incentivo e paciência na orientação deste trabalho.

Ao Professor Doutor Décio Teixeira, Coordenador do Curso de Pós-Graduação de Fisiologia e Biofísica do Sistema Estomatognático da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pelo seu empenho em fazer este curso e deste curso mais um avanço científico à medida em que proporcionou um trabalho sério, além da compreensão, confiança e apoio aos seus integrantes.

Aos meus pais, responsáveis pela minha formação, por seus esforços, pelo empenho depositado no meu desenvolvimento, pela dedicação constante, o mais sincero agradecimento.

Ao Wolney, a quem dedico este trabalho, pela compreensão, apoio e presença constante em todas as etapas das minhas experiências e realizações.

Ao meu filho, Alan, por fazer parte de tudo o que realmente importa.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Renato Roberto Biral, Digníssimo Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelo 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 colaboração no fornecimento da Fração III de Sialotoxina permitindo a execução desse trabalho.

Ao Professor Doutor Alcides Guimarães, Professor Titular da Disciplina de Fisiologia e Biofísica do Departamento de Ciências Fisiológicas, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela amizade, atenção sempre presente e disponibilidade em ajudar sempre.

Ao Professor Doutor João Leonel José, Professor Livre Docente do Departamento de Ciências Fisiológicas, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela amizade e colaboração no decorrer de todo o curso e execução do trabalho.

Ao Professor Doutor Moustafa Mohammed El Guindy, Professor Titular da Disciplina de Bioquímica do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp, pela amizade, pela atenção e compreensão dispensadas constantemente no decorrer de todo o período de realizada

ção desse trabalho.

Ao Professor Doutor Roberto Simionato de Moraes, Professor As sistente DOutor do Departamento de Matemática e Estatística da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" pela programação e orientação estatística.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, Sr. Carlos Alberto Aparecido Feliciano, pela inestimável ajuda em toda etapa experimental deste trabalho e Sra. Shirley Rosana Sbravatti Moreto, pela atenção e solicitude em todos os aspectos burocráticos.

À todos aqueles que direta ou indiretamente possibilitaram a execução dessa pesquisa.

C O N T E N D O

Capítulo I	pág.
1. INTRODUÇÃO.....	07
1.1. Glândulas Salivares e Seus Fatores Ativos.....	07
1.2. Glândulas Salivares e Gônadas.....	13
1.3. Glândulas Salivares e Seus Fatores Tóxicos.....	18
1.4. Proposição.....	23
 Capítulo II	
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
2.1. Distribuição dos Grupos.....	24
2.2. Tratamento Estatístico.....	28
 Capítulo III	
3. RESULTADOS.....	34
 Capítulo IV	
4. DISCUSSÃO.....	42
 Capítulo V	
5. CONCLUSÕES.....	52
 Capítulo VI	
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
 Capítulo VII	
7. RESUMO.....	66

1. INTRODUÇÃO

1.1. Glândulas Salivares e Seus Fatores Ativos

São inúmeras as pesquisas que têm demonstrado a importância das glândulas salivares, no que diz respeito a suas atividades exócrinas ou endócrinas, como também a participação destas na atividade metabólica de diversos órgãos. Como exemplo tem-se demonstrado a interrelação entre as glândulas salivares o pâncreas, e o metabolismo de carboidratos.

Assim, trabalhos como os de TAKIZAWA(1954) e OGATA(1955) enfatizaram que a ausência das glândulas parótidas e submandibulares induzia a hiperplasia das células beta pancreáticas, relacionando essas glândulas com o metabolismo glicídico.

OGATA et alii(1944 e 1945) e ITO(1954) notaram que ocorria crescimento de tecidos duros e, concomitante, diminuição de cálcio circulante, quando se injetava frações de glândulas parótidas bovinas em coelhos; a partir de uma destas frações foi obtida uma substância proteica que recebeu o nome de "Parotín".

ITO(1960) conferiu ao Parotín funções importantes como a de estimular a proliferação de cartilagens, promover o desenvolvimento de fibras elásticas e tecido conjuntivo, estimular o sistema retículo endotelial e os ór-

gãos hematopoéticos.

Paralelamente a esses estudos, são citados por HILL(1955) o fator hiperglicemiante das glândulas parótidas bovinas, por HALMOS e SOMOGYI(1962) o sinergismo pâncreas/glândulas salivares que mostrou que na hipofunção das ilhotas de Langerhans ocorria uma hipertrofia glandular compensatória.

COHEN(1960) isolou, das glândulas submandibulares de camundongos, um fator de crescimento nervoso (NGF), que estimula o crescimento e a diferenciação de células nervosas sensitivas e simpáticas. Esse mesmo autor, em 1962, isolou das glândulas submandibulares de ratos, um polipeptídeo, fator de crescimento epidermal (EGF), que acelera a erupção dos incisivos de ratos recém-nascidos.

Essa descoberta marcou época na história das glândulas salivares, chamando a atenção de numerosos estudiosos, de forma que em poucas décadas, muitos outros fatores foram isolados das mesmas, a maioria deles provenientes de glândulas submandibulares de camundongos machos. Entretanto, muitos desses fatores ocorrem também nas glândulas submandibulares de outras espécies.

Muitos trabalhos têm sido realizados no sentido de se determinar as características químicas e biológicas dos polipeptídeos biologicamente ativos isolados de glândulas salivares, bem como a sua localização, síntese e seu possível papel fisiológico.

Estes fatores têm sido agrupados em diferentes

categorias: os que atuam sobre o crescimento e a diferenciação, e os relacionados com a homeostase, com a regulação intracelular e com a digestão.

O "Fator de Crescimento Nervoso" é um dos mais estudados fatores de crescimento de origem da glândula submandibular.

Duas formas já foram isoladas: "NGF" (2,555) e "NGF" (0,755), e um terceiro tipo parece ser secretado por células normais e neoplásicas em cultura (YONG et alii, 1975).

O "Fator de Crescimento Epidermal" tem recebido grande atenção dos pesquisadores, principalmente por estar relacionado com o controle da replicação de células neoplásicas, como, também, é considerado de grande importância na participação do sistema mediador-receptor para hormônios peptídeos (CARPENTER e COHEN, 1979).

BYINY, ORTH e COHEN(1972) verificaram um aumento na concentração do Fator de Crescimento Epidermal após a puberdade. O "EGF" também foi detectado em outros tecidos incluindo rins, estômago, pâncreas e intestino e intestino delgado (FRATTI et alii, 1976).

Foi verificado 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 quando comparada à encontrada na glândula submandibular (KHASHIMATA, HIRAMATSU e MINAMI, 1987).

KASAYAMA et alii(1989) observaram que a síntese do "EGF" na glândula submandibular de camundongos é regulada por alteração do nível de mRNA desse fator e por hormô

nios da tireóide e androgênicos, e que, o aumento da concentração plasmática do "EGF" está submetido apenas à influência dos hormônios androgênicos, não tendo os hormônios tireoidianos papéis relevantes.

MARTI, BURWEN e JONES (1989), demonstraram que o "EGF" em roedores, modula a secreção ácida de células parietais do estômago, tendo também uma participação importante na cicatrização de feridas e pode ser um dos fatores envolvidos na regeneração hepática após cirurgia ou lesão química.

LAWRENCE et alii (1975) isolaram um fator hiperglicemiante das glândulas submandibulares de camundongos que foi denominado glucagon salivar, uma vez que seu efeito era semelhante ao do glucagon pancreático porém, de maior duração, tendo sua liberação desencadeada pelos mesmos estímulos do glucagon pancreático.

A existência do glucagon salivar foi posteriormente comprovada por MYATA, YAMAMOTO e YAMAGUCHI (1976) quando observaram que pacientes submetidos a pancreatectomia apresentavam níveis normais de glucagon na corrente sanguínea.

Uma ação hipoglicemiante das glândulas salivares foi também relatada em trabalhos de FLEMING (1962), HOSHINO et alii (1976) e GUIMARÃES et alii (1979).

DOI et alii (1978) detectaram na saliva humana uma substância com ação hipoglicemiante, que foi denominada de "insulin-like", cuja concentração se elevava em resposta a ingestão de glicose. Essa substância apresenta ação seme-

lhante a da insulina pancreática e os autores MURAKAMI, TANIGUCHI e BABA(1982) confirmaram "in vitro" sua biossíntese na glândula parótida humana e de ratos através de testes com anticorpos anti-insulina.

GUIMARÃES et alii(1980) demonstraram que a administração de uma única dose de Parotín, em ratos diabéticos, normalizava o nível glicêmico e promovia aumento do glicogênio hepático.

TEIXEIRA, GUIMARÃES e CURY(1985), estudando os efeitos do Parotín sobre a hiperglicemia de ratos diabéticos, demonstraram que este princípio ativo apresentou ação ao diminuir a hiperglicemia e que a intensidade e a duração de seu efeito foi diretamente proporcional à sua concentração.

O Parotín é um produto impuro que apresenta quatro bandas proteicas (frações I, II, III e IV) quando separado pela eletroforese em poliacrilamida. ARRUDA VEIGA, TEIXEIRA E BOAVENTURA(1989), demonstraram que as frações II e III do Parotín foram mais efetivas em aumentar a captação de glicose "in vitro", pelo tecido adiposo de ratos diabéticos. ARRUDA VEIGA et alii(1989), observaram também que as frações II e III do Parotín mostraram-se mais efetivas em aumentar o consumo de oxigênio pelo tecido adiposo do epidídimo de ratos diabéticos, apresentando um efeito comparável ao da insulina.

