

MIRIAM CAMPOS BOAVENTURA

EFEITOS DA SIALOTOXINA I SOBRE A INCORPORAÇÃO  
DE GLICOSE E CONSUMO DE OXIGÊNIO PELO  
DIAFRAGMA DE RATOS  
(ESTUDOS "IN VITRO")

TESE APRESENTADA À FACULDADE  
DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
CAMPINAS, PARA OBTENÇÃO DO  
GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS -  
ÁREA DE FARMACOLOGIA.

PIRACICABA

- 1988 -

B63e

9931/BC

MIRIAM CAMPOS BOAVENTURA

EFEITOS DA SIALOTOXINA I SOBRE A INCORPORAÇÃO  
DE GLICOSE E CONSUMO DE OXIGÊNIO PELO  
DIAFRAGMA DE RATOS  
(ESTUDOS "IN VITRO")

TESE APRESENTADA À FACULDADE  
DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
CAMPINAS, PARA OBTENÇÃO DO  
GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS -  
ÁREA DE FARMACOLOGIA.

PIRACICABA

- 1988 -

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus irmãos, irmãs e a todos os seus,  
pelo apoio, carinho, e pela segurança que  
você representam.

Ao Elias, a quem dedico esta Tese, pelo  
amor e carinho, presença importante na  
minha formação intelectual e visão de  
mundo.

Aos meus filhos, Adriana e Rodrigo,  
dos quais me tornei grande devedora,  
tentando conciliar o  
inconciliável.

Ao Professor Dr. Décio Teixeira, Titular da Disciplina de Fisiologia e Biofísica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela prontidão com que aceitou a orientação desse trabalho, e pela disponibilidade que sempre demonstrou no decorrer de sua realização.

A G R A D E C I M E N T O S

- Ao Professor Doutor Simonides Consani, Digníssimo Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pelo apoio e incentivo 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 valiosa colaboração, através dos conhecimentos transmitidos, úteis ao desenvolvimento do nosso trabalho, assim como, pelo fornecimento da Sialotoxina I, possibilitando a realização desta pesquisa;
  
- 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, pelo apoio inestimável, durante o desenvolvimento deste trabalho;
  
- 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, pelas sugestões e colaboração na execução das técnicas bioquímicas;

- A Professora Doutora Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga, Professora Doutora Assistente da Disciplina de Fisiologia e Biofísica do Departamento de Ciências Fisiológicas, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pelas sugestões e apoio recebido durante toda a realização da pesquisa;
- Ao Professor Doutor Moustafa Mohammed El-Guindy, Professor Adjunto da Disciplina de Bioquímica do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pela amizade e atenção, pelos conhecimentos transmitidos e pelo solícito acompanhamento desde o período de graduação;
- 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;
- A professora Sonia Maria dos Santos Agostinho, pela amizade, companheirismo e apoio;
- Ao Professor Doutor Benjamim Garcia de Matos, Assessor Jurídico da Universidade Metodista de Piracicaba-UNIMEP - e Professor de Direito Civil, pela colaboração na revisão deste trabalho;
- Ao Professor Doutor Amado Leonízio de Azevedo, Chefe do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia

de Piracicaba, UNICAMP, pela atenção e permissão no uso dos aparelhos utilizados nesta pesquisa;

- Ao Professor Doutor Samir Tufic Arbex, Coordenador Geral dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pelo apoio recebido;
- Ao Professor Doutor Thales R. Mattos Filho, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Farmacologia, pelo apoio e atenção;
- À Professora Doutora Maria de Lourdes G. da Gama, Professora Titular do Curso de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica desta Faculdade-UNICAMP; pelo valioso apoio, e empréstimo de material, gentilmente cedidos, para a realização deste trabalho;
- Ao Professor Doutor João Leonel José, Professor Livre-Docente do Departamento de Ciências Fisiológicas desta Faculdade, pelo estímulo sempre presente;
- Aos Professores da Área de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, Doutor Jonas Vaz de Arruda; Doutor Eduardo Dias de Andrade; Doutor José Ranali pelos ensinamentos transmitidos;
- Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, Srs. Carlos

Alberto Aparecido Feliciano; Ulysses de Oliveira Martins e Ma  
risa de Jesus Carlos Soares pela colaboração técnica; Waldomi  
ro Vieira Filho pela confecção dos gráficos; Srs. Moysés José  
Maria da Silva e Claudio Otero pelo apoio dado;

- A senhora Ivany do Carmo G. Gerola, Bibliotecária Chefe da Fa  
culdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pela revisão  
bibliográfica;
- Ao Professor Almir de Souza Maia, Reitor da Universidade Met  
odista de Piracicaba - UNIMEP e Diretor Geral do Instituto Edu  
cacional Piracicaba, pela amizade sempre presente e de um va  
lor inestimável na nossa vida, pelo apoio, atenção e estímulo  
tanto na realização desta pesquisa quanto na carreira do  
cente que exercemos naquela Universidade;
- Ao Professor Doutor Raul Cavalheiro, D.D. - Presidente do Conse  
lho Diretor do Instituto Educacional Piracicabano, pela aten  
ção a mim dispensada em relação às minhas solicitações enquan  
to professora da UNIMEP;
- A todos aqueles que direta ou indiretamente possibilitaram a  
execução desta pesquisa.

# C O N T E Ú D O

	Página
<u>Capítulo I</u>	
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Proposição .....	8
<u>Capítulo II</u>	
2. REVISTA DA LITERATURA .....	10
2.1. Glândulas Salivares e Seus Fatores Ativos .....	10
2.2. Glândulas Salivares e Seus Fatores Letais .....	16
2.3. Importância Biológica das Glândulas Salivares e Sua Interação com o Metabolismo de Carboidratos .....	24
2.4. Consumo de Oxigênio e Incorporação de Glicose "In Vitro" .....	31
<u>Capítulo III</u>	
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	40
3.1. Determinação do Consumo de Oxigênio .....	40
3.2. Determinação da Incorporação de Glicose .....	48
3.3. Tratamento Estatístico .....	52
<u>Capítulo IV</u>	
4. RESULTADOS .....	54
4.1. Consumo de Oxigênio .....	54
4.2. Incorporação de Glicose .....	62

Capítulo V

5. DISCUSSÃO .....	71
--------------------	----

Capítulo VI

6. CONCLUSÕES .....	83
---------------------	----

Capítulo VII

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	85
-------------------------------------	----

Capítulo VIII

8. RESUMO .....	106
-----------------	-----

Capítulo IX

9. APÊNDICE .....	110
-------------------	-----

Capítulo I

INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

A importância fisiológica das glândulas salivares tem sido demonstrada através de inúmeras pesquisas, sendo que a maioria delas refere-se à sua atividade exócrina. Entretanto, a partir do final do século passado, procurou-se também relacioná-las como órgãos de secreção interna.

Assim, tem sido observado que as glândulas salivares, além de apresentarem interações endócrinas com diversas outras glândulas, também interferem na atividade metabólica de diversos órgãos.

Embora alguns trabalhos já tivessem revelado a estreita relação entre as glândulas submandibulares e parótidas com o metabolismo de carboidratos (FARRONI, 1911; UTIMURA, 1927; HIKI et alii, 1929, 1930, 1932 e 1934), somente a partir de 1934, com os trabalhos de OGATA, criou-se a possibilidade de analisar melhor esta relação.

Dessa forma, procurando demonstrar a inter-relação entre as glândulas salivares e o pâncreas, TAKIZAWA (1954) e OGATA (1955) observaram que a ausência das glândulas parótidas e submandibulares induzia a uma hiperplasia das células beta do pâncreas.

TAKADORO et alii (1955) verificaram em cães que a curva de tolerância à glicose era aumentada pela administração do Parotin seguida da ingestão de glicose.

Na mesma época, HILL (1955) obteve das glândulas parótidas bovinas um fator hiperglicemiante extremamente ativo em ratos.

HALMOS & SOMOGIY (1962) demonstraram um sinergismo entre pâncreas e glândulas salivares, relatando a presença de uma hipertrofia compensadora das parótidas ao curso das hipofunções das ilhotas de Langerhans.

Ações hipoglicemiantes de extratos de glândulas salivares têm sido relatadas (FLEMING, 1962; HOSHINO et alii, 1976; GUIMARÃES et alii, 1979).

Desse modo, vários estudos têm concorrido para demonstrar a influência das glândulas salivares no metabolismo de carboidratos.

A presença de numerosos peptídeos biologicamente ativos, incluindo vários hormônios, nas glândulas salivares chamou a atenção de muitos pesquisadores que procuraram estabelecer de maneira mais objetiva a importância destas glândulas com atividade de órgãos endócrinos.

Várias pesquisas indicaram que alguns peptídeos produzidos por estas glândulas são similares, se não idênticos, aos hormônios produzidos pelas células endócrinas nas ilhotas pancreáticas e trato gastrointestinal.

Assim, OGATA et alii (1944 e 1945) e ITO (1954) ao injetarem distintas frações de parótidas bovinas em coelhos, observaram que uma delas acelerava o crescimento de tecidos duros e reduzia os níveis séricos de cálcio, a qual recebeu a denominação de Parotin.

TAKIZAWA (1954), OGATA (1955) e ITO (1960) demonstraram que as glândulas parótidas eram a principal fonte de uma substância, por eles denominada de "Hormônio Salivar Pa<sub>ro</sub>tin", discretamente auxiliadas pelas glândulas submandibulares, e que as glândulas sublinguais não participavam dessa função.

A existência de glucagon imunorreativo nas glândulas salivares de ratos foi descrita pela primeira vez por SILVERMAN & DUMBAR (1974).

Outras pesquisas confirmaram também a presença deste fator nas glândulas salivares de humanos, o qual difere do glucagon pancreático ou gastrointestinal, por ser insolúvel em álcool, como também por ser uma molécula de alto peso molecular.

Desse modo, LAWRENCE et alii (1975) constataram e isolaram um fator hiperglicemiante, encontrado nas glândulas submandibulares de camundongos, ratos e coelhos, que foi denominado de glucagon salivar. A administração intravenosa desse fator, produziu efeito comparável ao obtido com o do glucagon pancreático. O efeito hiperglicêmico, provocado pelo glucagon salivar era mais prolongado e os estímulos básicos que promoviam a secreção do glucagon pancreático provocavam também a liberação do glucagon salivar.

MYATA, YAMAMOTO & YAMAGUCHI (1976) verificaram que a concentração plasmática de glucagon permanecia normal em alguns pacientes submetidos à pancreatectomia.

A presença de uma substância semelhante à

insulina na saliva humana, foi detectada por DOI et alii (1978), denominada de "insulin-like", cuja concentração aumentava após a administração oral de glicose.

MURAKAMI, TANIGUCHI, & BABA (1982) demonstraram, através da técnica de filtração em gel imunorreativo a presença de "insulin-like" no extrato de parótidas, de ação semelhante à insulina pancreática. Esses autores, utilizando-se de anticorpos anti-insulina, confirmaram, "in vitro", a sua biossíntese nas glândulas parótidas humanas e de ratos.

Confirmando-se, ainda, a teoria endócrina das glândulas salivares, PHILLIP, SMITH & PATEL (1984), através do uso de técnicas de radioimunoensaio e imunocitoquímica, concluíram que as glândulas parótidas de ratos machos possuem uma população de células que produzem o "insulin-like". Observaram que estas células produtoras de insulina se encontram principalmente ao longo dos ductos intercalares, e em menor quantidade, nos acíños. Esses dados sugerem que estas glândulas possam ser uma fonte adicional extra-pancreática de insulina.

Muitos outros fatores foram isolados das glândulas salivares, provenientes, na sua maioria, das glândulas submandibulares de camundongos machos. Entretanto, muitos deles ocorrem também nas glândulas submandibulares de outras espécies (ratos, cães, bois, etc.).

Outras pesquisas têm sido feitas no sentido de se determinar as características químicas e biológicas de polipeptídeos biologicamente ativos, isolados das glândulas salivares, bem como sua localização, síntese e seu possível papel fisiológico.

Estes fatores têm sido agrupados em diferentes categorias: 1º) os que atuam sobre o crescimento e a diferenciação celular; 2º) os relacionados com a homeostase; 3º) os relacionados com a regulação intracelular e 4º) os relacionados com a digestão (BARKA, 1980).

Assim, COHEN (1960) isolou um fator de crescimento nervoso (NGF) do extrato de glândulas submandibulares de camundongos. O mesmo COHEN (1962) isolou também destas glândulas um outro polipeptídeo, o fator de crescimento epidermal (EGF).

Dentre outros princípios ativos isolados das glândulas salivares, observam-se: o fator hipertensivo (WERLE, VOGEL & GOLDEL, 1957); o fator de crescimento das células cardíacas (BAST & MILLS, 1963); a renina parcialmente purificada (WERLE; TRAUTSCHOLD & SCHMAL, 1963); o fator de crescimento de células do tubo neural (ADLER & NARBAITZ, 1965) e o fator que estimula a proliferação de células epiteliais (JONES, 1966).

Com o propósito de se isolar e identificar alguns fatores tóxicos das glândulas submandibulares de camundongos machos, inúmeras pesquisas foram realizadas.

A confirmação da existência de fatores tóxicos salivares com efeito letal foi possível pelos trabalhos descritos por HOSHINO & LIN (1968, 1969 e 1970), LIN & HOSHINO (1969) e LIN & HOSHINO (1970) através de transplantes de glândulas salivares de camundongos machos e fêmeas (previamente tratadas com testosterona) para animais adultos, de várias espécies, incluindo camundongos, ratos, coelhos e roedores "Mongolian" e, que devido às suas ações, esses fatores foram denominados de fatores letais.

O fator letal é andrôgeno-dependente (LIN & HOSHINO, 1969) e parece ser produzido nos túbulos secretórios das glândulas submandibulares (HOSHINO & LIN, 1970) e abolido pela ligação dos ductos excretórios destas glândulas, como foi demonstrado por HUANG, HOSHINO & LIN (1972).

PINHEIRO (1985) isolou das glândulas submandibulares de camundongos machos várias substâncias de natureza tóxica com atividade letal e devido a esta propriedade e à sua origem, foram denominadas de Sialotoxina I, II, III e IV.

Recentemente, PINHEIRO (1985) verificou que do ponto de vista químico e estrutural as Sialotoxinas\* diferem de outras substâncias tóxicas descritas das glândulas submandibulares, consideradas proteínas. Pelos seus resultados, esse autor sugere que as Sialotoxinas são substâncias complexas, de baixo peso molecular, contendo radicais aromáticos e carboidratos.

A descoberta das Sialotoxinas despertou o interesse da Área de Fisiologia e Biofísica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP, iniciando uma série de trabalhos com estas toxinas, como mais uma linha de pesquisa a ser desenvolvida.

Assim sendo, AGOSTINHO (1987) demonstrou uma significativa diferença na  $DL_{50}$  da Sialotoxina I, entre camundongos machos e fêmeas, sendo as fêmeas mais sensíveis que os machos. Foram observadas também diversas manifestações clínicas nestes animais, como: hiper-excitabilidade, apatia, poliúria, convulsões e morte.

---

\* Até então (PINHEIRO, 1985; AGOSTINHO, 1987) as Sialotoxinas eram consideradas como peptídeos.

Os resultados até agora obtidos servem como incentivo, no sentido de se pesquisar o papel biológico das Sialotoxinas, permitindo ampliar os conhecimentos sobre a importância fisiológica das glândulas salivares.

Por outro lado, inúmeras pesquisas sobre as alterações no metabolismo de carboidratos, "in vitro", têm utilizado o músculo diafragma de ratos (GEMMILL, 1940 e 1941).

O diagrama foi empregado também por GEMMILL & HAMMAN (1941); HECTER, LEVINE & SOSKIN (1941); STADIE & ZAPP (1947); KRAHL & CORI (1947); CORKILL & NELSON (1947); VERZAR & WENNER (1948) e VILLEE & HASTINGS (1949).

A taxa de captação de glicose pelo diafragma de ratos "in vitro", sob várias condições experimentais, sugere que este músculo serve como uma medida da atividade do sistema hexoquinase (WALAAS & WALAAS, 1952; KIPNIS & CORI, 1959).

Foi verificado também que o diafragma de rato é um músculo sensível às pequenas concentrações de insulina no meio, de tal modo que estudos realizados com este tecido, "in vitro", têm fornecido subsídios sobre o modo de ação da insulina (RAFAELSEN, VILMA & RENOLD, 1965).

Assim sendo, o diafragma ainda continua sendo utilizado como uma preparação viável aos estudos que envolvem captação, penetração e utilização de glicose, sob várias condições experimentais, como demonstram os trabalhos de WARDZALA & JEANRENAUD (1981) e WANG (1985).

### 1.1. Proposição

Estudos realizados sobre a atividade respiratória de diferentes tecidos, através do sistema manométrico e da incorporação de glicose, "In Vitro", em presença de diferentes substâncias, têm contribuído com importantes subsídios para uma melhor compreensão do metabolismo de carboidratos.

Desse modo, tentando correlacionar o efeito tóxico da Sialotoxina I com o metabolismo de carboidratos, propusemo-nos a analisar "In Vitro":

1. Os efeitos da Sialotoxina I sobre o consumo de Oxigênio, pelo diafragma de ratos;
2. Os efeitos da Sialotoxina I sobre a incorporação de glicose, pelo diafragma de ratos.

Capítulo II

REVISTA DA LITERATURA

## 2. REVISTA DA LITERATURA

### 2.1. Glândulas Salivares e Seus Fatores Ativos

A partir da descoberta da calicreína nas glândulas salivares por WERLE & 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.

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 do que nas fêmeas.

A produção de proteases andrôgeno-dependentes nas glândulas submandibulares também foi descrita por SREEBNY et alii (1955) e SREEBNY (1960).

A presença da ribonuclease nos túbulos granulosos das glândulas submandibulares de camundongos foi demonstrada por MAYNER & ACKERMAN (1963).

Foram isoladas, das glândulas submandibulares de ratos e camundongos, diferentes enzimas, ou seja: a) quatro a seis isoenzimas de "trypsin-like" (EKFORS et alii, 1967; EKFORS et alii, 1972; EKFORS & HOPUSU-HAVU, 1972) e duas proteases A e D (SCHENKEIN et alii, 1969, 1974 e 1977), tendo sido demonstra-

do que essas enzimas, além de hidrolisarem as ligações arginil das proteínas, apresentavam atividades quimiolíticas, devendo estar relacionadas filogeneticamente com as calicreínas e não parecem ser andrôgeno-dependentes.

A grande atividade amilásica das glândulas submandibulares de camundongos foi observada por SWIGART et alii (1965), sendo maior nos machos.

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).

Dentre os diversos fatores produzidos pelas glândulas submandibulares de camundongos machos, o Fator de Crescimento Nervoso (NGF) é um dos mais estudados. Sua importância está relacionada ao desenvolvimento e manutenção da integridade funcional do sistema nervoso simpático e de alguns neurônios sensitivos (COHEN, 1960). A sua purificação, a partir da glândula submandibular de camundongos machos, foi precedida pela purificação do Fator de Crescimento Nervoso, extraído do veneno de cobra por COHEN & LEVI-MONTALCINI (1956).

LEVI-MONTALCINI & BOOKER (1960) observaram que a administração do NGF, parcialmente purificado, a ratos recém-nascidos e camundongos causou um acentuado retardo no crescimento e perda de peso.

Posteriormente, 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 também testosterona-dependente (LEVI-MONTALCINI & ANGELETTI, 1964).

Após a identificação do NGF, COHEN (1962) isolou e caracterizou das glândulas submandibulares de camundongos machos, outro polipeptídeo, denominado Fator de Crescimento Epidermal (EGF). Foi verificado que o EGF, quando injetado em ratos ou camundongos recém-nascidos, acelerava a erupção dos incisivos, como também, a abertura das pálpebras.

Foi observado que a concentração do Fator de Crescimento Epidermal (EGF) aumenta rapidamente após a puberdade (BYYNY; ORTH & COHEN, 1972), e que a sua identificação na glândula é possível em torno do 20º dia após o nascimento (GRESIK & BARKA, 1977 e 1978).

O EGF tem sido amplamente empregado, experimentalmente, devido sua importância no controle da replicação de células neoplásicas, como também devido a sua participação no sistema mediador-receptor para hormônios peptídicos (CARPENTER & COHEN, 1979).

ATTARDI et alii (1965) e ATTARDI & SCHESINGER (1967), identificaram e isolaram o Fator de Crescimento Mesodermal das glândulas submandibulares de camundongos, que apresenta o efeito de estimular o crescimento de células mesenquimais e promover alterações nas fibras musculares, com perda de miosina e cartilagens.

ADLER & NARBAITZ (1965) noticiaram a existência do Fator de Crescimento do Tubo Neural, observando que adições de extratos de glândulas submandibulares de ratos em

culturas de tubo neural de embriões de galinha, "In Vitro", contendo esse fator, resultavam na abertura dorsal com crescimento irregular e hiperplásico.

Posteriormente, JONES (1966) e JONES & ASWOOD-SMITH (1970), postularam que as glândulas submandibulares de camundongos eram responsáveis pela produção do Fator de Crescimento Epitelial o qual estimula a proliferação de células epiteliais em cultura de órgãos.

Fatores extraídos das glândulas submandibulares de camundongos e das glândulas parótidas bovinas, quando injetados em camundongos recém-nascidos e adultos, produziram crescimento hiperplásico e hipertrófico de células endoteliais em diferentes órgãos, e foram denominados de Fator Estimulante do Crescimento Endotelial (HOFFMAN et alii, 1976).

HUTSON, EVANS & FOWLER (1979) sugeriram que as glândulas submandibulares e sublinguais de camundongos secretam, através da saliva, uma substância que auxilia no processo de cicatrização, a qual foi denominada Fator Cicatricial.

O importante papel das glândulas salivares com a homeostase tem sido pesquisado e avaliado. Assim, WERLE, VOGEL & GOLDEL (1957) identificaram um princípio ativo nas glândulas submandibulares de camundongos, que provocava hipertensão de longa duração, quando injetado em camundongos ou em cachorros.

O fator hipertensivo foi também demonstrado por TURRIAN (1960), quando verificou que o extrato de glândulas submandibulares de camundongos, incubado com soro de rato, pro-

duzia um fator semelhante à angiotensina.

Do mesmo modo, COHEN et alii (1972) obtiveram das glândulas submandibulares de camundongos machos duas enzimas (glico-proteínas), na forma pura e estável, semelhantes à renina. As duas enzimas: renina A e renina C demonstraram uma potente atividade hipertensiva em ratos, diferindo um pouco em sua composição de aminoácidos.

A presença da renina também foi demonstrada em glândulas submandibulares de ratos por GUTMAN, LEVI & SHORR (1973).

As calicreínas das glândulas salivares, como fatores homeostáticos, foram também analisadas por HILTON (1970) e SCHACHTER (1970), quando demonstraram que as mesmas liberam, de um modo rápido e específico, um decapeptídeo biologicamente ativo, a lisil-bradicinina, potente enzima vasodilatadora, à qual tem sido atribuído importante papel na regulação local do fluxo sanguíneo das glândulas salivares.

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

A administração do Fator de Crescimento Nervoso, parcialmente purificado, das glândulas submandibulares de camundongos, reduziu o peso do timo, e o número de linfócitos do timo, nódulos linfáticos e baço (BUEKER & SCHENKEIN, 1964 e 1965).

Resultados opostos foram obtidos por DELAN-

GE (1975), quando observou que injeção de extrato de glândulas submandibulares e sublinguais causaram um estímulo imunológico nos tecidos linfóides, mas não atrofia do timo, baço ou nódulos linfáticos.

O Fator de Indução à Granulocitose foi constatado por ANGELETTI et alii (1965), que observaram que o mesmo, quando injetado em camundongos e coelhos, provocava um aumento no número de leucócitos polimorfonucleares, dentro de duas a três horas.

SHERIDAN & STANLEY (1971) descreveram a presença de um fator denominado de Fator Estimulante de Colônias da Medula Óssea. Demonstraram que a concentração desse fator era mais alta nas glândulas submandibulares de camundongos do que nos outros tecidos. Constararam também, através da sua purificação, que a sua concentração era de três vezes maior nas glândulas dos animais machos do que nas fêmeas.

As glândulas salivares de camundongos, de ambos os sexos, apresentam uma proteína típica com atividade de suprimir as mitoses celulares (BARKA, 1973).

ARRUDA VEIGA (1979) isolou um peptídeo do extrato de glândulas submandibulares de camundongos machos, observando que, quando injetado, subcutaneamente, possui efeitos capazes de provocar poliúria e albuminúria, além de uma série de alterações nas estruturas renais.

## 2.2. Glândulas Salivares e Seus Fatores Letais

A presença e a identificação de fatores tóxicos foram possíveis através da injeção de extratos de glândulas submandibulares de camundongos machos, adultos, como também através de transplantes das referidas glândulas.

Diante dos sintomas apresentados pelos animais injetados e/ou transplantados, concluiu-se de que deveriam existir pelo menos dois fatores tóxicos distintos, denominados: Fator Letal e Fator Hemorrágico.

Assim, COHEN (1962) obteve, através da administração do extrato de glândulas salivares de camundongos machos, adultos em camundongos recém-nascidos, uma série de alterações, nesses animais, induzidas por esse extrato. Assim, injeções subcutâneas, de 1 a 2% do extrato glandular, provocaram abertura precoce das pálpebras e erupção dos dentes incisivos de animais recém-nascidos, acentuada parada no crescimento e inibição no crescimento dos pelos. Entretanto, verificou-se que uma única injeção de 5% do extrato foi suficiente para provocar um efeito letal.

O mesmo pesquisador observou ainda que a administração dos extratos glandulares (10%) obtidos de glândulas submandibulares de camundongos fêmeas, adultas, não exerceu nenhum efeito no desenvolvimentos dos camundongos recém-nascidos e nem efeito letal.

Posteriormente, ANGELETTI et alii (1965)

utilizando-se de homogeneizados de glândulas submandibulares de camundongos machos, adultos, administrados em camundongos adultos, verificaram a presença de fator letal nestas glândulas.

LIUZZI & ANGELETTI (1968) observaram, através da diálise de extratos crus das glândulas submandibulares de camundongos machos, em tampão TRIS-HCl 50 mM, pH= 7,2, que não havia nenhuma mudança apreciável do nível de toxicidade sugerindo esse dado que o componente tóxico deveria estar associado a macromoléculas, possivelmente de natureza proteica. Na tentativa de localizar os componentes tóxicos desses extratos, realizou-se fracionamento em colunas "Sephadex G-100" pH neutro e verificaram que algumas frações eram acentuadamente mais tóxicas que outras, sendo a fração E a mais tóxica. Doses subletais dessa fração tiveram um efeito significativo no retardamento do crescimento de camundongos recém-nascidos. Foi verificado que a fração E é letal em altas doses; todavia, em doses menores, o seu efeito tóxico afeta alguns órgãos, principalmente o timo.

Numerosos trabalhos têm demonstrado diferentes tipos de fatores tóxicos das glândulas submandibulares de camundongos machos.

A presença, do fator letal nas glândulas submandibulares de camundongos machos foi observada também nos estudos realizados por HOSHINO & LIN (1968), quando verificaram que o transplante destas glândulas, em camundongos hospedeiros, produzia efeito letal.

Assim, esses autores verificaram que o

transplante de glândulas submandibulares de camundongos machos provocava 85% de morte em hospedeiros machos e 100% em hospedeiros fêmeas. Quando os doadores e hospedeiros eram fêmeas, todos os hospedeiros sobreviviam. Foi também demonstrado que transplantes de glândulas parótidas ou sublinguais não provocam morte de nenhum hospedeiro, independentemente do sexo.

HOSHINO & LIN (1969) demonstraram, também, que o efeito letal, além de não ser observado no transplante de glândulas submandibulares de camundongos fêmeas, o mesmo acontecia quando os doadores eram camundongos machos imaturos. Esses resultados sugeriram que a manifestação do fator letal deve estar diretamente relacionada à maturação sexual do doador macho (camundongo); e que, pode ser devido à influência dos hormônios sexuais masculinos. Observou-se, ainda, que a sialoadenectomia bilateral das glândulas submandibulares resultou em alta mortalidade dos camundongos machos imaturos e fêmeas adultas.

LIN & HOSHINO (1969) procurando demonstrar que, efetivamente, o fator letal é dependente da ação da testosterona, observaram que os transplantes de glândulas submandibulares 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 alterou os resultados dos transplantes glandulares obtidos sem a administração desse hormônio.