COX e QUISSEL(1985), isolaram uma proteína ativadora de plaquetas de glândulas submandibulares de ratos, com atividade biológica comparável ao colágeno, capaz de a-

tivar plaquetas, causando agregados e secreção de serotonina.

Foi também purificado do extrato de glândulas submandibulares de rato, um fator imunossupressivo (SMG-ISF) capaz de inibir a proliferação de linfócitos mitógenos e antígeno-estimulados (KEMP, MELLOW e SABADINE, 1986)

MENGHI et alii (1988) verificaram que as glândulas sublinguais de ratos e camundongos apresentam propriedades anticoagulantes, sendo que os constituintes glicoconjugados isolados da sublingual de ratos alteraram marcadamente os parâmetros tromboelastográficos e testes de hemocoagulação. Já os glicoconjugados de sublingual de camundongos, não provocaram mudanças estatisticamente significantes nos tromboelastográficos mas, induziram mudanças significativas no tempo parcial de trombolastina.

"
EKSTRÖM e EKMAN (1988) 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 acetil-colina e alguns outros transmissores não clássicos e pode estar envolvido na secreção parassimpático-atropina - resistente que ocorre nas glândulas salivares estudadas: parótidas, sublinguais e submandibulares de ratos.

1.2. Glândulas Salivares e Gônadas

Desde a descoberta de que as glândulas submandibulares de camundongos apresentavam dimorfismo sexual estrutural (LACASSAGNA, 1940), vários trabalhos têm procurado interrelacionar as glândulas salivares com as gônadas.

A demonstração da atividade da fosfatase ácida, através de análise histoquímica dos grânulos secretórios dos ductos granulosos das glândulas salivares de camundongos, foi feita por JUNQUEIRA et alii (1949). Foi verificado que a atividade dessa fosfatase era cerca de duas vezes e meia maior nos camundongos machos que nas fêmeas. A produção de proteases andrógeno-dependentes nas glândulas submandibulares também foi descrita por SREEBNY et alii (1955) e SREEBNY (1960).

Segundo SHACKLEFOR e WILBORN (1968) e SMITH e FROMMER (1972), os túbulos granulares não estão presentes nas glândulas submandibulares de camundongos de quatro semanas pós-natais e, até essa idade, não há dimorfismo sexual.

Estudos quantitativos têm demonstrado que os diâmetros dos túbulos das glândulas submandibulares de ratos são maiores nos machos do que nas fêmeas e, nos ratos os túbulos granulosos estão sob a influência hormonal, particularmente dos hormônios sexuais masculinos (BOYKO e ZEBROWSKI, 1972).

BALDI e CHARREAU (1972) verificaram que as sub

mandibulares de ratos tem um sistema ativo 17-beta-hidroxi-esteróide-oxidoreductase, evidenciado pela conversão da testosterona e 17-beta-estradiol em androstenediona e estrona. Segundo esses autores, é possível que a enzima responsável por essa transformação se localize nos segmentos tubulares dessas glândulas.

A redução da atividade da amilase em animais castrados e o seu aumento através da administração de testosterona às fêmeas e em camundongos machos castrados, foi relatado por SHEAR et alii (1979).

Foi demonstrado que a concentração do fator de crescimento nervoso nas glândulas submandibulares de camundongos é muito menor nas fêmeas do que nos machos e é testosterona-dependente (LEVI-MONTALCINI e ANGELETTI, 1964). Também a concentração do Fator de Crescimento Epidermal (EGF) aumenta rapidamente após a puberdade (BYNY, ORTH e COHEN, 1972), e a sua identificação na glândula é possível em torno do 20º dia após o nascimento (GRESIK e BARBA, 1977 e 1978).

Por outro lado, HOSHINO e LIN (1969), observaram que o transplante de glândulas submandibulares de camundongos machos para animais hospedeiros, causava a morte destes, mas esse efeito letal não ocorria quando se transplantavam glândulas de camundongos fêmeas ou de machos imaturos. Esses resultados sugeriram que a manifestação do fator letal deveria estar diretamente relacionada à maturação sexual do doador macho e, que provavelmente dependia da influência dos hormônios sexuais masculinos.

LIN e HOSHINO(1969) procurando demonstrar que, efetivamente, o fator letal é dependente da ação da testosterona, relataram que os transplantes de glândulas submandíbulares obtidas de camundongos machos imaturos e de fêmeas adultas, exerciam efeito letal em camundongos machos e fêmeas desde que os doadores fossem pré-tratados com testosterona . Verificaram também, que o pré-tratamento com estradiol em camundongos machos, imaturos e adultos, não alterava os resultados dos transplantes glandulares obtidos sem a administração desse hormônio.

HOSHINO e LIN(1969 e 1970) investigaram os efeitos seletivos da testosterona e isoproterenol sobre a regeneração das glândulas submandibulares transplantadas para camundongos machos e fêmeas adultos, tendo como doadores fêmeas adultas. Os dados obtidos demonstraram que a testosterona e o isoproterenol-HCl podem exercer efeitos estimulatórios específicos sobre os diferentes componentes de tecidos submandibulares, agindo a testosterona sobre a regeneração dos túbulos secretórios e o isoproterenol sobre as células acinares.

Estas investigações possibilitaram ainda, verificar a capacidade de sobrevivência do tecido glandular não somente para regenerar os túbulos secretórios, mas também para recuperar a sua atividade biológica específica, tal como o efeito letal. Assim, os transplantes de submandibulares de doadores fêmeas em hospedeiros tratados com testosterona, apresentaram ainda, efeito letal quando retransplantados em novos hospedeiros (HOSHINO e LIN, 1969 e 1970).

LIN e HOSHINO(1971) verificaram também, uma possível ação protetora da testosterona contra o efeito letal, em hospedeiros machos e fêmeas. Constataram diferenças na taxa de mortalidade, sendo o macho mais resistente. Nota ram ainda, que a testosterona tinha uma ação protetora maí or nos hospedeiros fêmeas, sugerindo que a diferença sexual na susceptibilidade do camundongo ao efeito letal pode ser atribuída à presença do hormônio androgênico.

HUANG, HOSHINO e LIN(1972), estudaram o efeito da ligação previa do ducto excretor das glândulas submandibulares na produção do fator letal como também, sob o efeito da testosterona e isoproterenol em animais transplantados. Esses autores demonstraram que a administração da testosterona após o transplante, potencializou o efeito letal e, que no grupo que recebeu a solução de isoproterenol após o transplante, detectou-se menor quantidade de fator letal, embora os pesos das glândulas estivessem significati vamente aumentados em função da hipertrofia das células acinares.

Outros trabalhos têm relacionado a remoção das glândulas salivares com alterações nas funções gonadais e reprodutivas em ambos os sexos. Desde 1940, KATAGIRI e HIGASHIGO tinham observado que a remoção das glândulas sub mandibulares e a ligação dos ductos da parótida em ratas jovens, levava a uma hipertrofia do útero.

GINN e VOLKER(1942) mostraram que a ausência de glândulas salivares em ratas provocava distúrbios do metabolismo hormonal de células sexuais, além da diminuição da

fertilidade.

BIXLER, MUHLER e SHAFER(1955) relataram que a sialoadenectomia provocava um aumento do peso testicular em ratos.

Entretanto, AFONSKY(1958) relata uma queda na capacidade de fecundação em ratas sialoadenectomizadas. SUD DICK(1960), levantou a hipótese de que as glândulas salivares produziam uma substância que estimulava a atividade dos órgãos reprodutores.

Da mesma forma, LOURIDES et alii(1970) verificaram que a extirpação das glândulas salivares em ratas, retardava a maturação ovariana e provocava atrofia do útero. JOHNSON, KEKEH e YAPI(1970), observaram alterações semelhantes em camundongos machos sialoadenectomizados que apresentavam regressão testicular e diminuição da atividade sexual.

DOTTAVIANO, RAMALHO e NEGREIROS DE PAIVA(1974), também constataram em ratos sialoadenectomizados, baixo índice de reprodução, quando comparados com animais normais. ARCIERE e MARTINELLI(1977), verificaram uma progressiva esterilidade em ratas que tiveram suas glândulas salivares extirpadas.

1.3. Glândulas Salivares e Seus Fatores Tóxicos

A partir da descoberta da calicreína nas glândulas salivares por WERLE e RODEN(1936), extensas investigações, tanto "in vivo" quanto "in vitro", têm despertado grande interesse no estudo das glândulas salivares, possibilitando nelas a identificação de muitos fatores ativos, dos quais alguns apresentam toxicidade.

Dos fatores biológicos presentes nas glândulas salivares, alguns apresentam atividade tóxica de forma inespecífica ou com seletividade de órgão ou tecido.

ATTARDI et alii(1965), isolaram do extrato de glândulas submandibulares de camundongos, uma proteína com atividade proteolítica que afetava o tecido de origem mesodérmica.

ANGELETTI et alii(1965), purificaram parcialmente uma proteína do extrato de glândulas submandibulares de camundongos machos que tem a capacidade de induzir granulocitose em camundongos. Os mesmos autores utilizando-se de homogeneizados de glândulas submandibulares de camundongos machos, administrados em camundongos adultos, verificaram a presença do fator letal nessas glândulas; eles sugeriram que a toxicidade poderia ser devido a vários componentes do extrato glandular, demonstrando dessa forma, que extratos de glândulas submandibulares de camundongos machos adultos eram

extremamente tóxicos, mesmo com baixa concentração proteica.