LIN & HOSHINO (1969) verificaram também, que

o transplante subcutâneo dessas glândulas salivares (submandibulares), em camundongos machos, provocava, além de outras reações, hematoma local e severa hemorragia sistêmica, o que não ocorria quando o enxerto era intraperitoneal. Observaram, ainda, que a taxa de mortalidade não teve diferença, significativa, entre os dois tipos de transplantes (subcutâneo e intraperitoneal), mas que os sintomas observados nos hospedeiros foram acentuadamente diferentes, particularmente, quanto ao fenômeno hemorrágico.

HOSHINO & 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 fêmeas tratados com testosterona, demonstraram efeito letal, quando retransplantados em novos hospedeiros fêmeas não-tratados.

LIN & HOSHINO (1970) analisaram o efeito do fator letal liberado de glândulas submandibulares de camundon-

gos, transplantadas em diferentes linhagens de camundongos. Observaram que ocorreu diferença na taxa de mortalidade entre as diferentes linhagens, assim como, os hospedeiros fêmeas apresentaram maiores taxas de mortalidade do que os hospedeiros machos.

Quando os doadores de glândulas submandibulares foram fêmeas, nenhum hospedeiro morreu, independente da linhagem testada.

LIN & HOSHINO (1971) investigaram, também, uma possível ação protetora da testosterona contra o efeito letal, em hospedeiros machos e fêmeas, intactos e sialoadenectomizados. Constataram a diferença na taxa de mortalidade entre camundongos intactos, de ambos sexos, que receberam enxertos glandulares, sendo o macho mais resistente.

Notaram, ainda, que esta taxa foi maior no hospedeiro macho, sialoadenectomizado, do que nos não-sialoadenectomizados. Quanto à testosterona, ela mostrou ter uma ação protetora maior nos hospedeiros fêmeas, tanto sialoadenectomizadas, quanto não-sialoadenectomizada. Os dados obtidos sugeriram que a diferença sexual na susceptibilidade do camundongo ao efeito letal pode ser atribuída à presença do hormônio androgênico nos camundongos machos.

HUANG, HOSHINO & LIN (1972) investigaram o efeito da ligação previa do ducto excretor de glândulas submandibulares na produção do fator letal, como também, sob o efeito da testosterona e isoproterenol em animais transplantados. Os dados obtidos revelaram que o efeito letal estava presente nas glândulas transplantadas três dias após a ligação do ducto excretor o que não ocorreu, após o oitavo dia de pós-operatório e

que pequenas quantidades de fator letal ainda foram detectadas seis semanas após a ligação do ducto excretor.

Esses autores demonstraram ainda que, com a administração da testosterona, após o transplante das glândulas, com seus ductos ligados, a intensidade do fator letal nestas, foi maior do que nas não-transplantadas, 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 significativamente aumentados em relação ao dos controles, em função da hipertrofia das células acinares, ocasionada pelo tratamento com o isoproterenol.

Investigações realizadas por HUANG et alii (1977) revelaram que existem diferenças na susceptibilidade ao fator letal, quando se compara a magnitude da letalidade desse fator entre diferentes espécies animais (camundongos, coelhos e roedores "Mongolian") e entre diferentes linhagens de camundongos, imaturos e adultos, machos e fêmeas.

Os resultados obtidos por estes autores, mostraram que os extratos liofilizados dos homogeneizados das glândulas submandibulares de camundongos machos adultos, foram letais não-somente aos camundongos, mas, também, às diferentes espécies animais testadas. Os camundongos apresentaram uma relativa resistência ao fator letal, enquanto os coelhos e roedores apresentaram uma considerável sensibilidade ao mesmo fator.

Ainda, através desses experimentos, foi demonstrado que o efeito letal das glândulas submandibulares é maior,

quando ocorre a sua administração sob a forma de homogeneizado do que quando transplantadas, sugerindo, esse dado, que o fator letal deve ser liberado, gradualmente, durante os transplantes.

HIRAMATSU, HATAKEYAMA & 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 agente alfa-adrenérgico e, que, ambos (extrato e saliva) foram altamente tóxicos para cobaias, ratos, 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 & MINAMI (1981) confirmaram os dados anteriores purificando um dos componentes tóxicos da saliva por focalização isoelétrica e cromatografia em DEAE Sephadex A-50, identificado como uma enzima com atividade semelhante à calicreína.

Esses autores, 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) e epidermal (EGF) e as enzimas proteolíticas, sendo a sua secreção controlada por agentes alfa-adrenérgicos.

PINHEIRO (1985) identificou quatro substâncias, de baixo peso molecular, denominadas Sialotoxinas I, II, III e IV, de glândulas submandibulares de camundongos ma-

chos, todas elas com atividade letal.

AGOSTINHO (1987) procurando determinar a  $DL_{50}$  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. Foi determinada, também, a  $DL_{50}$  da SI, em camundongos machos, previamente tratados com estradiol; e fêmeas, tratadas com testosterona, bem como machos orquidectomizados e fêmeas ovariectomizadas. Observou-se que a testosterona protege, parcialmente, as fêmeas diminuindo a sua sensibilidade, indicando uma  $DL_{50}$ , significativamente maior que nas fêmeas normais, oferecendo desse modo, o suporte de que a SI seja, provavelmente, também, andrógeno-dependente.

### 2.3. Importância Biológica das Glândulas Salivares e Sua Interação com o Metabolismo de Carboidratos

A interação das glândulas salivares, notadamente as glândulas parótidas, com o metabolismo de carboidratos, particularmente ligado à regulação da glicemia, tem sido proposta por diversos pesquisadores.

FERRANINI (1911) foi o primeiro a sugerir, ao relatar um caso de "Diabetes Salivar", no qual faz referência a um fluxo excessivo de saliva contendo dextrose, como também a alternância dessa glicosialorréia com a glicosúria, mostrando uma possível relação entre glândulas salivares e pâncreas.

FARRONI (1911) observou que o extrato de glândulas salivares de bovinos exercia efeitos hipoglicemiantes em coelhos.

Esses resultados, todavia, não foram confirmados por GOLJANITZKI (1924), quando descreveu que a remoção de glândulas parótidas e submandibulares de coelhos induzia à formação de edema, glicosúria e morte. Esse autor verificou também, que a ligação dos ductos dessas glândulas prevenia a glicosúria em presença da epinefrina e não trazia resultados benéficos a pacientes diabéticos.

Entretanto, UTIMURA (1927), SEELIG (1928) e De TAKATS (1930) descreveram uma série de casos onde os sinto

mas clínicos do diabetes melhoraram após a ligação dos ductos das glândulas parótidas.

Esses dados estão de acordo com aqueles encontrados por MANSFELD & SZIRTES (1928), ao verificarem que, com a ligação dos ductos das parótidas de cães, o nível sanguíneo da glicose diminuiu; e que, após posterior extirpação destas glândulas, a glicemia voltou aos seus valores normais, sugerindo uma ação hipoglicemiante das glândulas parótidas.

AUNAP (1931) relatou a correção da hiperglicemia aos valores normais, de cães pancreatectomizados, após a parotidectomia.

FLAUM (1932) notou que, de vinte e sete pacientes com hipertrofia da parótida, vinte e um eram diabéticos e seis tinham predisposição a diabetes.

ZIMMERMAN (1932) sugeriu, após a determinação da curva de tolerância à glicose, em cães, antes e após a ligadura dos ductos das parótidas, que essas glândulas exerciam alguma influência, até então não conhecida sobre o controle do metabolismo de carboidratos, e que a ligadura dos ductos resultou num aumento da tolerância à glicose.

Essas constatações, foram apoiadas por diversos autores, como HIKI et alii (1929, 1930, 1932 e 1934) e de OGATA (1934), que demonstraram existir uma possível relação entre a secreção interna das glândulas salivares e o metabolismo de carboidratos. Esses autores, usando cães sialoadenectomizados, observaram a ausência de absorção da saliva, e tendência acentuada à hipoglicemia, com aumento à tolerância a glicose.

se. Opostamente, em hipersialodenisismo, um excesso de saliva era encontrado, com alta taxa de glicose no sangue e a tolerância à glicose diminuída.

Entretanto, ROSENFELD (1933) descreveu que a hipoglicemia, subsequente à ligadura das parótidas, em cães, seria, possivelmente, induzida mais pela absorção da amilase do que em decorrência de uma secreção interna das glândulas salivares, análoga à insulina.

FÉRRETI (1936) e DOBREFF (1936) sugeriram que a hipertrofia das glândulas parótidas de diabéticos, em alguns indivíduos, poderia ser um mecanismo compensador em função de deficiência pancreática, assumindo as parótidas as funções do pâncreas na elaboração da insulina.

BIRNKRANT (1941) e BIRNKRANT & SHAPIRO (1942) verificaram que a parotidectomia bilateral promovia hipoglicemia em ratos. Todavia, a ligadura dos ductos das glândulas parótidas induzia um aumento na taxa glicêmica. Posteriormente, avaliando a influência do extrato de parótidas na glicemia e nas estruturas do pâncreas do mesmo animal, observaram que a administração prolongada desse extrato, produzia, invariavelmente, uma degeneração das Ilhotas de Langerhans e a uma significativa hiperglicemia. Esses autores sugeriram que as glândulas parótidas devem elaborar uma substância que deve atuar antagonicamente à ação da insulina.

Por outro lado, os dados obtidos por GAULT (1954) demonstraram que a extirpação das glândulas parótidas em ratos e camundongos não provocava alterações significativas

no nível glicêmico, sugerindo não haver interrelações entre essas glândulas e o metabolismo de carboidratos.

PARHOM, BABES & PETREA (1957) afirmaram que a administração do extrato parotidiano, em coelhos, provocou uma prolongada hiperglicemia. Utilizando o mesmo tipo de extrato, esses autores verificaram um aumento estável no nível glicêmico em pacientes com hiperinsulinismo, sugerindo que o extrato das glândulas parótidas poderia possuir uma ação anti-insulínica.

Analisando uma possível relação entre as glândulas salivares e a tolerância à glicose, GODLOWSKY & CALANDRA (1960) verificaram que a remoção bilateral das glândulas submandibulares e sublinguais de cães produzia um significativo aumento da sensibilidade à insulina, uma diminuição da tolerância à glicose, com aumento de sua utilização. Resultados similares foram obtidos após a ligadura bilateral dos ductos excretórios dessas glândulas em outro grupo de animais, nos quais ocorreu a atrofia das glândulas submandibulares e sublinguais. Esses autores concluíram que essas glândulas produzem um fator, que se removido, potencializa a ação da insulina, e que foi denominado Inibidor Submandibular da Insulina.

FLEMING (1962) observou que a administração intramuscular de Parotin em camundongos normais promoveu alterações tanto no pâncreas exócrino, quanto no endócrino. Tais modificações foram mais evidentes nas Ilhotas de Langerhans, que se mostraram hiperplásicas e hipertróficas. Quanto ao nível glicêmico, notou uma acentuada diminuição.

Avaliando o papel das glândulas submandibu-

lares na homeostase da insulina, GODLOWSKY (1968) e GODLOWSKY, GAZDA & WITHERS (1971) verificaram que a remoção dessas glândulas provocava um aumento da ação insulínica, tendo, portanto, um efeito hipoglicemiante. Extratos dessas glândulas dialisados, fracionados eletroforéticamente e injetados endovenosamente, causavam inibição da ação insulínica. Porém, a administração desse extrato em indivíduos portadores de diabetes mostrou, em pelo menos três casos, a completa remissão das manifestações clínicas do diabetes e o retorno da tolerância à glicose, dentro dos padrões normais, o que vem confirmar a existência de um fator com ação análoga à da insulina, produzido pelas glândulas submandibulares.

DAVIDSON, LEIBEL & BERRIS (1969) confirmaram que a hipertrofia e a hiperplasia das glândulas parótidas precede, em inúmeros casos, o diabetes, como um mecanismo compensador da hiperglicemia, preconizando também que o teste de tolerância à glicose deveria ser feito rotineiramente em todos os pacientes com aumento assintomático dessas glândulas.

Pesquisando o efeito da extirpação bilateral das glândulas submandibulares em cães e sua eventual relação com as respostas glicêmicas associadas às atividades da insulina, STEINBERG & GWINUP (1972) sugeriram que as alterações decorrentes nas glândulas salivares poderiam ser uma forma de diagnosticar diferentes tipos de diabetes, concluindo, entretanto, que o papel dessas glândulas na patogênese e magnitude do diabetes melito, é obscuro.

HOSHINO et alii (1976), procurando analisar os efeitos da ligação bilateral dos ductos salivares das paró-

tidas e submandibulares sobre a glicemia, em camundongos diabéticos experimentais, verificaram que o efeito hipoglicêmico foi mais acentuado e significativo quando os ductos foram simultaneamente ligados. Sugeriram, ainda, que as glândulas submandibulares produzem um fator antagonista da insulina, cuja ação era potencializada por uma substância produzida pelas glândulas parótidas, salientando que estas últimas, por si sô não teriam efeito direto sobre a ação da insulina.

A secreção do glucagon salivar, como resultado de uma resposta hormonal desencadeada pela ingestão de alimentos, foi sugerida por DUMBAR, SILVERMAN & KIRMAN (1977).

SMITH et alii (1979), através das técnicas de radioimunoensaio e imunocitoquímica, isolaram o glucagon das glândulas submandibulares, sugerindo uma importante participação no metabolismo de carboidratos.

KAKIZAKI et alii (1978) demonstraram, experimentalmente, que após uma pancreatite induzida, em ratos, as glândulas parótidas apresentavam uma atrofia degenerativa e hipofunção, diminuindo o volume, o conteúdo enzimático e a concentração de bicarbonato na saliva da parótida. Tais alterações foram verificadas também em pacientes com pancreatite, os quais apresentavam também uma redução da atividade da parótida. Concluíram que o pâncreas pode liberar uma substância que afeta a parótida por transmissão humoral, que deve ocorrer quando ocorre lesão pancreática.

GUIMARÃES et alii (1979), propondo-se a estudar os efeitos da parotidectomia sobre o nível glicêmico e o

teor de glicogênio hepático em ratos, notaram que a ausência destas glândulas promove um significativo aumento da glicemia, com conseqüente diminuição do teor do glicogênio hepático.

Posteriormente, GUIMARÃES et alii (1980) demonstraram que a administração intraperitoneal de uma única dose de Parotin (0,30 mg por 100g de peso) em ratos diabéticos, trouxe o nível glicêmico próximo à normalidade, enquanto a concentração de glicogênio hepático tornou-se aumentada.

A ação diabetogênica em ratos, provocando uma redução de DNA, RNA e proteínas totais, foi analisada por ANDERSON (1983), ao estudar o crescimento das glândulas parotíneas em ratos diabéticos. Foi observado também um retardo no desenvolvimento dessas glândulas, mas que todas essas alterações foram revertidas pelo tratamento com a insulina.

Assim, uma efetiva participação das glândulas salivares no metabolismo de carboidratos foi demonstrada por TEIXEIRA, GUIMARÃES & CURY (1985), ao estudarem os efeitos do Parotin sobre a hiperglicemia de ratos diabéticos. Demonstraram que esse princípio ativo diminuía a hiperglicemia e que a duração do seu efeito foi diretamente proporcional à sua concentração.

Recentemente, JOSÉ (1987), analisando os efeitos das diferentes frações do Parotin, "In Vivo", sobre a hiperglicemia de ratos diabéticos experimentais, verificou que as frações do Parotin apresentam, efetivamente, ação em diminuir a hiperglicemia de animais diabéticos aloxânicos.

#### 2.4. Consumo de Oxigênio e Incorporação de Glicose

Inúmeros estudos têm sido realizados sobre a atividade respiratória e incorporação de glicose pelo músculo diafragma de ratos em presença de diferentes substâncias, tanto "In Vitro" quanto "In Vivo".

Desse modo GEMMILL (1940), analisando "In Vitro" o efeito da insulina na deposição de glicogênio, verificou após três horas de agitação, num meio de reação contendo solução de Ringer tampão fosfato e insulina, um aumento considerável na deposição do glicogênio.

Em seguida, GEMMILL & HAMMAN (1941) confirmaram que a insulina aumenta a deposição de glicogênio e sugeriram que esta atividade não está associada com o aumento do consumo de oxigênio. Concluíram, ainda, que a utilização de glicose e deposição de glicogênio dependem da concentração da glicose no meio e que a galactose, levulose, xilose, maltose, lactato e citrato não atuam como substitutos da mesma.

GEMMILL (1941), estudando os efeitos da glicose e da insulina no metabolismo do diafragma de rato, concluiu que o músculo, quando não suprido de glicose no meio, utiliza outro substrato. A glicose, quando presente, é oxidada e o carboidrato formado é depositado no músculo e que a insulina e glicose adicionais presentes, aumentam, consideravelmente, a deposição de carboidrato.

Ainda em 1941, HECTER, LEVINE & SOSKIN de-

monstraram, "In Vitro", que a síntese de glicogênio pelo diafragma de ratos, era aumentada quando se elevava a concentração de glicose no meio de 0,1 para 0,4%, e que a presença da insulina era mais eficaz no meio de glicose a 0,1% que no de 0,4%, sugerindo a dispensibilidade da mesma nos meios contendo alta concentração de glicose.

LEVINE et alii (1950) observaram que a taxa limitante para a captação de glicose é a transferência da mesma através da membrana celular, sendo insulino-dependente. Sugeriram ainda, que a ação da insulina na incorporação de glicose é a de acelerar a etapa concernente com a sua transferência para o interior do tecido, e que esta etapa antecede, e é distinta da fosforilação da glicose, pela hexoquinase. Essas observações foram confirmadas por PARK, BORNSTEIN & POST (1955), LEVINE & GOLDSTEIN (1955) e PARK & JOHNSON (1955).

STADIE, HAUGAARD & MARSH (1951), pesquisando os fatores que influenciam a combinação da insulina com o diafragma de ratos normais, demonstraram que o tempo de 12 segundos de exposição foi suficiente para a insulina, em diferentes concentrações (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 U/ml), exercer o seu efeito, mesmo em concentrações relativamente baixas de glicose (0,1 a 0,4%). Verificaram, também, que a quantidade de insulina parece ser um fator limitante, pois o aumento de glicose de 0,4 para 1,0% não resultou em qualquer aumento adicional no efeito da insulina.

HAUGAARD & MARSH (1952), comparando o efeito da insulina no tecido adiposo e no diafragma de ratos, através do método manométrico, notaram que o consumo de oxigênio,

na presença de glicose, aumentou com a adição de insulina no meio e que a mesma combina quimicamente com o tecido adiposo de maneira similar àquela encontrada no diafragma de rato.

CRANE & SOLS (1953) observaram que a hexoquinase é inibida pela glicose-6-fosfato e que a anóxia pode acelerar a fosforilação da glicose pela queda da concentração intracelular da glicose-6-fosfato e com isso aumentar a atividade da hexoquinase.

STADIE (1954) sugeriu que a insulina não inibe a fosforilação oxidativa e que o seu mecanismo para acelerar a captação de glicose, provavelmente, difere do executado pela anoxia e das substâncias que inibem a fosforilação oxidativa.

A possibilidade de coexistência de sistemas glicolíticos, insulino-dependente e insulino-independente, no diafragma de ratos, foi observada por SHAW & STADIE (1957). Demonstraram que existe um efeito constante, significativo, da insulina na formação de glicogênio a partir da glicose mas não na formação de ácido láctico, ocorrendo então diferentes vias glicolíticas. Uma via é interna (glicose-glicogênio), insulino-dependente e uma externa (glicose-lactato), insulino-independente. Concluíram, também, que o mecanismo de transporte de glicose no diafragma de ratos está envolvido somente com o sistema insulino-dependente.

RANDLE & SMITH (1957 e 1958), estudando a regulação da captação de glicose pelo músculo, verificaram que a captação da glicose pelo diafragma de rato, incubado no meio

tampão bicarbonato, é aumentada pela anóxia, por substâncias que inibem a fosforilação oxidativa, bem como pela insulina.

Posteriormente, RANDLE & SMITH (1958), ainda analisando os efeitos da insulina, anoxia e substâncias capazes de inibir a fosforilação oxidativa, na captação da glicose, pelo diafragma de ratos, observaram que a entrada de glicose é, normalmente, uma etapa taxa-limitante e que a insulina, anoxia e substâncias venenosas, tais como o 2-4-dinitrofenol e o salicilato, atuam estimulando a entrada de glicose, possivelmente, pela inibição do processo que restringe a penetração da glicose. Sugerem que todos esses fatores, com exceção da insulina, tenham a propriedade de inibir a fosforilação oxidativa.

HERMAN & RAMEY (1960) estudaram "In Vitro", a captação de glicose pelo diafragma de ratos, sob várias condições experimentais. Concluíram que a ausência da inibição da captação de glicose pela epinefrina no meio bicarbonato e no meio fosfato com alta concentração de  $Mg^{++}$  é devido ao funcionamento normal do sistema enzimático fosfofrutoquinase nesses dois meios, ocorrendo uma rápida remoção da glicose-6-fosfato. A acumulação de glicose-6-fosfato pode inibir a hexoquinase, como é o caso no meio fosfato.

NEWSHOLME & RANDLE (1961) sugeriram que a regulação da fosforilação da glicose é indireta e que depende da concentração intracelular de glicose-6-fosfato, isto é, a atividade de hexoquinase é regulada pela concentração da glicose-6-fosfato, um conhecido inibidor da hexoquinase. A anoxia diminuiu a concentração da glicose-6-fosfato e, por meio disso, aumentou a atividade do hexoquinase.

Inúmeras pesquisas com diafragma isolado de rato, e tecido adiposo do epidídimo têm demonstrado que esses dois tecidos são sensíveis às pequenas concentrações de insulina no meio de incubação.

Geralmente, menores concentrações de insulina parecem ser requeridas para efeitos mais consistentes no tecido adiposo do epidídimo do que em diafragma de ratos, mostrando que o tecido adiposo é mais sensível à insulina do que o tecido muscular (RAFAELSEN, 1964 e RAFAELSEN, VILMA & RENOLD, 1965).

LBOUË-BONIS & CLAUSER (1977) analisaram o efeito combinado da insulina e do florizina no transporte e metabolismo de carboidrato. Verificaram que o florizina inibe o transporte de glicose, tanto na presença quanto na ausência de insulina, confirmando os estudos sobre o efeito do florizina como um possível inibidor do transporte de açúcar, deprimindo reações de fosforilação sob certas condições.

Pesquisas mais recentes têm procurado elucidar os mecanismos reais pelos quais ocorre a ação da insulina no metabolismo de carboidratos.

Assim, CZECH (1977), verificando o mecanismo de ação da insulina na incorporação de glicose, demonstrou que o passo inicial é a ligação da insulina ao receptor específico, presente na membrana plasmática. As reações subsequentes na transmissão do sinal, desencadeado pela ligação da insulina ao receptor ao sistema efetor, localizado na membrana plasmática, ou intracelularmente, não são bem conhecidas.

HARING et alii (1978) assinalaram que a velo

cidade no processo de acoplamento entre a insulina e o receptor parece ser temperatura-dependente.

A cinética da ação da insulina no transporte de glicose e no sistema AMPc, exibe uma fase inicial de latência, de 40 a 50 segundos, o que corresponde ao tempo necessário para a ligação com o receptor e a resposta final do sistema de transporte de glicose e o sistema AMPc (CIARALDI & OLEFSKY, 1979).

SEALS, MAC DONALD & JARRET (1979) sugeriram que a associação da insulina com o seu receptor específico poderia ativar um segundo mensageiro (ainda não identificado), e desse modo, iniciar o recrutamento de vesículas intracelulares.

HARING, KEMMLER & HEPP (1979) verificaram que células adiposas pré-tratadas com substâncias antimicrotubulares têm a velocidade de ligação da insulina ao receptor reduzida, sem, contudo, afetar a resposta final da insulina no transporte da glicose. Sugeriram que o sistema microtubular estaria envolvido nesse processo de acoplamento, e que a fosforilação de microtúbulos poderia ser uma etapa na transmissão do sinal, após a ligação da insulina ao receptor.

CUSHMAN & WARDZALA (1980) observaram que a insulina estimula o transporte de glicose em células adiposas, induzindo uma translocação dos sistemas de transporte de glicose, do seu "pool" intracelular para a membrana plasmática.

KARNIELI et alii (1981) confirmaram a existência de translocação dos sistemas de transporte de glicose, e demonstraram ser o processo de translocação inteiramente re-

versível e diretamente regulado pela concentração de insulina no meio.

HARING, BIERMAN & KEMMLER (1981) sugeriram que a insulina, ao ocupar o receptor, produz um sinal que desencadeia a fosforilação do sistema microtubular, o qual levaria à translocação de vesículas contendo carreador e à ligação desses com a membrana plasmática.

WARDZALA & JEANRENAUD (1981) verificaram que a insulina estimula o transporte de glicose no diafragma de ratos, através da translocação dos transportadores de glicose do "pool" intracelular para a membrana-plasmática, e que esses resultados são similares aos observados nas células adiposas.

KONO et alii (1982) analisaram que um dos efeitos primários da insulina no diafragma de ratos é causar um aumento do número de transportadores de glicose na membrana plasmática.

WANG (1985), através de experimentos "In Vitro", com diafragma de ratos, demonstrou também que a insulina estimula a captação de glicose pela translocação de um "pool" intracelular à membrana plasmática, sugerindo que existem pelo menos quatro componentes requeridos para a estimulação do transporte de glicose pela insulina: o receptor de insulina; um conjunto de transportadores intracelulares de glicose; o mecanismo que efetua a translocação dos transportadores para a membrana plasmática e o sinal do receptor para a translocação. Sugere que a estimulação da insulina, no transporte de glicose no diafragma de ratos, não é uma simples função da concentra

ção de receptores insulínicos e/ou dos transportadores intracelulares de glicose, mas que ela é dependente de algum outro fator que ativa, ou é parte do mecanismo de translocação.

ARRUDA VEIGA (1987) investigou, "In Vitro", os efeitos das frações I, II, III e IV do Parotín, no tecido adiposo do epidídimo de ratos sobre a incorporação de glicose e consumo de oxigênio. Os dados obtidos demonstraram que as diferentes frações do Parotín aumentaram a incorporação de glicose e o consumo de oxigênio pelo epidídimo de ratos normais e diabéticos, e que essas frações do Parotín, como também a insulina, foram mais efetivas nos animais diabéticos do que nos normais, nos dois modelos experimentais. Essas observações vieram confirmar os dados obtidos por TEIXEIRA (1979), quando realizou estudos semelhantes com o Parotín bruto.

Capítulo III

M A T E R I A L   E   M É T O D O S

Tampão Krebs-Ringer fosfato (TKRF), sem substrato e sem droga no meio de reação.

Subgrupo A<sub>2</sub>: Controle - Endógeno + Glicose - Os 6 animais deste subgrupo sofreram o mesmo procedimento do grupo anterior, acrescido da presença de glicose no meio de incubação.

GRUPO B: Sialotoxina I - Constituído de 30 ratos e redistribuídos em 5 subgrupos de 6 animais cada, respectivamente, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub> e B<sub>5</sub>.

Subgrupo B<sub>1</sub>: Endógeno + Sialotoxina I - Os animais pertencentes a este subgrupo foram submetidos ao mesmo procedimento experimental do subgrupo A<sub>1</sub>, tendo, entretanto, a presença da Sialotoxina I no meio de reação, numa concentração de 0,02 mg/ml.

Subgrupo B<sub>2</sub>: Endógeno + Glicose + Sialotoxina I - Os 6 animais deste subgrupo tiveram o mesmo procedimento experimental dos demais, mas com as presenças no meio de reação, da glicose e da Sialotoxina I, na concentração de 0,002 mg/ml.

Subgrupo B<sub>3</sub>: Endógeno + Glicose + Sialotoxina I - Os 6 ratos pertencentes a este subgrupo, à semelhança dos anteriores, sofreram o mesmo procedimento, contendo no meio de reação glicose e Sialotoxina I, na concentração de

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 102 ratos machos (Rattus norvergicus, albinus, Wistar), com 2 a 3 meses de idade, pesando entre 150 e 200 gramas. Os animais foram alimentados com 15g de ração\*/dia/rato, considerado suficiente para a sua manutenção (HOSHINO et al 1976) e água "ad libitum".

O presente trabalho foi desenvolvido em 2 modelos experimentais (estudo "In Vitro"):

- a) Determinação do Consumo de Oxigênio;
- b) Determinação da Incorporação da Glicose.

#### 3.1. Determinação do Consumo de Oxigênio

##### 3.1.1. Distribuição dos animais nos Grupos Experimentais

(Tabela I)

Neste modelo experimental foram utilizados 60 ratos, distribuídos casualmente em 3 grupos: A, B e C (Tabela I):

GRUPO A- Controle - Constituído de 12 ratos e redistribuídos em 2 subgrupos, respectivamente, A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>.