Posteriormente, LIUZZI e ANGELETTI (1968) observaram que a diálise desses extratos com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,2, não diminuía o nível de toxicidade, sugerindo que o componente tóxico deveria estar associado à macromoléculas, possivelmente de natureza proteica, sendo que a propriedade tóxica desse extrato é destruída por fervura à 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 proteicas apresentassem certo grau de toxicidade, uma das frações (fração E) era bem mais tóxica que as outras e, que doses subletais desta fração induziam retardo do crescimento de ratos recém-nascidos e severa atrofia do timo.

LIN e 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.

A presença do fator letal nas glândulas submandibulares de camundongos machos foi observada também nos estudos realizados por HOSHINO e LIN (1968 e 1969), como citado anteriormente.

Posteriormente LIN e HOSHINO (1970 e 1971) demonstraram que além do transplante de glândulas submandibulares de camundongos machos, para animais hospedeiros, a administração de extratos liofilizados dos homogeneizados dessas glândulas, também eram letais não somente para camundongos,

mas também à outras espécies. Ainda, através desses trabalhos foi demonstrado que o efeito letal das glândulas submandibulares é maior quando ocorre a sua administração sob a forma de homogenato do que quando transplantadas, e que a manifestação do fator letal está diretamente relacionada com o sexo masculino, e pode ser influenciado por andrógenos. Notaram também, que o hospedeiro macho sialoadenectomizado apresenta maior taxa de mortalidade quando comparado com os não sialoadenectomizados e que a testosterona protege as fêmeas hospedeiras contra o efeito letal, tanto nos animais sialoadenectomizados quanto nos não sialoadenectomizados.

Em 1973, BARKA purificou parcialmente uma proteína de glândulas salivares de camundongos machos e fêmeas, com atividade supressora da mitose celular.

Administrando extrato liofilizado de glândulas submandibulares de camundongos machos em fêmeas receptoras, e usando a análise de probitos, HUANG et alii (1977), 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 exercia efeito letal com sensibilidades diferentes para as espécies de animais.

HIRAMATSU, HATAKEYAMA e MINAMI (1980) observaram que não-somente o extrato das glândulas submandibulares de camundongos machos apresenta o fator letal, mas também a saliva, que o libera, quando induzida por estimulação de agentes alfa-adrenérgico e, que ambos (extrato e saliva) foram altamente

tóxicos para cobaias, ratos e hamsters, enquanto a toxicidade da saliva foi relativamente baixa para camundongos. Os dados revelaram que o fator letal é uma proteína exócrina, demonstrando assim, que as glândulas submandibulares de camundongos machos secretam proteínas altamente tóxicas.

HATAKEYAMA, HIRAMATSU e MINAMI(1981) confirmaram os dados anteriores purificando um dos componentes tóxicos da saliva por focalização isoeletrica e cromatografia em DEAE Sephadex A-50, identificado como uma enzima com atividade semelhante à calicreína. Eles concluíram que os componentes tóxicos das glândulas submandibulares de camundongos machos estão localizados nos grânulos serosos dos túbulos secretórios e, que são secretados na saliva da mesma maneira que os fatores de crescimento nervoso (NGF), epidermal(EFG) e as enzimas proteolíticas, sendo a sua secreção controlada por agentes alfa-adrenérgicos.

PINHEIRO(1985) isolou de glândulas submandibulares de camundongos um complexo de substâncias de baixo peso molecular, contendo radicais aromáticos e carboidratos que foram denominados de Sialotoxinas I, II, III e IV, todas elas com atividade letal quando administradas em camundongos. Essas Sialotoxinas são muito resistentes ao tratamento com HCl 6N a 100°C.

AGOSTINHO(1987) procurando determinar a DL₅₀ da Sialotoxina I (SI), em camundongos machos e fêmeas, demonstrou que esta toxina promove, efetivamente, a morte dos mesmos, sendo as fêmeas muito mais sensíveis que os machos.

BOAVENTURA(1988), estudando os efeitos da Sia-

lotoxina I "In Vitro", observou que esta promove uma redução do consumo de oxigênio, diminui a incorporação de glicose pelo diafragma de ratos, como também induz a uma diminuição do consumo de oxigênio e redução na incorporação de glicose, mesmo na presença de insulina.

ARRUDA VEIGA e PINHEIRO(1988), isolaram e caracterizaram um peptídeo de glândulas submandibulares de camundongos machos adultos, de peso molecular próximo a 2800, que apresenta uma atividade tóxica sobre o rim, produzindo intensa poliúria e albuminúria.

1.4. Proposição

Tendo em vista as informações disponíveis na literatura, nota-se que numerosos trabalhos tem sido realizados no sentido de elucidar as reais funções dos fatores biologicamente ativos isolados de glândulas salivares. Com relação as substâncias consideradas tóxicas, propôs-se nesta pesquisa:

1- Determinar a DL_{50} da Sialotoxina III em camundongos machos e fêmeas.

2- Analisar as manifestações biológicas apresentadas por esses animais quando submetidos à doses letais e subletais da Sialotoxina III.

3- Verificar se a administração de testosterona em camundongos fêmeas, e a castração de camundongos machos, altera a sensibilidade destes animais frente à Sialotoxina III.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente trabalho foram utilizados 330 camundongos (*Mus Musculus albinus*), sendo 170 machos e 160 fêmeas, 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:- Camundongos machos normais e Sialotoxina III.

Constituído de 100 machos, os quais foram redistribuídos em 10 subgrupos de 10 camundongos cada, nos quais foram administrados, via I.P., Sialotoxina III, dose única, nas concentrações de 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 e 160 ug/kg de peso corporal, respectivamente.

GRUPO II:- Camundongos fêmeas normais e Sialotoxina III.

* Rações Ceres S/A - Piracicaba

Constituído de 70 fêmeas, as quais foram redistribuídas em 7 subgrupos de 10 camundongos cada, nos quais foram administradas, via I.P., Sialotoxina III, dose única, nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 55 e 60 ug/kg de peso corporal, respectivamente.

GRUPO III:- Camundongos machos orquidectomizados e Sialotoxina III.

Constituído de 70 machos, redistribuídos em 7 subgrupos de 10 camundongos, os quais foram submetidos à excisão dos testículos. Após 30 dias da cirurgia, os animais receberam Sialotoxina III, nas concentrações de 30, 40, 45, 50, 60, 70 e 80 ug/kg de peso corporal, respectivamente, 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 pela reação do animal.

A seguir, tomando os cuidados de antissepsia, foi feita uma incisão na parte inferior do escroto de modo à permitir a extrusão dos testículos. Uma simples ligadura com fio de algodão foi colocada 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 III.

GRUPO IV:- Camundongos fêmeas + testosterona e Sialotoxina
III.

Constituído de 90 fêmeas, redistribuídos em 9 subgrupos de 10 camundongos cada. Esses animais receberam, previamente, tratamento diário, com o hormônio testosterona*, via intraperitoneal, na concentração de 2,0 mg/kg de peso corporal, durante um período de 20 dias num volume máximo de 0,1 ml por camundongo. Em seguida, foi administrada Sialotoxina III, dose única, nas concentrações de 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 e 120 ug/kg de peso corporal, via intraperitoneal, respectivamente.

* Durateston - Lab. Organon do Brasil Ltda.

Q U A D R O A

Distribuição dos animais nos Grupos e Subgrupos

SEXO	GRUPOS	SUBGRUPOS	Nº/ANIMAIS	TRATAMENTO
Machos	I	Ia	10	Sialotoxina III:- 70 ug/kg
		Ib	10	" " 80 "
		Ic	10	" " 90 "
		Id	10	" " 100 "
		Ie	10	" " 110 "
		If	10	" " 120 "
		Ig	10	" " 130 "
		Ih	10	" " 140 "
		Ii	10	" " 150 "
		Ij	10	" " 160 "
Fêmeas	II	IIa	10	Sialotoxina III:- 10 ug/kg
		IIb	10	" " 20 "
		IIc	10	" " 30 "
		IIId	10	" " 40 "
		IIe	10	" " 50 "
		IIIf	10	" " 55 "
		IIg	10	" " 60 "
Machos	III	IIIa	10	Orquidectomia + SIII:- 30 ug/kg
		IIIb	10	" " " 40 "
		IIIc	10	" " " 45 "
		IIId	10	" " " 50 "
		IIIe	10	" " " 60 "
		IIIIf	10	" " " 70 "
		IIIg	10	" " " 80 "
Fêmeas	IV	IVa	10	Testosterona (2,0mg/kg)+SIII:40ug/kg
		IVb	10	" " " " 50 "
		IVc	10	" " " " 60 "
		IVd	10	" " " " 70 "
		IVe	10	" " " " 80 "
		IVf	10	" " " " 90 "
		IVg	10	" " " " 100 "
		IVh	10	" " " " 110 "
IVi	10	" " " " 120 "		