Subgrupo A<sub>1</sub>: Controle - Endógeno - Dos 6 ratos pertencentes a este subgrupo, foram retirados o músculo diafragma e colocados no meio de incubação, contendo solução de

\* Ração Ceres S/A Piracicaba

0,01 mg/ml.

Subgrupo B<sub>4</sub>: Endógeno + Glicose + Sialotoxina I - Também composto de 6 ratos, submetidos ao mesmo procedimento dos anteriores, contendo no meio de reação glicose e Sialotoxina I, na concentração de 0,02 mg/ml.

Subgrupo B<sub>5</sub>: Endógeno + Glicose + Sialotoxina I - Com 6 ratos, como os grupos anteriores, os animais foram utilizados para determinação do consumo de oxigênio na presença de endógeno, glicose e Sialotoxina I, numa concentração de 0,03 mg/ml, no meio de reação.

GRUPO C: Insulina - Constituído por 18 ratos, redistribuídos em 3 subgrupos: C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>, com 6 ratos cada, dos quais retirou-se o músculo diafragma e, caracterizado pela presença de insulina, nos ensaios biológicos.

Subgrupo C<sub>1</sub>: Endógeno + Insulina - Os diafragmas dos animais deste grupo foram utilizados sem a presença do substrato no meio de reação (endógeno), porém em presença de insulina, numa concentração de 0,3 U/ml, no meio de reação.

Subgrupo C<sub>2</sub>: Endógeno + Glicose + Insulina - Composto também por 6 ratos, os quais sofreram o mesmo procedimento experimental dos grupos anteriores, adicionando no meio de reação a glicose (1 mg/ml).

Subgrupo C<sub>3</sub>: Endógeno + Glicose + Insulina

+ Sialotoxina I - Constituído também de 6 ratos, sofrendo o mesmo procedimento experimental do subgrupo B<sub>4</sub>, para avaliação do consumo de oxigênio, contendo no meio de reação, glicose, insulina nas concentrações anteriores e Sialotoxina I, numa concentração de 0,02mg/ml.

TABELA I:- Distribuição dos animais

GRUPOS	SUBGRUPOS	Nº DE RATOS	T R A T A M E N T O
A	A <sub>1</sub>	6	Endógeno
	A <sub>2</sub>	6	Endógeno + Glicose
B	B <sub>1</sub>	6	Endógeno+Sialotoxina I (0,02 mg/ml)
	B <sub>2</sub>	6	Endógeno+Glicose+Sialotoxina I(0,002mg/ml)
	B <sub>3</sub>	6	Endógeno+Glicose+Sialotoxina I(0,01mg/ml)
	B <sub>4</sub>	6	Endógeno+Glicose+Sialotoxina I(0,02mg/ml)
	B <sub>5</sub>	6	Endógeno+Glicose+Sialotoxina I(0,03mg/ml)
C	C <sub>1</sub>	6	Endógeno + Insulina
	C <sub>2</sub>	6	Endógeno + Glicose + Insulina
	C <sub>3</sub>	6	Endógeno + Glicose + Insulina + Sialotoxina I (0,02 mg/ml)

Grupos e subgrupos de animais utilizados para verificação do consumo de oxigênio pelo diafragma de ratos.

Os animais pertencentes aos grupos A, B, e C, após jejum de 36 horas, foram sacrificados por decapitação. A seguir o músculo diafragma foi rapidamente removido (RANDLE & SMITH, 1958) e mantido em tampão Krebs-Ringer, numa temperatura

de 4°C (WINEGRAD & RENOLD, 1958). A seguir os tecidos foram pesados e cortados em pedaços não superiores a 3,0 mm<sup>3</sup>, e incubados em frascos de Warburg, a fim de se determinar o consumo de oxigênio, "In Vitro".

As determinações do consumo de oxigênio, pelo sistema manométrico, foram executadas segundo a técnica convencional de WARBURG (1972).

Através deste método clássico analisou-se a capacidade oxidativa do diafragma na presença de diferentes ensaios biológicos.

Os conjuntos frascos-manômetros foram colocados no aparelho de Warburg para agitação, numa temperatura de 37°C. As leituras, nos manômetros, foram realizadas, com intervalos de 15 minutos, durante um período de 90 minutos.

Os valores obtidos, indicando o consumo de oxigênio, serão expressos em microlitros por grama de tecido por hora ( $\mu\text{l/g/tecido/h}$ ).

### 3.1.2. Sistemas Experimentais Empregados

O sistema experimental para determinação do consumo de oxigênio do músculo diafragma dos animais de todos os grupos constou de:

<u>Frasco nº 1 - Endógeno (6 ratos)</u>	
Meio de reação	2,30 ml
Fragments de tecido	0,50 ml

KOH 20%	0,20 ml
H <sub>2</sub> O q.s.p.	3,65 ml

Frasco nº 2 - Endôgeno+Glicose (6 ratos)

Meio de reação	2,30 ml
Fragmentos de tecido	0,50 ml
Glicose	0,10 ml
KOH 20%	0,20 ml
H <sub>2</sub> O q.s.p.	3,65 ml

Frasco nº 3 - Endôgeno + Sialotoxina I (0,02mg/ml)  
(6 ratos)

Meio de reação	2,30 ml
Fragmentos de tecido	0,50 ml
Sialotoxina I	0,57 ml
KOH 20%	0,20 ml
H <sub>2</sub> O q.s.p.	3,65 ml

Frasco nº 4 - Endôgeno + Glicose + Sialotoxina I  
(0,002mg/ml) (6 ratos)

Meio de reação	2,30 ml
Fragmentos de tecido	0,50 ml
Glicose	0,10 ml
Sialotoxina I	0,06 ml
KOH 20%	0,20 ml
H <sub>2</sub> O q.s.p.	3,65 ml

Frasco nº 5 - Endôgeno + Glicose + Sialotoxina I  
(0,01mg/ml) (6 ratos)

Meio de reação	2,30 ml
----------------	---------

Fragmentos de tecido	0,50 ml
Glicose	0,10 ml
Sialotoxina I	0,46 ml
KOH 20%	0,20 ml
H <sub>2</sub> O q.s.p.	3,65 ml

Frasco nº 6 - Endógeno + Glicose + Sialotoxina I  
(0,02mg/ml) (6 ratos)

Meio de reação	2,30 ml
Fragmentos de tecido	0,50 ml
Glicose	0,10 ml
Sialotoxina I	0,90 ml
KOH 20%	0,20 ml
H <sub>2</sub> O q.s.p.	4,30 ml

Frasco nº 7 - Endógeno + Glicose + Sialotoxina I  
(0,03mg/ml) (6 ratos)

Meio de reação	2,30 ml
Fragmentos de tecido	0,50 ml
Glicose	0,10 ml
Sialotoxina I	0,70 ml
KOH 20%	0,20 ml
Volume Final	3,80 ml

Frasco nº 8 - Endógeno + Insulina (6 ratos)

Meio de reação	2,30 ml
Fragmentos de tecido	0,50 ml
Insulina	0,10 ml
KOH 20%	0,20 ml
H <sub>2</sub> O q.s.p.	3,65 ml

Frasco nº 9 - Endógeno + Glicose + Insulina  
(6 ratos)

Meio de reação	2,30 ml
Fragmentos de tecido	0,50 ml
Glicose	0,10 ml
Insulina	0,10 ml
KOH 20%	0,20 ml
H <sub>2</sub> O q.s.p.	3,65 ml

Frasco nº 10 - Endógeno + Glicose + Insulina +  
Sialotoxina I(0,02mg/ml) (6 ratos)

Meio de reação	2,30 ml (a)
Fragmentos de tecido	0,50 ml (b)
Glicose	0,10 ml (c)
Insulina	0,10 ml (d)
Sialotoxina I	0,57 ml (e)
KOH 20%	0,20 ml (f)
H <sub>2</sub> O q.s.p.	3,80 ml

- a) O meio de reação utilizado foi o Tampão Krebs-Ringer Fosfato pH= 7,4;
- b) Diafragma, pesando em média 310 mg, correspondendo a um volume de 0,50 ml;
- c) Glicose dissolvida em solução fisiológica numa concentração de 1,0 mg/ml no meio de reação;
- d) Insulina NPH-U40 (Biobrãs), dissolvida em solução fisiológica, numa concentração de 0,3 U/ml;

- e) Sialotoxina I preparadas em diferentes concentrações, a partir de uma concentração mínima efetiva (0,002 mg/ml) e de concentrações cinco, dez e quinze vezes maiores ou seja, 0,01, 0,02 e 0,03 mg/ml.
- f) Foram adicionados, em todos os frascos, 0,2 ml de KOH (20%) no poço central do frasco.

### 3.2. Determinação da Incorporação de Glicose

#### Distribuição dos animais nos grupos experimentais

Nesta fase experimental foram utilizados 42 ratos, distribuídos em dois grupos: D e E (Tabela II).

GRUPO D : Sialotoxina I - Constituído por 30 ratos, redistribuídos em 5 subgrupos de 6 animais cada, respectivamente, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> e D<sub>5</sub>, dos quais retirou-se o músculo diafragma.

Subgrupo D<sub>1</sub>: Glicose - O diafragma dos animais pertencentes a este subgrupo foi utilizado para determinação da incorporação de glicose, contendo no meio de reação glicose, numa concentração de 1,0 mg/ml.

Subgrupo D<sub>2</sub>: Glicose + Sialotoxina I - Este subgrupo, também constituído de 6 ratos, sofreu o mesmo procedimento do grupo anterior, tendo no meio de reação Sialotoxina I, na concentração de 0,002 mg/ml.

Subgrupo D<sub>3</sub>: Glicose + Sialotoxina I - Dos ratos deste subgrupo foram utilizados o músculo diafragma para medir a incorporação de glicose, no meio de reação contendo glicose e Sialotoxina I, na concentração de 0,01 mg/ml.

Subgrupo D<sub>4</sub>: Glicose + Sialotoxina I - Os animais deste subgrupo tiveram o mesmo tratamento dos grupos anteriores, tendo, porém, agora no meio de incubação, a Sialotoxina I, na concentração de 0,02 mg/ml.

Subgrupo D<sub>5</sub>: Glicose + Sialotoxina I - Os animais desse subgrupo, submetidos ao mesmo tratamento experimental, dos subgrupos anteriores, estando, a Sialotoxina I, na concentração de 0,03 mg/ml.

GRUPO E: Insulina - Constituído por 12 ratos, redistribuídos em 2 subgrupos: E<sub>1</sub> e E<sub>2</sub>, respectivamente, de 6 ratos cada. Os músculos diafragmas dos animais deste grupo foram caracterizados pela presença da insulina, no meio de reação, numa concentração de 0,3 U/ml.

Subgrupo E<sub>1</sub>: Glicose + Insulina - Composto de 6 animais, os quais foram utilizados para determinação da incorporação de glicose, contendo no meio de reação glicose e insulina.

Subgrupo E<sub>2</sub>: Glicose + Insulina + Sialotoxina I - Os animais deste subgrupo tiveram o mesmo tratamento do

grupo anterior, contendo no meio de reação glicose, insulina e Sialotoxina I, na concentração de 0,02 mg/ml.

TABELA II: Distribuição dos animais

GRUPOS	SUBGRUPOS	Nº DE RATOS	T R A T A M E N T O
D	D <sub>1</sub>	6	Glicose
	D <sub>2</sub>	6	Glicose + Sialotoxina I (0,002 mg/ml)
	D <sub>3</sub>	6	Glicose + Sialotoxina I (0,01 mg/ml)
	D <sub>4</sub>	6	Glicose + Sialotoxina I (0,02 mg/ml)
	D <sub>5</sub>	6	Glicose + Sialotoxina I (0,03 mg/ml)
E	E <sub>1</sub>	6	Glicose + Insulina
	E <sub>2</sub>	6	Glicose+Insulina+Sialotoxina I (0,02 mg/ml)

Grupos e Subgrupos de animais utilizados para verificação da incorporação de glicose, pelo músculo diafragma.

TABELA III: Sistemas experimentais empregados para a determinação da incorporação de glicose.

MEIO DE INCUBAÇÃO	FRASCOS						
	1	2	3	4	5	6	7
TKRF*	X	X	X	X	X	X	X
Glicose	X	X	X	X	X	X	X
Sialotoxina I (0,002 mg/ml)		X					
Sialotoxina I (0,01 mg/ml)			X				
Sialotoxina I (0,02 mg/ml)				X			X
Sialotoxina I (0,03 mg/ml)					X		
Insulina						X	X
Diafragma	X	X	X	X	X	X	X

\* TKRF - Tampão Krebs-Ringer Fosfato

Os procedimentos cirúrgicos foram os mesmos utilizados para o consumo de oxigênio e a constituição dos meios de reação dos sistemas experimentais podem ser observados na Tabela III, constando em todos os experimentos a presença do Tampão Krebs-Ringer Fosfato.

Após 90 minutos de agitação, à temperatura de 37°C, os fragmentos teciduais foram retirados dos frascos de Warburg. Baseando-se na diferença de concentração entre a glicose introduzida (1 mg/ml) e a glicose residual, calculou-se, pelo método da glicose enzimática\*, a quantidade de glicose incorporada em micrograma por miligrama de tecido por hora (ug/mg/tecido/hora).

A incorporação de glicose, frente aos diferentes ensaios biológicos, foi determinada em espectrofotômetro (Spectronic 20-Bausch & Lomb, 550nm).

### 3.3. Tratamento Estatístico

Para as análises estatísticas foram usados os esquemas de análise de variância de ensaios inteiramente casualizados, ou seja:

C. VARIACÃO	G.L.
Tratamentos	Nº de tratamento - 1
Resíduo	Diferença (GL total - GL tratamentos)
TOTAL	(Nº de trat. X Nº de Ref.) - 1

Para as comparações das médias (duas a duas) foi usado o teste de Tuckey, ao nível de 5% de probabilidade, determinando-se as diferenças mínimas significativas através de  $\Delta = q \frac{s}{\sqrt{r}}$

onde:  $\Delta$  = Diferença mínima significativa;  
 $q$  = Valor da amplitude total estudada;  
 $s$  = Estimativa do desvio padrão residual;  
 $r$  = Nº de repetições

\* Glicemia Enzimática Wiener Lab.

Capítulo IV

R E S U L T A D O S

#### 4. RESULTADOS

##### 4.1. Consumo de Oxigênio (ul/g de tecido/hora)

A análise de variância dos dados obtidos sobre o consumo de oxigênio pelo diafragma dos ratos pertencentes aos três grupos experimentais (Controle, Sialotoxina I e Insulina), revelou que existem, entre si, diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade.

A mesma análise apresentou também o valor de F (1060,7), do coeficiente de variação (5,28) e o da diferença mínima significativa (22,4).

As médias dos valores de consumo de oxigênio em microlitro por grama de tecido e por hora, dos diferentes sistemas experimentais empregados, podem ser observados na Tabela IV e Tabelas IX e X do apêndice. Nessas Tabelas são comparados, através do teste de Tuckey, as médias 2 a 2; notou-se que excetuando as médias dos subgrupos  $B_1$  e  $B_3$ ,  $B_1$  e  $C_3$ , nas demais existem diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade.

No grupo A (Controle) as análises mostraram que existem diferenças entre os subgrupos  $A_1$  (endógeno  $316,6 \pm 5,6$ ) e  $A_2$  (endógeno + glicose  $373,1 \pm 19,3$ ), revelando que a presença da glicose no ensaio biológico, aumenta significativamente o consumo de oxigênio por hora (Tabela IV, gráficos 1 e 2).

Quanto ao grupo B, observa-se que os valores médios por hora dos subgrupos B<sub>1</sub>, endógeno com Sialotoxina I, na concentração de 0,02 mg/ml, foi de  $113,4 \pm 9,4$  ul/g de tecido, enquanto no ensaio contendo endógeno com glicose e Sialotoxina I, numa concentração de 0,002 mg/ml, subgrupo B<sub>2</sub>, foi de  $208,6 \pm 6,5$  ul/g de tecido.

Dessa forma, nota-se pelos valores apresentados que existem diferenças significativas entre os subgrupos B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, ao nível de 5% de probabilidade, como também entre os subgrupos B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub> e B<sub>5</sub>.

Os subgrupos B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub> e B<sub>5</sub>, cujos sistemas experimentais eram constituídos de endógeno com glicose e Sialotoxina I, nas doses crescentes de 0,01, 0,02 e 0,03 mg/ml, revelaram um consumo de oxigênio, respectivamente, de  $104,0 \pm 6,4$ ,  $62,2 \pm 8,1$  e  $37,5 \pm 3,1$  microlitro/grama de tecido (Tabela IV e gráficos 1 e 2).

Além disso, verifica-se também, através da mesma análise, que o consumo de oxigênio diminui, significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, à medida que se aumenta a concentração de Sialotoxina I.

Por outro lado, não se observam diferenças significativas entre os subgrupos B<sub>1</sub> (endógeno + Sialotoxina I, 0,02 mg/ml) e B<sub>3</sub> (endógeno + glicose + Sialotoxina I, 0,01 mg/ml).

Ainda na Tabela IV verificam-se também os dados indicativos do consumo de oxigênio do grupo C (Insulina).

O teste de Tuckey demonstrou que existem diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidades entre

os subgrupos  $C_1$ ,  $C_2$  e  $C_3$ , cujos valores foram, respectivamente, de  $409,4 \pm 19,1$ ;  $460,9 \pm 9,6$  e  $129,8 \pm 4,8$  microlitros por grama de tecido por hora (Gráficos 3 e 4).

Dessa forma, nota-se que nos ensaios que continham endógeno + glicose + insulina (subgrupo  $C_2$ ), o consumo de oxigênio era mais efetivo que aquele constituído de endógeno e insulina, revelando a importância da presença do substrato no meio de reação.

Todavia, observa-se que o consumo de oxigênio no ensaio que continha endógeno + glicose + insulina + Sialotoxina I (0,02 mg/ml), subgrupo  $C_3$  foi, significativamente, menor que nos dois ensaios que não continham Sialotoxina I ( $C_1$  e  $C_2$ ).

A mesma análise revelou, ainda, que não existem diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade entre os subgrupos  $B_1$  (endógeno + Sialotoxina I, 0,02mg/ml) e  $B_3$  (endógeno + glicose + Sialotoxina I, 0,02mg/ml) (Tabela IV).

Os dados do consumo de oxigênio, em função do tempo de incubação dos diferentes ensaios biológicos dos três grupos experimentais, podem ser vistos nas Tabelas VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XIX e XX do apêndice.

TABELA IV: Consumo de Oxigênio

	G.	SUBG.	ENSAIOS BIOLÓGICOS	MÉDIA $\pm$ $s_{\bar{x}}$
CONT.	A	A <sub>1</sub>	Endógeno	a 316,6 $\pm$ 5,6
		A <sub>2</sub>	Endógeno + Glicose	b 373,1 $\pm$ 19,3
SIALOTOXINA I	B	B <sub>1</sub>	Endógeno+Sialotoxina I(0,02mg/ml)	c 113,4 $\pm$ 9,4
		B <sub>2</sub>	Endógeno + Glicose + Sialotoxina I (0,002 mg/ml)	d 208,6 $\pm$ 6,5
		B <sub>3</sub>	Endógeno + Glicose + Sialotoxina I (0,01 mg/ml)	c 104,0 $\pm$ 6,4
		B <sub>4</sub>	Endógeno + Glicose + Sialotoxina I (0,02 mg/ml)	e 62,2 $\pm$ 8,1
		B <sub>5</sub>	Endógeno + Glicose + Sialotoxina I (0,03 mg/ml)	f 37,5 $\pm$ 3,1
INSULINA	C	C <sub>1</sub>	Endógeno + Insulina	g 409,4 $\pm$ 19,1
		C <sub>2</sub>	Endógeno + Glicose + Insulina	h 460,9 $\pm$ 9,6
		C <sub>3</sub>	Endógeno + Glicose + Insulina + Sialotoxina I (0,02 mg/ml)	i 129,8 $\pm$ 4,8

Valores médios, desvios padrões da média do consumo de oxigênio "In Vitro" (microlitro por grama de tecido por hora) pelo diafragma de ratos, nos diferentes ensaios biológicos.

Os tratamentos seguidos das mesmas letras não diferem, significativamente, ao nível de 5% de probabilidade entre si.

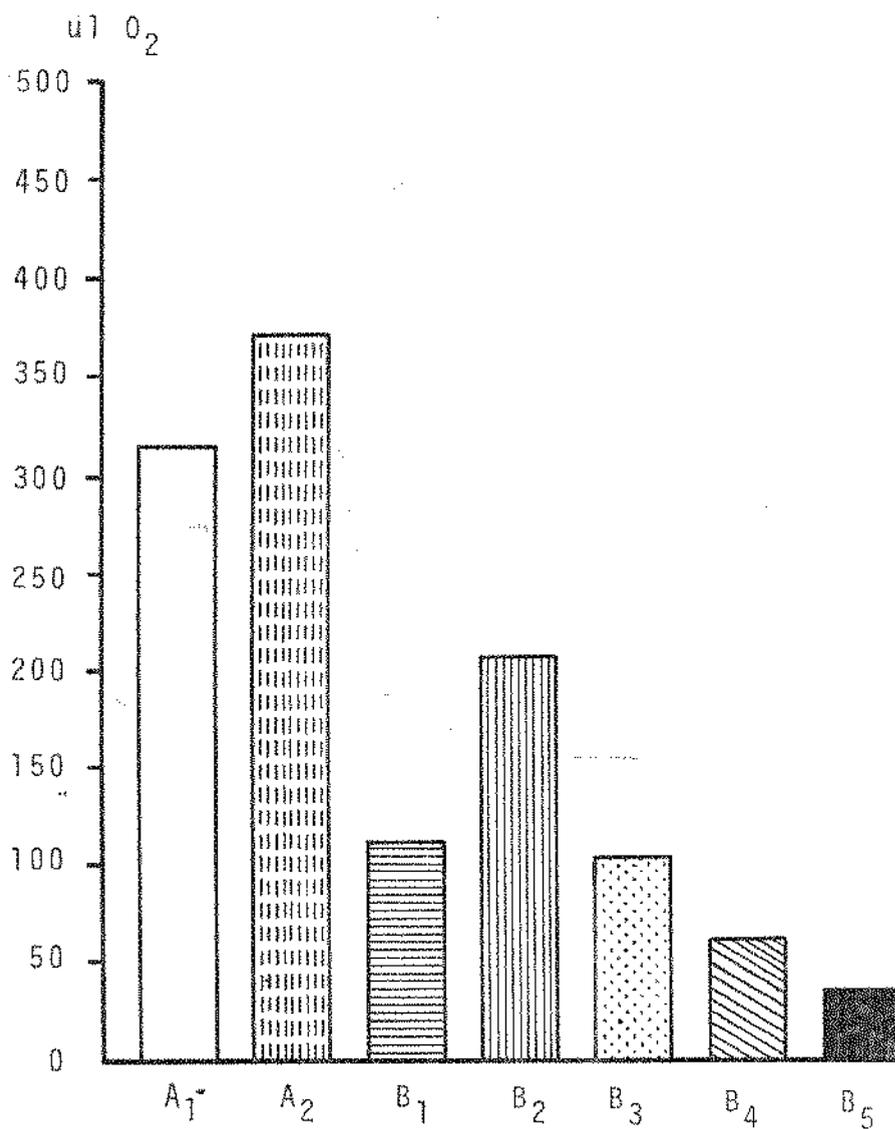


GRÁFICO 1:- Consumo de oxigênio (u1/grama de tecido/hora), dos sistemas experimentais:

-  A<sub>1</sub>:- Endógeno
-  A<sub>2</sub>:- Endógeno + Glicose
-  B<sub>1</sub>:- Endógeno + Sialotoxina I (0,02 mg/ml)
-  B<sub>2</sub>:- Endógeno + Glicose + Sialotoxina I (0,002mg/ml)
-  B<sub>3</sub>:- Endógeno + Glicose + Sialotoxina I (0,01mg/ml)
-  B<sub>4</sub>:- Endógeno + Glicose + Sialotoxina I (0,02mg/ml)
-  B<sub>5</sub>:- Endógeno + Glicose + Sialotoxina I (0,03mg/ml)

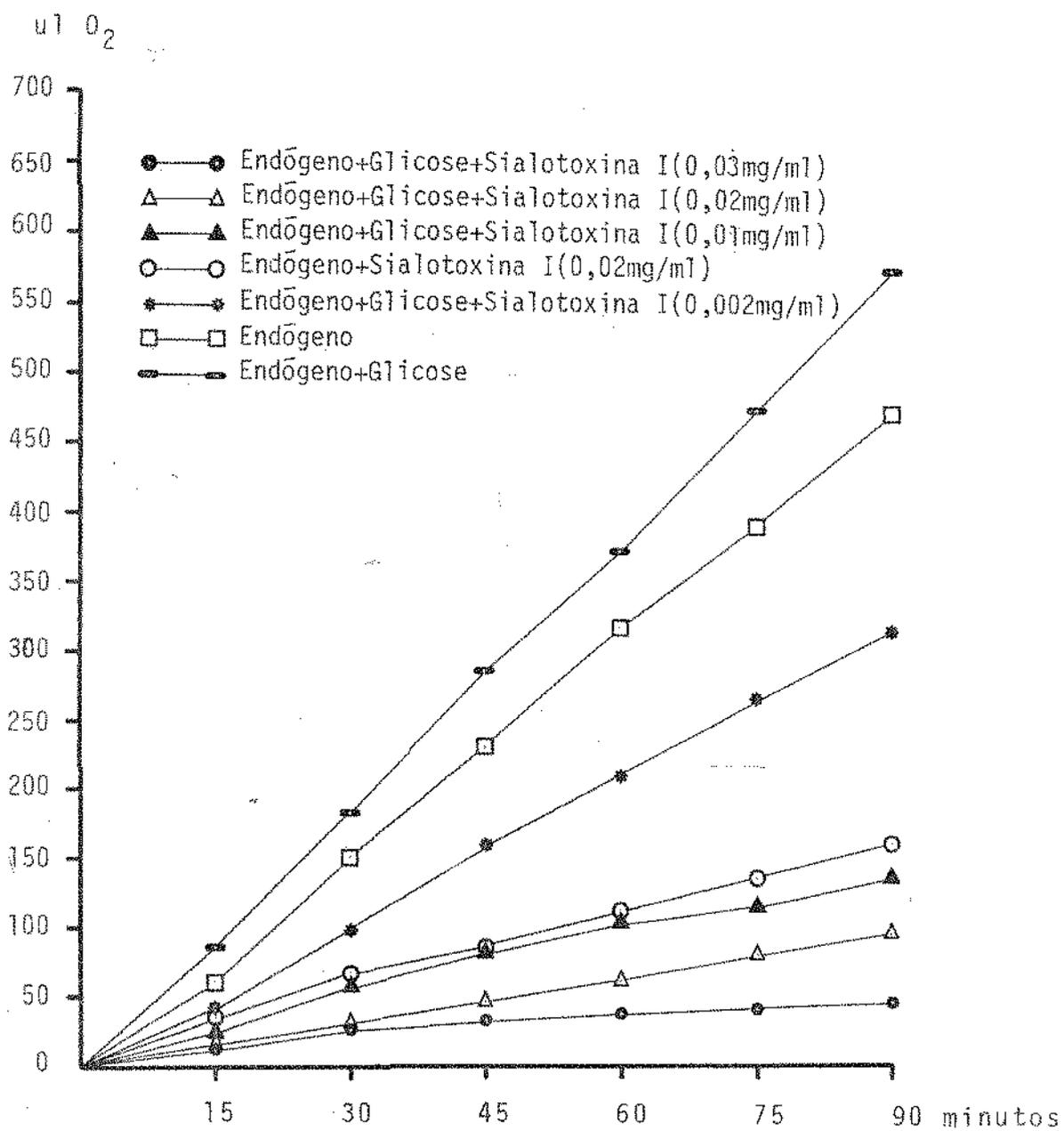


GRÁFICO 2:- Consumo de oxigênio (ul/grama de tecido) em função dos diferentes tempos de incubação.