2.2. Tratamento Estatístico

Segundo JOHNSTON(1984), em ensaios que envolvem uma situação dose-resposta, uma determinada dose (Z_0) de um produto (uma toxina, por exemplo) é administrada para cada um dos membros de uma população (ratos, por exemplo). Assume-se que as respostas de cada um dos indivíduos destas populações são independentes entre si. Por uma série de razões, a tolerância à toxina varia de indivíduo para indivíduo e pode ser descrito por alguma função de distribuição probabilística $f(z)$. Se a tolerância é menor que a dosagem, o indivíduo morre pelos efeitos da toxina. Portanto, a proporção da população que morre com uma dosagem Z_0 (Π_0) é dada por:

$$\Pi_0 = \int_0^{z_0} f(z) dz \quad (1)$$

FINNEY(1964) sugere que a distribuição das tolerâncias é aproximadamente log normal. Portanto, a transformação das tolerâncias (e dosagens) de acordo com a equação 2 fará com que a função de distribuição probabilística de x , $f(x)$ se torne aproximadamente normal, ou seja, $x \sim N(u, \sigma^2)$, onde

$$x = \ln z \quad (2)$$

Deste modo, para uma certa dosagem x_1 , a pro-

porção populacional que morre (Π_1) é dada por:

$$\Pi_1 = \int_{-\infty}^{x_1} \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{1}{2\sigma^2}(x-\mu)^2\right] dx \quad (3)$$

Por definição, a dose letal mediana (DL_{50}) corresponde à dose em que 50% da população morre, ou seja, a DL_{50} é o valor de x_1 tal que:

$$0,5 = \int_{-\infty}^{x_1} \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{1}{2\sigma^2}(x-\mu)^2\right] dx \quad (4)$$

Assim sendo, o valor da DL_{50} simplesmente corresponde à mediana da distribuição de tolerância.

O problema prático consiste em se estimar os valores de u e 0 . Supondo-se que para este fim sejam selecionadas k dosagens (x_1, x_2, \dots, x_k), que a dosagem i é dada a um grupo com n_i indivíduos e que a proporção p_i de indivíduos que morrem é observada e assumindo-se que as tolerâncias possuam uma distribuição normal, as proporções observadas de morte estarão dispostas em torno da curva que descreve a função de probabilidade acumulada de x . O uso de p_i para se estimar u e 0 é difícil, pois p é uma função não linear de x . A transformação probit lineariza esta relação e faz com que a estimativa de u e 0 seja bastante simplificada. Para tanto, define-se y como

$$y = \frac{x - \mu}{\sigma} \quad (5)$$

$$\therefore y \sim N(0, 1)$$

Deste modo, qualquer dosagem x_1 pode ser expressa em termos de y . A probabilidade de morte com a dosagem x_0 é dada por

$$\Pi_0 = F(\gamma_0) \tag{6}$$

$$\Pi_0 = \int_{-\infty}^{\gamma_0} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{1}{2}\gamma^2\right] d\gamma$$

onde

$$\gamma_0 = \frac{x_0 - \mu}{\sigma} \tag{7}$$

Invertendo-se a equação 6 tem-se:

$$F^{-1}(\Pi_0) = \gamma_0 = \frac{x_0 - \mu}{\sigma} \tag{8}$$

Para qualquer valor de y é possível determinar o valor de TC (isto é feito através de qualquer tabela que contenha os valores das probabilidades acumuladas de uma distribuição normal com média zero e variância 1). Do mesmo modo, para qualquer valor de TC é possível determinar-se o valor de y . A variável y é definida como o desvio equivalente normal (n.e.d.) ou como o normit. O probit é

definido como:

(9)

$$\text{Probit} = \gamma + b$$

O n.e.d. sempre será negativo para valores de TC menores que 0,5, entretanto, o probit quase nunca será negativo¹. Para a transformação de porcentagens em probits pode-se consultar tabelas ou utilizar algum tipo de programa estatístico para computador.

Num experimento típico, as dosagens x_1, x_2, \dots, x_k são fornecidas a n_1, n_2, \dots, n_k , respectivamente. As proporções observadas de morte (ou outro efeito) são medidas. O procedimento para estimar os valores de u e 0 seguem diretamente da equação 8, ou seja:

1. Converta as proporções observadas p_1, p_2, \dots, p_k em seus respectivos n.e.d. e faça um gráfico relacionados os n.e.d. e com os valores de x ($x = \ln[\text{dose}]$).

2. Se o gráfico acima mostrar uma forma aproximadamente linear, estime a regressão:

$$NED = a + bx \quad (10)$$

onde²: a é uma estimativa de $-u/0$ e b é uma estimativa de $1/0$.

¹ Segundo FINNEY(1971), o número 5 foi escolhido arbitrariamente com o único objetivo de eliminar a possibilidade de valores negativos para os probits, pois n.e.d. negativos e próximos a -5 quase nunca serão encontrados.

² Se probits são usados ao invés de NEDs, a é uma estimativa de $5-u/6$.

Antes de se escolher o método para a estimativa da equação 10 deve-se compreender as propriedades da estrutura de erro deste modelo. A relação entre TC e x é dada pela equação 11. Entretanto, os valores calculados dos n.e.d. são dados pela equação 12¹.

$$F^{-1}(\Pi_j) = -\frac{\mu}{\sigma} + \frac{1}{\sigma} N_j, \quad j = 1, \dots, k \quad (11)$$

$$F^{-1}(p_j) = F^{-1}(\Pi_j + \varepsilon) \quad (12)$$

Expandindo-se a equação 12 pela série de TAYLOR e mantendo-se apenas os termos de primeira ordem (JUDGE et alii, 1988) tem-se que:

$$F^{-1}(\Pi_j + \varepsilon_j) \approx F^{-1}(\Pi_j) + \varepsilon_j \frac{1}{Z_j} = F^{-1}(\Pi_j) + u_j \quad (13)$$

onde:

$$\frac{dF}{dy_j} = \frac{1}{\frac{dF^{-1}}{dp_j}} = \frac{1}{\frac{dy_j}{dp_j}} = \frac{1}{\sqrt{2\Pi}} \exp\left(-\frac{y_j^2}{2}\right) = Z_j \quad (14)$$

¹ Deve-se notar que o erro aleatório epsilon possui uma média igual a zero e variância igual a

ou seja, Z_i é o valor da ordenada de uma curva normal com média 0 e variância 1 que corresponde à abscissa y_1 . Assim, tem-se que:

$$\text{var}(u_i) = \frac{\Pi_i(1 - \Pi_i)}{n_i Z_i^2} \quad (15)$$

Portanto, a equação de regressão 13 possui um erro (u) de variância não constante para todas as observações, assim sendo, sua estimativa pode ser feita através do uso do método generalizado dos quadrados mínimos, onde $1/\text{var}(u_i)$ são os pesos a serem utilizados.

3. RESULTADOS

Os animais do Grupo I, constituídos de camundongos machos normais que receberam doses de Sialotoxina III nas concentrações de 110, 120, 130, 140, 150 e 160 ug/kg de peso corporal, apresentaram, respectivamente, taxas de mortalidade de 0, 10, 50, 60, 80 e 100%.

Pelo método da análise de probitos obteve-se então um valor da dose letal para 50% da população, $DL_{50} = 133,90894$ ug/kg de peso corporal de Sialotoxina III, quando administrada em camundongos machos normais (Tabela I).

A análise das atividades biológicas (Quadro D) demonstrou que, mesmo os animais que receberam dose de 100 ug/kg de peso corporal (inferior à letal) apresentaram reações de hiperexcitabilidade, apatia, festinação e hipotonia (em respectivamente: 80, 80, 20 e 10% dos animais).

Verificou-se também que a medida que se aumentavam as concentrações da Sialotoxina III, as manifestações biológicas se acentuavam enquanto a taxa de mortalidade se aproximava de 100% dos animais (dose de 160 ug/kg de peso corporal).

QUADRO I:- Manifestações biológicas de camundongos machos normais (Grupo I) que receberam doses crescentes de Sialotoxina III.

Doses de SIII(ug/kg de peso)	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160
Número de animais	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Atividades biológicas:										
* hiper-excitabilidade	0	0	6	8	8	10	10	10	10	10
* apatia	0	0	6	8	8	10	10	10	10	10
* festinação	0	0	0	2	6	6	8	10	10	10
* hipotonia	0	0	0	1	3	5	6	8	10	10
* piloereção	0	0	0	0	0	5	8	10	10	10
* taquicardia	0	0	0	0	2	2	3	6	8	10
* sudoração	0	0	0	0	2	2	3	5	8	10
* cianose	0	0	0	0	1	1	3	5	8	10
* midríase/exoftalmia	0	0	0	0	0	1	3	6	6	10
* poliúria	0	0	0	0	1	3	3	6	9	10
* epistótono da cauda	0	0	0	0	0	0	3	5	6	10
* convulsão/contratura	0	0	0	0	0	0	1	2	3	4
* mortes	0	0	0	0	0	1	5	6	8	10

TABELA I:- Mortalidade em camundongos machos normais que receberam doses crescentes de Sialotoxina III.

DOSE DE SIII ug/kg de peso	TAXA DE MORTALIDADE (%)
110	0
120	10
130	50
140	60
150	80
160	100

DL₅₀ = 133,90894 ug/kg

Os animais do Grupo II, constituídos de camundongos fêmeas normais que receberam doses de Sialotoxina III nas concentrações de 20, 30, 40, 50, 55 e 60 ug/kg de peso corporal, apresentaram, respectivamente, taxas de mortalidade de 0, 20, 50, 70, 80 e 100%.

Pelo método de análise de probitos obteve-se então um valor da dose letal para 50% da população, $DL_{50} = 38,35750$ ug/kg de peso corporal de Sialotoxina III (Tabela II).

A análise das atividades biológicas (Quadro II) demonstrou que todos os animais desse grupo, ao receberem a toxina, apresentaram reações de hiperexcitabilidade, apatia, hipotonia, piloereção, taquicardia, sudoração, cianose e poliúria, a partir da dose de 10 ug/kg de peso corporal que apresentou 0% de taxa de mortalidade.

A medida que se aumentava as concentrações de Sialotoxina III administradas, os animais foram apresentando de forma mais intensa as reações acima mencionadas, culminando com a taxa de 100% de mortalidade na dose de 60 ug/kg de peso corporal.

Os animais do Grupo III, constituídos de camundongos machos orquidectomizados que receberam doses de Sialotoxina III nas concentrações de 45, 50, 60, 70 e 80 ug/kg de peso corporal, apresentaram, respectivamente, taxas de mortalidade de 0, 30, 60, 80 e 100%.

Pelo método de análise de probitos obteve-se então um valor da dose letal para 50% da população, $DL_{50} = 56,416461$ ug/kg de peso corporal de Sialotoxina III (Tabela

III).

QUADRO II:- Manifestações biológicas de camundongos fêmeas normais (Grupo II) que receberam doses crescentes de Sialotoxina III.

Doses de SIII (ug/kg de p̄so)	10	20	30	40	50	55	60
Número de animais	10	10	10	10	10	10	10
Atividades biológicas:							
* hiper-excitabilidade	10	10	10	10	10	10	10
* apatia	4	10	10	10	10	10	10
* festinação	0	3	5	6	7	8	10
* hipotonia	1	2	5	6	7	8	10
* piloereção	2	2	5	5	8	8	10
* taquicardia	1	2	4	5	8	9	10
* sudoração	1	2	4	6	8	9	10
* cianose	1	1	4	6	8	9	10
* midriase/exoftalmia	0	1	4	5	7	8	10
* poliúria	2	2	3	5	8	8	10
* epistôtono de cauda	0	1	2	3	4	5	10
* convulsão/contratura	0	0	1	3	4	5	7
* mortes	0	0	2	5	7	8	10

TABELA II:- Mortalidade em camundongos fêmeas normais que receberam doses crescentes de Sialotoxina III.

DOSE DE SIII ug/kg de p̄so	TAXA DE MORTALIDADE (%)
20	0
30	20
40	50
50	70
55	80
60	100

DL₅₀ = 38,35750 ug/kg

QUADRO III:- Manifestações biológicas de camundongos machos orquidectomizados (Grupo III) que receberam doses crescentes de Sialotoxina III.

Doses de SIII (ug/kg de peso)	30	40	45	50	60	70	80
Número de animais	10	10	10	10	10	10	10
Atividades biológicas:							
* hiper-excitabilidade	0	0	10	10	10	10	10
* apatia	0	0	10	10	10	10	10
* festinação	0	0	6	8	10	10	10
* hipotonia	0	0	3	5	8	10	10
* piloereção	0	0	2	0	6	9	8
* taquicardia	0	0	2	2	5	8	10
* sudoração	0	0	3	4	6	6	9
* cianose	0	0	0	0	10	9	10
* midriase/exoftalmia	0	0	2	3	6	9	10
* poliúria	0	0	3	2	7	10	10
* epistôtono	0	0	3	6	8	9	9
* convulsão/contratura	0	0	0	0	3	4	9
* mortes	0	0	0	3	6	8	10

TABELA III:- Mortalidade em camundongos orquidectomizados que receberam doses crescentes de Sialotoxina III.

DOSE DE SIII ug/kg de peso	TAXA DE MORTALIDADE (%)
40	0
45	0
50	30
60	60
70	80
80	100

DL₅₀ = 56,416461 ug/kg

A análise das atividades biológicas (Quadro III) demonstrou que mesmo animais que receberam doses de 45 ug/kg de peso corporal, com taxa de mortalidade de 0%, apresentaram em sua totalidade reações de hiperexcitabilidade e apatia; 60% deles apresentaram festinação, 30% apresentaram hipotonia, sudoração, poliúria e epistôtono de cauda enquanto 20% apresentaram piloereção, taquicardia e midriase, exoftalmia.

A exemplo dos outros grupos, estes animais apresentaram também acentuado aumento dessas reações em níveis proporcionais às concentrações administradas, alcançando o grau de convulsão, contraturas e morte na concentração de 60 ug/kg de peso corporal.

Os animais do Grupo IV, constituídos de camundongos fêmeas tratadas previamente com testosterona, que receberam doses de Sialotoxina III nas concentrações de 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 e 120 ug/kg de peso corporal, que apresentaram, respectivamente, taxas de mortalidade de 0, 10, 20, 50, 60, 80, 100 e 100%.

Pelo método da análise de probitos obteve-se então um valor da dose letal para 50% da população, $DL_{50} = 77,72368$ ug/kg de peso corporal de Sialotoxina III (Tabela IV).

A análise das atividades biológicas (Quadro IV) demonstrou que as reações foram sendo progressivamente manifestadas em relação às concentrações da Sialotoxina III. Hiper-excitabilidade e apatia foram as mais observadas quantitativamente, como aconteceu nos grupos estudados an-

teriormente, culminando com a maioria das reações apresentadas nos animais que tiveram sua taxa de mortalidade de 100% na concentração de 110 ug/kg de peso corporal.

QUADRO IV:- Manifestações biológicas de camundongos fêmeas tratadas com testosterona (Grupo IV) que receberam doses crescentes de Stalotóxina III.

Doses de SIII(ug/kg de peso)	40	50	60	70	80	90	100	110	120
Número de animais	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Atividades biológicas:									
* hiper-excitabilidade	5	9	10	10	10	10	10	10	10
* apatia	0	9	10	10	10	10	10	10	10
* festinação	0	1	2	3	6	8	7	10	10
* hipotonia	0	0	1	1	6	6	7	10	10
* piloereção	0	0	0	1	4	6	6	10	10
* taquicardia	0	0	0	0	3	5	7	10	10
* sudoração	0	0	0	0	4	6	7	10	10
* cianose	0	0	0	0	3	5	6	10	10
* midriase/exoftalmia	0	0	0	0	4	5	7	9	10
* poliúria	0	0	0	0	4	6	8	10	10
* epistôtono de cauda	0	0	0	0	5	4	7	8	10
* convulsão/contratura	0	0	0	0	5	5	6	8	9
* Mortes	0	0	1	2	5	6	8	10	10

TABELA IV:- Mortalidade em camundongos fêmeas tratadas com testosterona que receberam doses crescentes de Sialotoxina III.

DOSE DE SIII ug/kg de pêsso	TAXA DE MORTALIDADE (%)
50	0
60	10
70	20
80	50
90	60
100	80
110	100
120	100

DL₅₀ = 77,72368 ug/kg

4. DISCUSSÃO

Na análise dos resultados que se referem à Sialotoxina III podemos notar que se trata, efetivamente, de uma fração tóxica produzida pelas glândulas salivares de camundongos machos que promove uma série de reações biológicas e morte quando administradas em camundongos machos e fêmeas.

Foi feita a análise de probitos em função das doses administradas e suas respectivas taxas de mortalidade. A dose letal para 50% da população estudada, chamada DL_{50} foi estabelecida para cada grupo estudado: camundongos machos normais, camundongos fêmeas normais, machos orquidectomizados e fêmeas que receberam testosterona.

Foi determinado primeiramente a dose que provocou 100% de mortalidade, sendo esta progressivamente diminuída até desaparecer o efeito letal.

Podemos observar que os machos normais, que receberam a Sialotoxina III, apresentaram uma DL_{50} de 133,91 ug/kg de peso, em comparação com as fêmeas, que mostraram uma sensibilidade a esta toxina significativamente maior (DL_{50} de 38,36 ug/kg de peso), sendo portanto necessária uma dose 3,5 vezes maior de Sialotoxina III para provocar a morte de 50% dos camundongos machos.

Para explicar esse fato, pode-se levantar a hipótese de que os camundongos machos adultos, tenham entrado em contato com o fator tóxico em doses fisiológicas, du-

rante a fase de desenvolvimento e crescimento, apresentando dessa forma um certo grau de tolerância ou imunidade a esta toxina. Como podemos observar nas Tabelas I e II, a concentração de Sialotoxina III, que provoca a morte de 100% nos camundongos machos é de ordem de 160 ug/kg de peso, enquanto para as fêmeas, é de apenas 60 ug/kg de peso.

Ao analisarmos as manifestações biológicas apresentadas pelos animais dos Grupos I e II, verificamos também que as fêmeas são muito mais sensíveis, pois as reações como hiperexcitabilidade e apatia já se manifestam na conc. de 10 ug/kg de peso, enquanto que nos machos essas mesmas reações só aparecem a partir da dose de 90 ug/kg de peso. (Quadro I e II).

O aparecimento das outras manifestações é diretamente proporcional às doses, tanto para os machos como para as fêmeas, sendo que, reações como taquicardia, sudoracão, cianose e poliúria só se manifestaram nos machos, quando submetidos à conc. de 110 ug/kg de peso, enquanto nas fêmeas, estas já ocorreram na dose de 10 ug/kg de peso. Da mesma forma, convulsões, contraturas e mortes começaram a aparecer nos machos a partir da dose de 130 ug/kg de peso e nas fêmeas já se manifestaram na concentração de 30 ug/kg de peso.