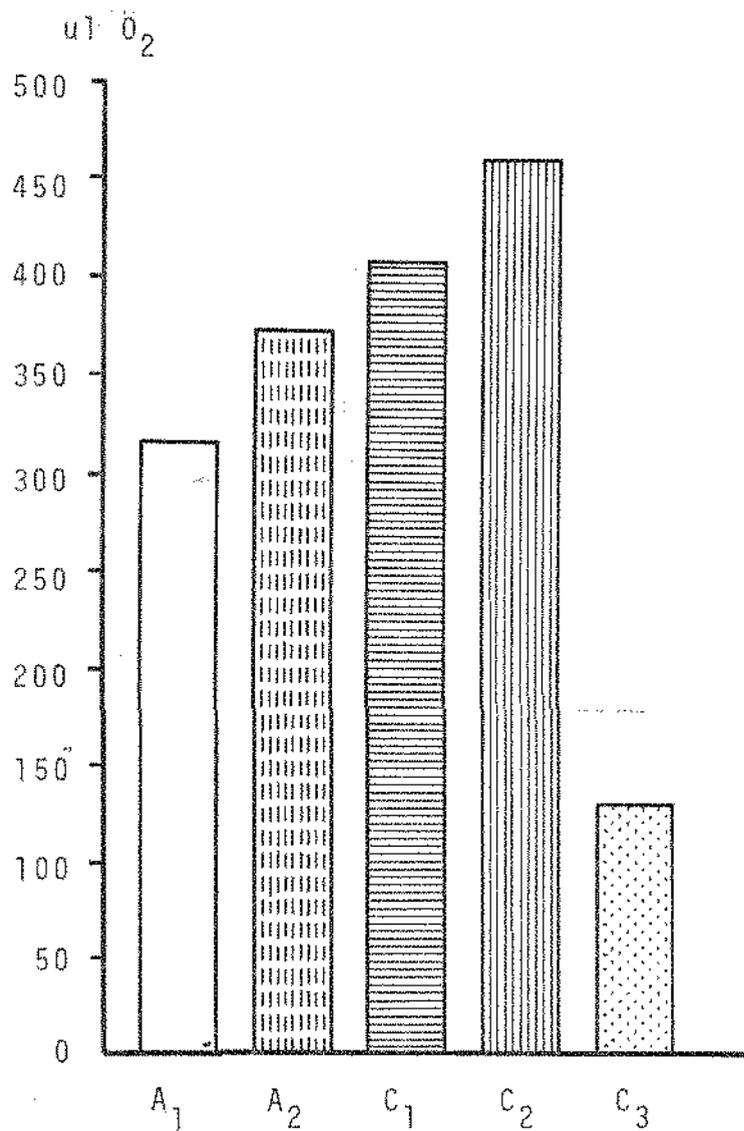


GRÁFICO 3:- Consumo de oxigênio (ul/grama de tecido/hora), dos sistemas experimentais:

-  A<sub>1</sub>:- Endógeno
-  A<sub>2</sub>:- Endógeno + Glicose
-  C<sub>1</sub>:- Endógeno + Insulina
-  C<sub>2</sub>:- Endógeno + Glicose + Insulina
-  C<sub>3</sub>:- Endógeno + Glicose + Sialotoxina I (0,02mg/ml) + Insulina

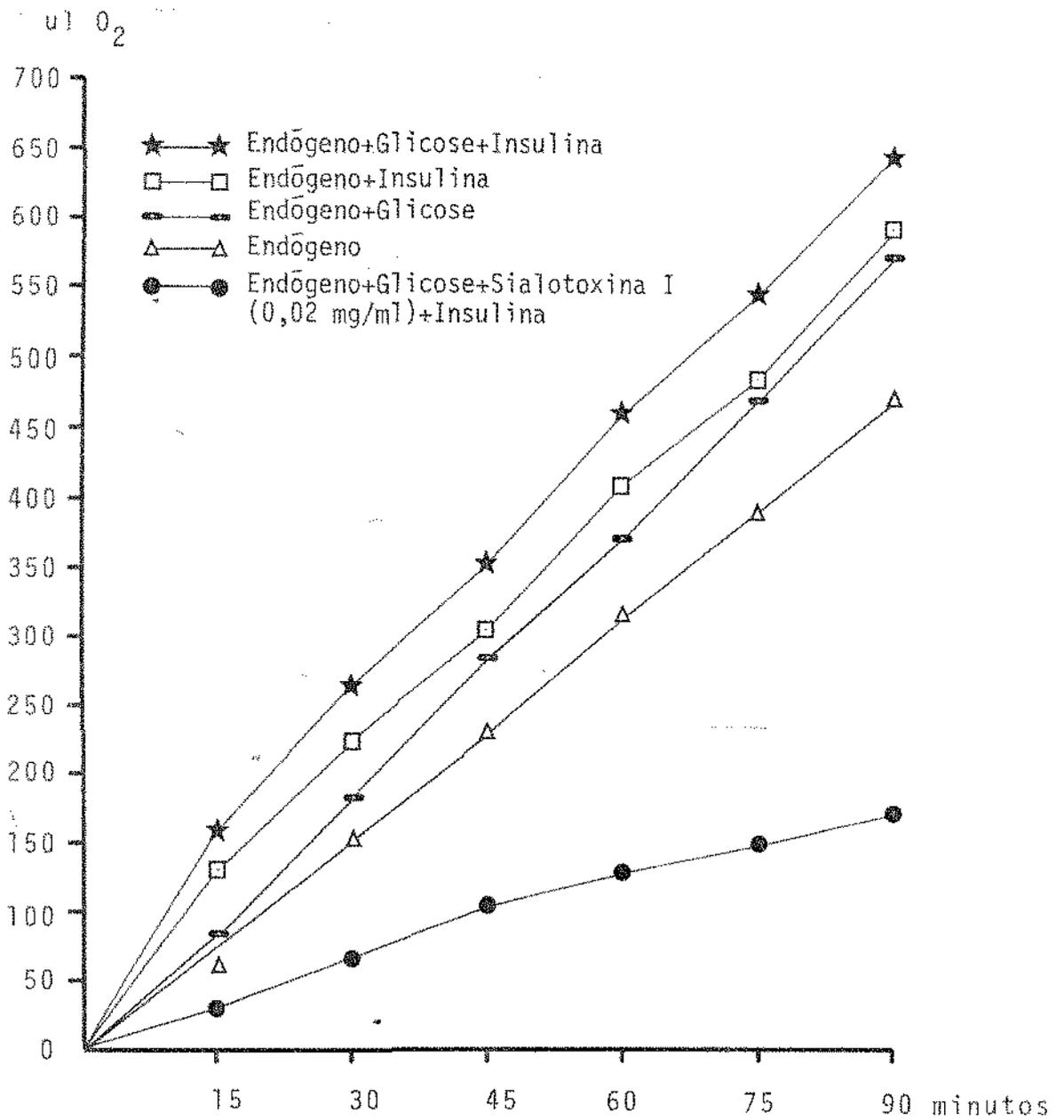


GRÁFICO 4:- Consumo de oxigênio ( $\mu\text{l}/\text{grama}$  de tecido) em função dos diferentes tempos de incubação.

#### 4.2. Incorporação de Glicose (ug/mg de tecido/hora)

A análise de variância dos dados obtidos sobre a incorporação de glicose pelo diafragma dos ratos pertencentes aos grupos D (Sialotoxina I) e grupo E (Insulina), revelou que existem, entre ambos, diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade.

A mesma análise apresentou para F o valor de 254,8, para o coeficiente de variação (C.V.) 7,04 e uma diferença mínima significativa entre os ensaios analisados de 0,16.

Com a finalidade de se analisar os tipos de diferenças que existem entre os grupos, aplicou-se o teste de Tuckey que permite a comparação de médias 2 a 2, ao nível de 5% de probabilidade entre si.

Desse modo, podem ser vistos na Tabela V os valores da incorporação de glicose (micrograma por miligrama de tecido por hora), tanto dos animais pertencentes ao grupo D, com seus respectivos subgrupos, quanto do grupo E e subgrupos.

Assim, observa-se que o ensaio biológico, que continha somente a glicose, subgrupo D<sub>1</sub>, apresentou uma captação média de glicose de  $1,67 \pm 0,04$  ug/mg/hora, enquanto que os ensaios, contendo glicose com Sialotoxina I nas doses crescentes de 0,002; 0,01; 0,02 e 0,03 mg/ml, respectivamente, subgrupos D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> e D<sub>5</sub>, mostraram uma incorporação mē-

día de  $1,34 \pm 0,05$ ;  $1,10 \pm 0,01$ ;  $0,89 \pm 0,06$  e  $0,52 \pm 0,06$  microgramas por miligrama de tecido por hora, onde depreende-se que existem diferenças significativas entre si, e que a presença da Sialotoxina I, no meio de reação, é efetiva em diminuir a captação de glicose, e que essa diminuição aumenta à medida que se eleva a concentração da mesma (Tabela V e Gráfico 5).

Nos animais do grupo E, cujo ensaio biológico era constituído de glicose com insulina (subgrupo E<sub>1</sub>), a incorporação média de glicose foi de  $2,42 \pm 0,11$  ug/mg/h.

Todavia, no subgrupo E<sub>2</sub>, onde foi adicionada Sialotoxina I na concentração de 0,02 mg/ml, obteve uma incorporação média de glicose de  $1,28 \pm 0,14$  ug/mg/tecido/hora, mostrando uma diminuição de 47,1% na captação de glicose pelo diafragma (Tabela V e Gráfico 6).

Por outro lado, quando se analisa os dados do ensaio biológico do grupo D, subgrupo D<sub>2</sub>, que continha glicose + Sialotoxina I (0,002 mg/ml), cujo valor médio de incorporação era de  $1,34 \pm 0,05$ , e o grupo E, subgrupo E<sub>2</sub>, que era constituído de glicose + insulina + Sialotoxina I (0,02mg/ml), com uma incorporação média de  $1,28 \pm 0,14$ , o teste de Tuckey demonstrou que não ocorreram diferenças significativas, ao nível de 5% de probabilidade entre esses dois ensaios (Tabela V).

Os dados individuais da incorporação de glicose pelo diafragma dos ratos, nos diferentes ensaios analisados, podem ser encontrados nas Tabelas XXI e XXII do apêndice.

Como a incorporação de glicose apresentou diferenças significativas, entre as diferentes concentrações de

TABELA V: Incorporação de Glicose

	G.	SUBG.	ENSAIOS BIOLÓGICOS	MÉDIA $\pm$ $s_{\bar{x}}$
S I A L O T O X I N A  I	D	D <sub>1</sub>	Glicose	a 1,67 $\pm$ 0,04
		D <sub>2</sub>	Glicose+Sialotoxina I(0,002mg/ml)	bg 1,34 $\pm$ 0,05
		D <sub>3</sub>	Glicose+Sialotoxina I(0,01mg/ml)	c 1,10 $\pm$ 0,01
		D <sub>4</sub>	Glicose+Sialotoxina I(0,02mg/ml)	d 0,89 $\pm$ 0,06
		D <sub>5</sub>	Glicose+Sialotoxina I(0,03mg/ml)	e 0,52 $\pm$ 0,06
I N S U L I N A	E	E <sub>1</sub>	Glicose + Insulina	f 2,42 $\pm$ 0,11
		E <sub>2</sub>	Glicose + Insulina + Sialotoxi- na I (0,02 mg/ml)	g 1,28 $\pm$ 0,14

Valores médios e seus desvios padrões da incorporação de glicose "In Vitro", (microgramas por miligrama de tecido por hora), dos diafragmas de ratos, nos diferentes tratamentos.

Os tratamentos, seguidos das mesmas letras, não diferem, significativamente, ao nível de 5% de probabilidade entre si.

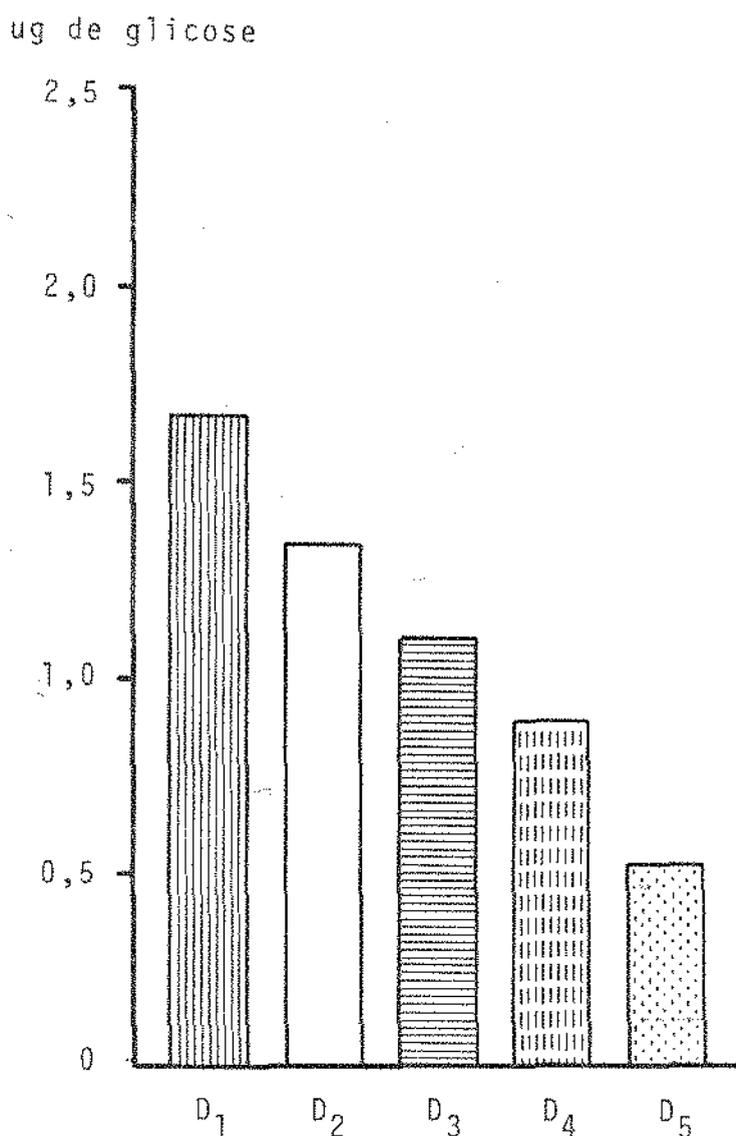


GRÁFICO 5:- Glicose incorporada (ug/mg de tecido/hora), dos sistemas experimentais:-

-  D<sub>1</sub>:- Glicose
-  D<sub>2</sub>:- Glicose + Sialotoxina I (0,002 mg/ml)
-  D<sub>3</sub>:- Glicose + Sialotoxina I (0,01 mg/ml)
-  D<sub>4</sub>:- Glicose + Sialotoxina I (0,02 mg/ml)
-  D<sub>5</sub>:- Glicose + Sialotoxina I (0,03 mg/ml)