Essa diferença de sensibilidade à Sialotoxina entre camundongos machos e fêmeas, além da possível tolerância apresentada pelos machos, poderia também estar relacionado à presença de grânulos secretórios nos ductos granulosos das glândulas submandibulares de camundongos machos ser

duas vezes e meia maior que das fêmeas (JUNQUEIRA et alii, 1949). Inúmeras evidências tem demonstrado que esse dimorfismo está vinculado principalmente aos hormônios androgênicos (PASQUINI et alii, 1974; SCHWAB et alii, 1976; GRE-SIK e BARKA, 1977) e, que os túbulos granulosos das glândulas submandibulares estão sob influência hormonal, particularmente dos hormônios sexuais masculinos (BOYKO e ZEBROWSKI, 1972).

Dessa forma, tem sido sugerido que os fatores tóxicos das glândulas submandibulares de camundongos machos estariam localizados nos ductos granulosos, sendo a maioria destes também andrógenos dependentes (HATAKEYAMA, HIRAMATSU e MINAMI, 1981).

Com a finalidade de se verificar uma possível relação entre hormônios androgênicos e a toxicidade apresentada pela Sialotoxina III, foram administradas diferentes concentrações desta toxina em camundongos machos orquídectomizados, como também em camundongos fêmeas previamente tratadas com testosterona.

Os camundongos machos orquídectomizados, apresentaram uma DL_{50} de 56,42 ug/kg em relação à Sialotoxina III, enquanto os machos normais tinham apresentado uma DL_{50} de 133,91 ug/kg. Portanto, a ausência dos testículos e consequente deficiência da testosterona, aumentou significativamente a sensibilidade desses animais a esta toxina, sendo que a dose de 160 ug/kg necessária para provocar uma taxa de mortalidade de 100% foi reduzida pela metade nos animais castrados (Tabelas I e III).

Quanto aos animais do grupo IV, fêmeas previamente tratadas com testosterona, observou-se que esse tratamento interferiu significativamente na sensibilidade desses animais à Sialotoxina III, apresentando uma DL_{50} de 77,72 ug/kg, bem acima daquela apresentada pelas fêmeas normais que era 38,36 ug/kg. Da mesma forma, a dose de 60 ug/kg de Sialotoxina III que causaria a morte de 100% das fêmeas injetadas, com a presença da testosterona nos animais tratados, apresentou uma taxa de mortalidade de apenas 10%, evidenciando portanto uma ação protetora da testosterona em relação a toxicidade desta Sialotoxina (Tabelas II e IV).

Quanto às manifestações biológicas, verificou-se que os machos orquidectomizados já apresentavam reações de convulsão e contratura na dose de 60 ug/kg, enquanto os machos normais só apresentaram essas reações na dose de 130 ug/kg (Quadro I e III).

Por outro lado, as fêmeas que receberam testosterona, passaram a apresentar a maioria das reações observadas em doses de Sialotoxinas proporcionalmente mais elevadas, como por exemplo as manifestações de sudoração, cianose, miíase, poliúria e convulsão ocorreram somente a partir da dose de 80 ug/kg, enquanto as fêmeas normais, com testosterona já apresentavam sudoração, cianose e poliúria na dose de 10 ug/kg e convulsão na dose de 30 ug/kg (Quadro II e IV).

TAMES, FAVA DE MORAES e DOINE, 1985, demonstraram que a orquidectomia após 30 dias de pós-operatório,

além de promover uma drástica redução do nível de testoste
rona circulante, provoca também uma severa atrofia dos duc
tos granulosos, os quais têm sido considerados a fonte pro
dutor de inúmeros fatores biologicamente ativos encontra-
dos nas glândulas salivares.

Os animais do Grupo III, não apresentaram os
mesmos índices da DL_{50} das fêmeas normais, possivelmente
pela presença de andrôgeno remanescente produzido pelas cé
lulas da zona reticular da cortex da supra renal, como tam-
bém pela ação imunológica desenvolvida antes da castração,
que teria uma ação protetora.

O aumento da susceptibilidade à Sialotoxi
na III em camundongos machos castrados, e o aumento da re-
sistência a essa toxina apresentadas pelas fêmeas tratadas
com testosterona, reafirma as evidências de que as Sialoto
xinas sejam andrôgeno dependentes, uma vez que estas tem
sido isoladas somente de glândulas submandibulares de ca-
mundongos machos (PINHEIRO, 1988).

Muitos fatores biológicos que apresentam ati-
vidade tóxica têm sido evidenciados em extratos de glându-
las submandibulares de camundongos. Entretanto muito pou-
co se sabe a respeito da função, mecanismo de ação e espe-
cificidade dessas substâncias.

ANGELETTI et alii (1965) conseguiram purifi-
car parcialmente uma proteína do extrato de glândulas sub
mandibulares de camundongos machos que têm a capacidade de
induzir granulocitose em camundongos. Mas não se sabe se
esta proteína atua, diretamente ou indiretamente, induzín-

do a produção de outras substâncias como por exemplo, o fator que promove a leucocitose.

TAKEDA et alii (1967), sugeriram a existência de um fator que causa atrofia do tecido linfático. Segundo LIUZZI e ANGELETTI (1968), o componente tóxico do extrato de glândulas submandibulares, que produz atrofia do timo, deve estar associado à moléculas de natureza protéica.

Os fatores protéicos contidos no extrato de glândulas submandibulares de camundongos machos, com atividades biológicas descritas acima, aparentemente não apresentam efeito letal. No entanto, em 1962, COHEN demonstrou que extratos de glândulas submandibulares de camundongos machos, possuem um efeito letal tanto para camundongos recém-nascidos quanto para adultos.

ATTARDI et alii(1965), isolaram uma proteína de se extrato que afeta tecidos de origem mesodérmica. Como esta proteína apresenta atividade proteolítica, os autores concluíram que provavelmente as substâncias biologicamente ativas observadas, devem ter sua origem na degradação. de proteínas tisulares pela ação da referida enzima.

LIUZZI e ANGELETTI(1968) observaram que o fator tóxico presente no extrato de glândula submandibular de camundongos machos deve estar associado à 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 " Sephadex G-100 ", pH neu-

tro e verificaram que algumas frações eram acentuadamente mais tóxicas que outras.

A existência do fator letal foi efetivamente comprovada a partir dos experimentos de HOSHINO e LIN (1968 e 1969) quando transplantaram glândulas submandibulares de camundongos machos adultos para a cavidade abdominal de animais hospedeiros. Tanto o iso como o autotransplante levaram ao mesmo efeito, ou seja, liberaram o fator letal que provocou a morte dos animais hospedeiros. A autópsia destes animais revelou a existência de congestão periférica e hemorragia, mas a real "causa mortis" não foi esclarecida, como também não é conhecida a natureza química do fator letal nem seu sítio de produção.

LIN e HOSHINO (1970 e 1971) encontraram diferenças no índice de mortalidade entre camundongos machos e fêmeas que receberam o transplante de glândulas submandibulares, sendo o camundongo macho mais resistente.

HUANG, HOSHINO e 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 notaram que a administração deste hormônio após a ligação dos ductos e transplante das glândulas intensificava o efeito do fator letal.

Posteriormente, HUANG et alii (1977) relataram que a susceptibilidade ao fator letal variava quando se faziam comparações entre diferentes espécies animais e diferiam ainda segundo o sexo e grau de maturação sexual dos camundongos.

A família de Sialotoxina (I, II, III e IV) i soladas por PINHEIRO(1988), diferem do fator letal, por serem substâncias de baixo peso molecular e de natureza não protéica, contendo carboidratos e radicais aromáticos, e principalmente por serem muito resistente ao tratamento com HCl 6N à 100°C, sendo que a toxicidade destas não diminui mesmo após 10 minutos de fervura, não se tratando portanto, do mesmo tipo de substância tóxica. Além disso as sialotoxinas apresentam um alto grau de purificação quando comparadas aos outros fatores tóxicos descritos, cuja natureza química na maioria destes é desconhecida.

AGOSTINHO(1987) determinou a DL₅₀ da Sialotoxina I, em camundongos de ambos os sexos, apresentando os valores de 3,6 mg/kg para machos e 1,05 mg/kg para fêmeas, que corresponde a 151,2 ug/kg e 44,1 ug/kg respectivamente em radicais fenólicos sendo portanto ligeiramente menos tóxica que a Sialotoxina III que apresentou respectivamente os valores de 133,90 e 38,36 ug/kg.

BOAVENTURA(1988) investigou os efeitos da Sialotoxina 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.

ALMEIDA(1991), na tentativa de explicar parte dos efeitos biológicos das Sialotoxinas, analisou os

efeitos da Sialotoxina I sobre o hemograma, e observou que esta toxina provoca um aumento acentuado de leucócitos hiperplasia e hipertrofia do baço além de degeneração hepática envolvendo infiltração linfohistiocitária, necrose e desorganização estrutural.

O presente estudo confirma a ação letal da Sialotoxina III, produzida pelas glândulas submandibulares de camundongos machos, cuja DL_{50} e taxa de mortalidade variam com o sexo e com os níveis de testosterona, mostrando haver uma interação entre os efeitos biológicos desta toxina e o referido hormônio.

Embora nossos resultados sejam concordantes com aqueles encontrados por HOSHINO e LIN(1968 e 1969) quando descreveram o efeito letal das glândulas submandibulares LIN e HOSHINO(1970 e 1971), que demonstraram que o fator letal é testosterona dependente e LIUZZI e ANGELETTI (1968) que verificaram que o extrato de glândulas submandibulares de camundongos adultos contém proteínas básicas com efeito tóxico mais acentuado nas fêmeas, a sialotoxina difere destes, por não ser de natureza protéica, ser extremamente resistente ao calor e apresentar uma toxicidade cerca de 30 vezes maior, sendo portanto necessárias concentrações menores que aquelas encontradas por HIRAMATSU; HATAKEYAMA; MINAMI(1980) e HATAKEYAMA, HIRAMATSU e MINAMI(1981) quando determinaram a dose letal de uma enzima tóxica encontrada nas glândulas submandibulares de camundongos machos.

Outros estudos serão necessários para se elucidar o mecanismo de ação das sialotoxinas, bem como a ca-

raacterização final de seus constituintes o que poderá trazer importantes informações a respeito da fisiologia das glândulas salivares.

5. CONCLUSÕES

As condições experimentais, a análise e a descrição dos resultados obtidos neste estudo, sobre a Sialotoxina III, subsidiam as seguintes conclusões:

1- A Sialotoxina III, produzida pelas glândulas submandibulares de camundongos machos, promove, efetivamente, a morte de camundongos machos e fêmeas.

2- Existe diferença na DL_{50} da Sialotoxina III, entre camundongos machos e fêmeas normais, sendo as fêmeas muito mais sensíveis que os machos, sendo que a DL_{50} é de 133,90894 ug/kg de peso corporal para os machos normais, enquanto a DL_{50} para fêmeas normais é de 38,35750 ug/kg de peso corporal.

3- Os camundongos machos orquidectomizados apresentam uma sensibilidade maior aos efeitos tóxicos da Sialotoxina III quando comparados aos machos normais, com uma DL_{50} significativamente menor, $DL_{50} = 56,416461$.

4- A administração de testosterona em camundongos fêmeas normais tornam-nas mais resistentes, protegendo-as parcialmente, dos efeitos tóxicos da Sialotoxina III, sendo a $DL_{50} = 77,72368$ ug/kg de peso.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. AFONSKY, D. Effects of desativation in reproduction. J. dent. Res., 37(5): 365, 1958.
02. AGOSTINHO, S.M.S. Sialotoxina I: Determinação da DL₅₀ Suas Manifestações Biológicas e Sua Interação com a Testosterona e Estradiol em Camundongos. Piracicaba, 1987. [Tese (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP].
03. ALMEIDA, L.A.M. Efeitos da Sialotoxina I Sobre o Hemograma e Órgãos Hematopoéticos (Fígado e Baço) de Camundongos Fêmeas. Piracicaba, 1991. [Tese (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP].
04. ANGELETTI, P.V.; SALVI, M.L.; CAPANI, F.; FRATO, L. Granulocytosis - inducing factor from the mouse submaxillary gland. Biochim. biophys. Acta, 111: 344-6,
05. ARCIERI, R.M. & MARTINELLI, C. Influence of salivary glands extirpation on procreation in rats. Tohoku J. exp. Med., 121: 105-10, 1977.
06. ARRUDA VEIGA, M.C.F. and PINHEIRO, C.E. Purification and Characterization of one Peptide From Male Mice Submandibular Glands With Toxic Effect on Rat. Kid

ney. Arq.Biol.Tecnol., 31(4): 575-85, 1988.

07. ARRUDA VEIGA, M.C.F.; TEIXEIRA, D.; BOAVENTURA, M.
Effect of "Parotin" four fractions (I, II, III and IV) on the glucose captation by epididymal fat tissues of normal and diabetic rats. FOMEAN, 98(3): 79-82, 1989.
08. _____; _____; PINHEIRO, C.E.; GUIMARÃES, A.; JOSÉ, J.L. Effects of "Parotin" four fractions (I, II, III and IV) on the oxygen consumption by Epididymal Fat Tissues of Normal and Diabetic Rats. Arq.Biol.Tecnol., 32(3): 589-601, 1989.
09. ATTARDI, D.G.; 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-hidroxysteroid dehydrogenase activity rat submaxillary glands. Its relation to sex and age. Endocrinology, 90(6): 1643-6, 1972.
11. BARKA, T. Partial purification of a mitotic supressor from the salivary gland. Expl.molec.Path., 18: 225-33, 1973.

12. BIXLER, D.; MUHLER, J.C.; SHAFER, W.G. The effects of castration, sex hormones and desativation on dental caries in the rat. J.dent.Res., 34(6): 889-34, 1955.

13. 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].

14. 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.

15. BYYNY, R.L.; ORTH, D.N.; COHEN, S. Radioimmunoassay of epidermal growth factor. Endocrinology, 50: 1261, 1972.

16. CARPENTER, G. & COHEN, S. Epidermal growth factor. A.Rev.Biochem., 48: 193, 1979.

17. 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: 306-11, 1960.

18. COHEN, S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein incisor eruption and eyelid opening in new born animal. J.Biol.Chem., 237(5): 1552-62, 1962.
19. COX, C.P. & QUISSEL, D.O. A novel platelet activating protein derived from rat submandibular glands Thromb.Res., 39(3): 343-53, 1985.
20. DOI, K.; KAWARA, A.; FUJII, S.; MATSUURA, M.; YOSHIDA, Y.; KISAIA, Y.; YOSHIDA, M.; KANEKO, S.; BABA, S. Insulin-Like substance in saliva. Iga Kunoayumi, 106: 477-8, 1978.
21. DOTTAVIANO, E.J.; RAMALHO, A.C.; NEGREIROS DE PAIVA, C.E. Glândulas salivares e reprodução estudo preliminar. Reunion de la Asociación Latinoamericana de investigaciones en reproducción humana, VI. (AL) (RH) Lima, 1974.
22. EKSTROM, S. & 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.
23. FINNEY, D.J. Statistical methods in biological assay. London, Griffin, 1964.
24. _____ . "Probit Analysis", 3rd Edition, Cambridge University Press, New York, 1971.

25. FLEMING, M.S. Pancrease and parotin. Endocr.jap., 9: 41-56, 1962.
26. PRATTI, L.; CENCI, 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: 905-12, 1976.
27. GINN, J.T. & VOLKER, J.F. Rustings indesalivated albino rats. Endocrinology, 31: 282-3, 1942.
28. GLASMAN, F. Actividad endocrina de las glandulas salivares. Semana med., 10: 1287-90, 1964.
29. GRESIK, E. & BARKA, T. Immunocytochemical localization of epidermal growth factor in mouse submandibular gland. J.Histochem.Cytochem., 25: 1027-35, 1977.
30. _____ & _____. Immunocytochemical localization of epidermal growth factor in the developing submandibular gland of the mouse. Am.J. Anat. 151: 1, 1978.
31. GUIMARÃES, A.; TEIXEIRA, D.; VIZIOLI, M.R.; EL-GUINDY, M.M.; CURY, J.A. Effects of salivary gland active principle (Parotin) on glicaemic level and hepatic glicogen content in aloxan-diabetic rats. Archs. oral Biol., 25: 11-3, 1980.

32. GUIMARÃES, A.; TEIXEIRA, D.; VIZIOLI, M.R. Efeitos da parotidectomia sobre o nível glicêmico e o teor de glicogênio hepático. Revta bras. Pesq. méd.Biol., 12(1): 53-61, 1979.
33. HALMOS, T. & SOMMOGYI, B. Investigations on the correlation between human saliva and carbohydrate metabolism. Nagy Belor Arch., 15: 220-5, 1962.
34. HATAKEYAMA, K.; HIRAMATSU, M.; MINAMI, N. Lethal factor in the male mouse submandibular gland. Can.J.Physiol.Pharmac., 59: 1134-8, 1981.
35. HILL, T.J. 1955. Apud GLASMAN, F., op.cit.ref. 28.
36. HIRAMATSU, M.; HATAKEYAMA, K.; MINAMI, N. Male mouse submaxillary gland secretes highly toxic proteins. Experientia, 36: 940-2, 1980.
37. HOSHINO, K.; DECKER, R.F.; MOLNAR, F.; KIM, Y. T. Hipoglicæmic effects of salivary duct ligation upon diabetes mellitus in mice. Archs oral Biol., 21: 105-11, 1976.
38. _____ & LIN, C.D. Transplantability of salivary of mice and its lethal effects on the host. Anat.Rec., 160: 474, 1968.
39. _____ & _____. Lethal factor released

- from submandibular grafts in mice. Can.J.Physiol. Pharmac., 97: 329, 1969.
40. HOSHINO, K. & LIN, C.D. Selective effects of testosterone and isoproterenol upon regenerating submandibular gland. Isografts in BALB/C mice. Anat. Rec., 167: 489-96, 1970.
41. 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.
42. _____; _____; LIN, C.D. Effect of ligation of the mouse submandibular excretory duct on the production of the lethal factor. Anat. Rec., 172: 455-6, 1972.
43. ITO, Y. Biochemical studies on salivary gland hormone. Endocr.Jap., 1: 1-50, 1954.
44. _____. Parotín: a salivary gland hormone. Ann N.Y.Acad.Sci., 85: 228-310, 1960.
45. JOHNSON, G.; KEKEH, J.; VAPI, M. Sur l'activité endocrine des glandes salivaires sous-maxillaires sensu stricto de la souris. Annls Endocr., 31: 573-7, 1970.

46. JONHSTON, J. Econometric methods, Third Edition, McGraw-Hill Book Company, New York, 1984, 568p.
47. JUDGE, G.G. Introduction to the theory and practice of econometrics, Second Edition, Wiley, New York, 1988, 1024p.
48. JUNQUEIRA, L.C.; FAJER, A.; RABINOVITCH, M.; FRAN KENTHAL, L. Biochemical and histochemical observations on the sexual dimorphism of mice submaxillary glands. J.Cell comp.Physiol., 34: 129-58, 1949.
49. KASAYAMA, S.; YOUSHIMURA, M.; OKA, T. Regulation by thyroid hormones and androgen of epidermal growth factor synthesis in the submandibular gland and its plasma concentration in mice. J.Endocr., 121: 269-75, 1989.
50. KASHIMATA, M.; HIRAMATSU, M.; MINAMI, N. Biochemical properties of growth factor in the mouse kidney. Comp. Biochem.Physiol., 86b(4): 651-3, 1987.
51. KATAGIRI, S. & HIGASHITO, T. Histologische studien uber die einflusse der speichel dresen eistirpation auf die wirkung des geschle cthormones. Trans.Soc.Path.jap. , 30: 252-60, 1940.
52. KEMP, A.; MELLOW, L.; SABBADINE, E. Inhibition of inter-lerkin 1 activity by a factor in submandibular glands of rats. J.Immun., 137(7): 2245-51, 1986.

53. LACASSANE, A. Dimorfisme sexual de la gland sous -
maxillaire chez la souris. C.r.Soc.Biol., 133:
180-1, 1940.
54. LAWRENCE, A.M.; KIRSTEIN, L.; HOJUART, S.; RUBIN, L;
POLOYAN, V. Salivary gland glucagon: a potent ex
tra pancreatic hiperglycemic factor. Clin. Res.,
23: 563A, 1975.
55. LEVI-MONTALCINI, R. & ANGELETTI, P.V. Hormonal con-
trol of the NGF content in the submaxillary glands
of mice. In salivary glands and their secretions
Edited by L.M. Sreenby and J. Meyer. Pergamon
Press Book, The Macmillan Company, New York, pp.
129-39, 1964.
56. LIN, C.D. & HOSHINO, K. Testosterona dependency of
the lethal factor in mouse submandibular gland iso-
grafts. Can.J.Physiol.Pharmac., 47: 335, 1969.
57. _____ & _____. Hemorrhagic phenomena cau-
sed in the host mice by submandibular gland iso-
grafts from males. Proc.Can.Fed.Biol.Soc., 12:
8-21, 1969.
58. _____ & _____. Strain differences in the
lethal factor exerted by submandibular glands
transplanted from male mice. Experientia, 26: 753,
1970.

59. LIN, C.D. & HOSHINO, K. Testosterone protection against the lethal factor in grafts of mouse submandibular gland. Toxicol, 9: 299-300, 1971.
60. LIUZZI, A. & ANGELETTI, P.V. Studies on the toxic effects of mouse submaxillary gland extracts. Experientia, 24: 1034, 1968.
61. LOURIDES, O.; THEODOSSIOU, A.; BAZOPOULOU KIRKANIDAE, E; DEMETRIOU, N. Total sialoadenectomy effect on the uterus and ovaries of the albino rat. Odontoiatrica, 5: 258-60, 1970.
62. 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.
63. MENGHI, G.; LAI, G.; PICIOTTI, D.; MATERAZZI, G. Characterization and anticoagulants properties of rodent sublingual gland extracts. Cell.Molec.Biol., 34(3): 279-86, 1988.
64. MIYATA, M.; YAMAMOTO, Y.; YAMAGUCHI, M. Plasma glucagon after total resection of the pancreas in man. Proc. Soc.exp.Biol.Med., 152: 540-3, 1976.
65. MURAKAMI, K.; TANIGUCHI, H.; BABA, S. Presence of insulin like immunoreactivity and its biosynthesis in rat and human parotid gland. Diabetologia, 22: 358-61, 1982.

66. OGATA, T. The internal secretion of salivary glands. Endocr.jap., 2: 247-61, 1955.
67. _____; ITO, Y.; NAZAKI, Y.; OKABE, S. Studies on the salivary gland hormones. Reports I-III. 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. (65).
68. PASQUINI, F.A.; PETRIS, G.; SBARAGLIA, G.; SCOPPELLITTI, G.; CENCIANO, G.; FRATI, F. Biological activities in the granules isolated from the mouse submaxillary gland. Expl.Cell.Res., 86, 223-36, 1974.
69. PINHEIRO, C.E. Caracterização química e biológica das Sialotoxinas. Simpósio Anual da Academia de Ciências do Estado de São Paulo, X. Resumos - São Paulo, 1985. p. 17.
70. _____. Sialotoxins: a family of toxic substances isolated from the submandibular glands of the male mice. Rev.Odont.USP, 2 (3): 157-60, jul/set., 1988.
71. SCHAB, M.E.; STOCKEL, K.; THOENEN, H. Immunocytochemical localization of nerve factor (NGF) in the submandibular gland of adult mice by light and electron microscopy. Cell. Tissue

Res., 169: 289-99, 1976.

72. SHACKLEFOR, J.M. & WILBORN, W.H. Structural and histochemical diversity in mammalian salivary glands. Ala.J.Med.Sci., 5: 180-203, 1968.
73. 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.
74. SMITH, R.J. & FROMMES, 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.
75. SREEBNEY, L.M. Studies of salivary glands proteases. Ann.N.Y.Acad.Sci., 85: 182, 1960.
76. _____; 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.
77. 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.

78. TAKEDA, T.; YAMASAKI, Y.; YAMABE, H.; SUZUKI, Y.; HAEBARA, H.; I.RINO, T.; GROLIMAN, A. Atrophy of the lymphoid tissues of mice induced by extracts of the submaxillary gland. Proc. Soc. exp.Biol.Med., 126: 212-6, 1967.
79. TAKIZAWA, N. A pathological research of the internal secretion on the salivary glands. Acta path.jap., 4: 129-66, 1954.
80. 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.
81. TEIXEIRA, D.; GUIMARÃES, A.; CURY, J.A. Effects of the active principle from salivary glands parotín on the glycaemic of diabetic rats. Archos Biol.Tecnol., 28(3): 363-9, 1985.
82. WERLE, E. & RODEN, P. Ueber das vorkommen von Kalikrein in der speicheldrüsen und in mundschleimhaut. Biochemie, 286: 213, 1936.
83. YONG, M.; OGER, S.; ASDOURIAN, H.; AMOS, H.; AMASON, B.G.W. Secretion of nerve growth factor by primary chick fibroblast cultures. Science, 187: 361, 1975.

7. RESUMO

A intensão na realização desse trabalho foi determinar, através do método de probitos, a DL₅₀ da Sialotoxina III e avaliar suas manifestações biológicas quando administrada a camundongos machos normais, fêmeas normais, machos orquidectomizados e fêmeas previamente tratadas com testosterona.

Foram utilizados 330 camundongos (Mus Musculus albinus), sendo 170 machos e 160 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:- Camundongos machos normais - constituído de 100 animais, redistribuídos em 10 subgrupos de 10 camundongos cada, nos quais foram administrados Sialotoxina III, via I.P. nas concentrações de 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 e 160 ug/kg de peso corporal.

GRUPO II:- Camundongos fêmeas normais, constituído de 70 animais, redistribuídos em 7 subgrupos de 10 camundongos cada, nos quais foram administrados Sialotoxina III, via I.P. nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 55 e 60 ug/kg de peso corporal.

GRUPO III:- Camundongos machos orquidectomizados constituído de 70 animais, redistribuídos em 7 subgrupos de 10 camundongos ca-

da, nos quais foram administrados Sialotoxina III, via I.P. nas concentrações de 30, 40, 45, 50, 60, 70 e 80 ug/kg de pêsso corporal.

GRUPO IV:- Camundongos fêmeas tratadas com testosterona, constituído de 90 animais, redistribuídos em 9 subgrupos de 10 camundongos cada, nos quais foram administrados Sialotoxina III, via I.P. nas concentrações de 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 e 120 ug/kg de pêsso corporal.

Os grupos foram observados durante o período de quatro horas após a administração da Sialotoxina e suas manifestações biológicas foram analisadas assim como a taxa de mortalidade foi anotada.

Chegou-se a conclusão que a toxina produzida pelas glândulas submandibulares de camundongos machos, denominado de Sialotoxina III, promove, efetivamente, a morte em camundongos machos e fêmeas, sendo as fêmeas muito mais sensíveis que os machos.

Os machos orquidectomizados e fêmeas tratadas com testosterona, mostraram diferenças nas reações apresentadas, bem como nas taxas de mortalidades em relação as doses de sialotoxina administradas, quando comparadas com os Grupos I e II.

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

Por outro lado, as fêmeas tratadas com testosterona, apresentaram menor sensibilidade a esta toxina, indicando uma DL_{50} significativamente maior que as fêmeas normais, demons-

trando que este hormônio possui uma ação protetora contra os efeitos tóxicos da sialotoxina, oferecendo subsídio para se concluir que se trata de uma substância andrôgeno-dependente.