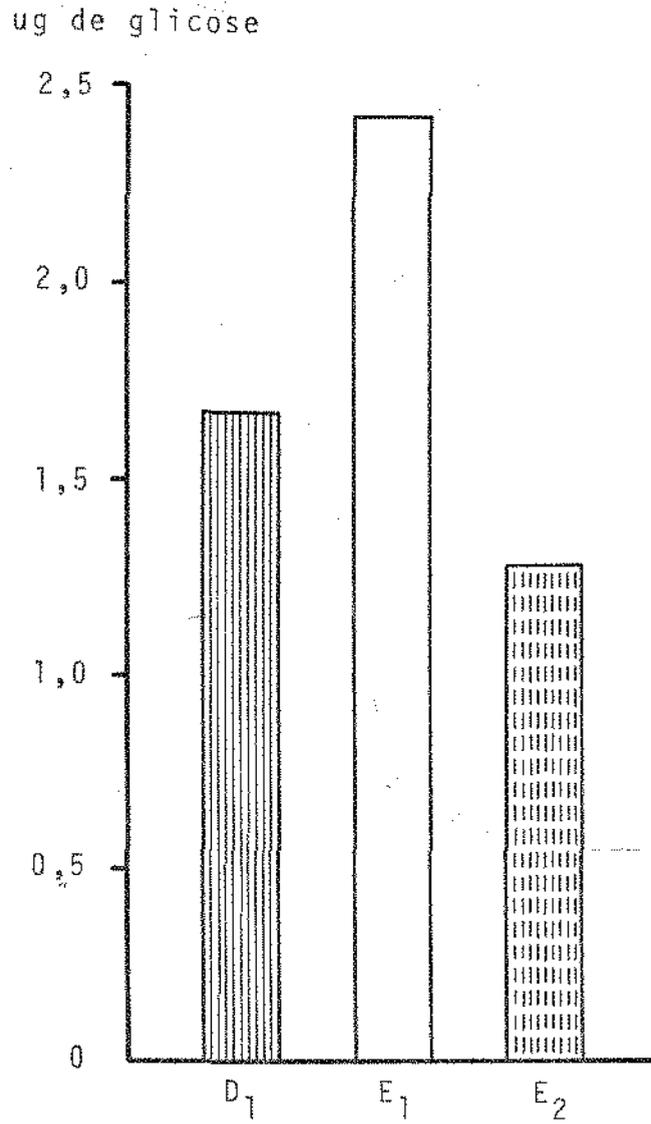


GRÁFICO 6:- Glicose incorporada (ug/mg de tecido/hora) dos sistemas experimentais:

-  D<sub>1</sub>:- Glicose
-  E<sub>1</sub>:- Glicose + Insulina
-  E<sub>2</sub>:- Glicose + Insulina + Sialotoxina I(0,02mg/ml)

Sialotoxina I, ajustou-se às mesmas doses uma regressão linear.

Através da equação:  $\hat{y} = \hat{a} + \hat{b}x$ , onde  $y$  = quantidade de glicose incorporada; e,  $x$  = doses de Sialotoxina I, o ajuste da regressão mostrou o seguinte resultado: equação estimada =  $\hat{y} = 1,52 - 33,6x$ .

A análise de variância (Tabela VI) para testar o ajuste da regressão deu um valor do teste F, de 48,9, significativo ao nível de 1% de probabilidade, mostrando que o ajuste foi muito bom.

Foi também determinado o valor do coeficiente de determinação  $R^2 = 0,94$ , que também comprova a qualidade do ajuste.

TABELA VI: Análise de variância da Regressão Linear da Incorporação de Glicose.

CAUSA DA VARIAÇÃO	GL	SO	QM	F
Regressão linear	1	0,718813	0,718813	48,9**
Desvio da Regressão	3	0,04416703	0,01470234	
TOTAL	4	0,76292		

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade

A equação mostra que cada unidade da concentração da Sialotoxina I, usada nos diferentes ensaios, causa

uma queda de 33,6 microgramas por miligrama de tecido por hora; ou, ainda, um acréscimo de 0,01 mg/ml de Sialotoxina I causa uma queda de 0,336 ug/mg de tecido/hora na incorporação de glicose (Gráfico 7). A equação está representada no Gráfico, em que:  $y = 1,52 - 33,6x$ .

Incorporação  
de glicose

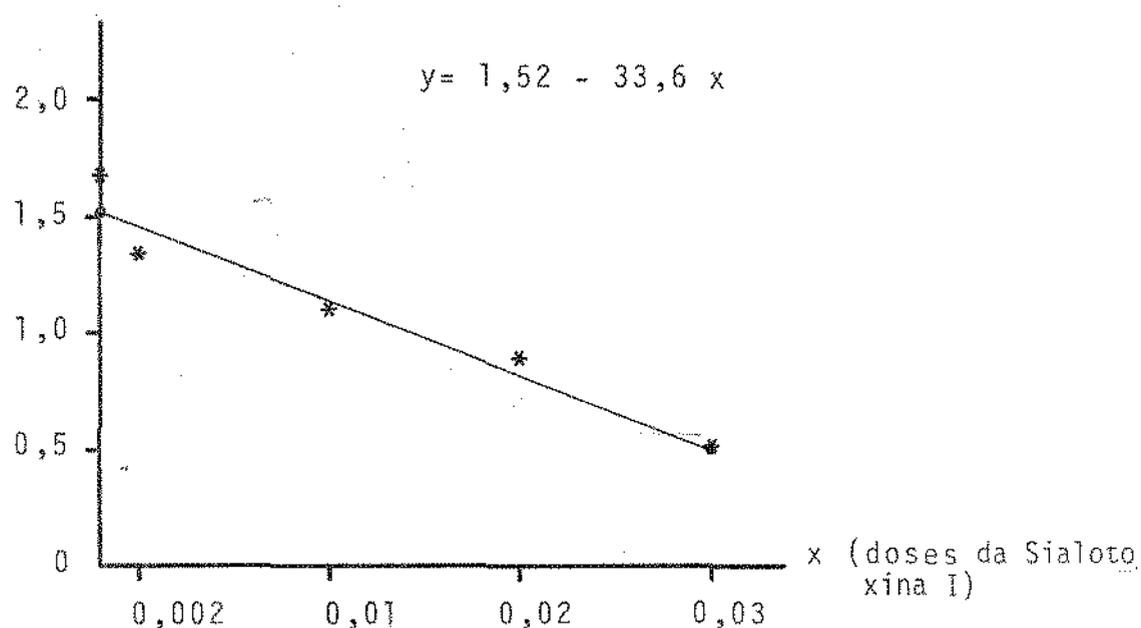


GRÁFICO 7:- Regressão linear da incorporação de glicose, em função da concentração da Sialotoxina I (\* indica os pontos observados).

Capítulo V

D I S C U S S Ã O

## 5. DISCUSSÃO

O papel das glândulas salivares, como órgãos de secreção endócrina, vem sendo investigado desde o início do século (FARRONI, 1911; UTIMURA, 1927). Em 1934, OGATA propôs o estabelecimento das glândulas salivares como órgãos endócrinos, com grandes contribuições metabólicas, especificamente no metabolismo de carboidratos.

A semelhança histológica das glândulas salivares, principalmente a parótida, com a estrutura morfo-histológica do pâncreas, induziu vários autores a relacionarem as atividades bioquímicas e, conseqüentemente, funcionais desses dois órgãos. Assim, TAKIZAWA (1954) e OGATA (1955) relataram a hiperatividade induzida no pâncreas pela ausência das glândulas salivares. A relação oposta, isto é, o incremento das atividades das glândulas salivares, associado à redução das ilhotas de Langerhans, foi constatado por HALMOS & SOMOGIY (1962).

O quadro formado pelas informações acumuladas, evidenciando o papel metabólico ativo das glândulas salivares, levou vários autores a tentarem isolar e identificar o fator ou os fatores metabólicos, provavelmente, secretados por tais órgãos, fato observado em 1955 por HILL que isolou, a partir de glândulas parótidas bovinas, um fator hiperglicemiante, ativo, em ratos. Por outro lado, efeitos hipoglicemiantes de extratos de glândulas salivares também foram relatados por FLEMING em 1962, e confirmados por trabalhos de

nossos laboratórios, posteriormente (TEIXEIRA, 1979 e GUIMARÃES et alii, 1979). Essa ação hipoglicemiante das glândulas parótidas é atribuída ao princípio ativo isolado dessas glândulas, e convencionalmente denominado Parotin (TAKIZAWA, 1954; OGATA, 1955 e ITO, 1960).

A correlação metabólica entre glândulas parótidas e o pâncreas foi descrita em vários trabalhos na década de 1970.

SILVERMAN & DUMBAR (1974) e LAWRENCE et alii (1975), atribuíram às glândulas salivares funções hiperglicemiantes, semelhantes às exercidas pelo pâncreas. Esses autores isolaram, ainda, das glândulas salivares uma substância, cuja ação, segundo eles, é semelhante ao do glucagon pancreático, fato que os levou a denominarem esta substância de glucagon salivar.

DOI et alii (1978), por sua vez, observaram a existência de um princípio ativo nas glândulas salivares que atua no metabolismo de carboidratos, de maneira semelhante à insulina, sendo por isso chamado de "insulin-like".

Os dados obtidos na literatura, até o momento, associados aos resultados de vários experimentos desenvolvidos nos nossos laboratórios, favorecem a formulação de uma teoria, segundo a qual as glândulas salivares exercem um papel regulador sobre o metabolismo de carboidratos, visando o estabelecimento dos níveis glicêmicos no sangue. Esse papel é exercido como função auxiliadora ao pâncreas, e em completa coordenação com ele. Esta teoria encontra forte apoio nos trabalhos

de TEIXEIRA (1979); GUIMARÃES et alii (1980); TEIXEIRA et alii 1985; ARRUDA VEIGA, 1987.

A fim de esclarecer o mecanismo pelo qual as glândulas salivares atuam na regulação do metabolismo de carboidratos, inúmeros trabalhos foram realizados em vários laboratórios com o objetivo de determinar e isolar os princípios ativos secretados por esses órgãos e, posteriormente, elucidar sua estrutura e mecanismo de ação.

Desse modo, BARKA (1980) mencionou a existência de 25 princípios ativos nas glândulas salivares, com uma vasta ação metabólica, que abrange a homeostase e afeta o crescimento e diferenciação celular, entre outras.

LIUZZI & ANGELETTI (1968) relataram que alguns dos princípios ativos, isolados das glândulas submandibulares de camundongos machos, apresentam efeitos tóxicos, quando administrados a camundongos machos e fêmeas. Estudos desses autores revelaram a existência de várias frações com a mesma ação tóxica, porém em níveis variados e, ainda, indicaram a possibilidade de serem de natureza proteica.

Os princípios ativos secretados pelas glândulas submandibulares com atividade letal foram também demonstrados por HOSHINO & LIN (1968 e 1969), os quais verificaram que os transplantes de glândulas submandibulares de camundongos fêmeas e machos imaturos, realizados em camundongos de ambos sexos não mostraram os efeitos letais, observados quando os mesmos experimentos eram repetidos com os doadores previamente tratados com testosterona.

Os dados obtidos por TAMES, FAVA DE MORAES & DOINE (1985), como também os obtidos por TEIXEIRA et alii (1986), servem de apoio e esclarecimento às observações de HOSHINO & LIN (1968 e 1969). Assim, o 1º grupo de pesquisadores observou que a castração de camundongos machos adultos, após 30 dias, além de promover uma excepcional queda na testosterona circulante, leva a uma atrofia subsequente dos ductos granulosos, fonte produtora de inúmeros fatores biologicamente ativos. TEIXEIRA et alii (1986) verificaram que a castração de camundongos adultos machos, após 30 dias, provocou a ausência do efeito letal dos extratos de glândulas submandibulares, e que a administração de testosterona em camundongos machos orquidectomizados induziu à produção dos fatores letais.

Esses dados evidenciam a relação provável, de dependência entre os fatores letais, produzidos pelas glândulas submandibulares de camundongos machos adultos e a testosterona. Essa relação se apresenta claramente nos camundongos fêmeas que receberam previamente doses de testosterona e, quando submetidos à doses crescentes de Sialotoxina I, mostraram maior resistência aos efeitos da mesma em relação às fêmeas normais (AGOSTINHO, 1987).

Com o intuito de identificar os fatores letais observados nas glândulas submandibulares, PINHEIRO (1985) isolou a partir dessas glândulas de camundongos machos adultos, substâncias de baixo peso molecular, denominadas por ele de Sialotoxina I, II, III e IV, onde todas apresentam, em vários níveis, atividades letais, mencionadas anteriormente.

AGOSTINHO (1987) administrou Sialotoxina I

(SI) em camundongos machos e fêmeas, em várias condições experimentais, e verificou seus efeitos biológicos, determinando também a dose letal da fração estudada. Os animais tratados com a SI apresentaram um quadro clínico variável, dependendo da dose, caracterizado por: hiper-excitabilidade, apatia, festinação, hipotonia, piloereção, taquicardia, sudoração, cianose, midríase e exoftalmia, poliúria, epistôtomos da cauda, convulsões, contratura e morte. As fêmeas foram bem mais sensíveis à ação da SI que os machos, tendo ainda apresentado uma dose letal, significativamente inferior.

Os resultados acima descritos, ofereceram uma base para o estudo do mecanismo de ação da SI, a nível celular. A indução da cianose, tanto em fêmeas quanto em machos, sob o efeito da SI, demonstrou o envolvimento da utilização do oxigênio no mecanismo de ação da toxina estudada.

Desse modo, estabeleceu-se um modelo experimental para o estudo do consumo de oxigênio, pelo sistema manométrico, segundo a técnica convencional de WARBURG (1972). O funcionamento do método foi testado através do uso de insulina, convencionalmente estabelecido (HECTER, LEVINE & SOSKIN, 1941; HAUGAARD & MARSH, 1952; TEIXEIRA, 1979; ARRUDA VEIGA, 1987).

A análise de variância dos resultados referente ao consumo de oxigênio (microlitro por grama de peso de tecido/hora), revela que existem diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade entre os 3 grupos experimentais (Controle, Sialotoxina I e Insulina), permitindo avaliar, através do teste de Tuckey, as diferenças entre as médias dos diversos ensaios biológicos.

Assim, nota-se pela Tabela IV (gráficos 1.2), que no grupo A<sub>1</sub> Controle, ao comparar os resultados dos subgrupos A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>, Endógeno e Endógeno + Glicose, percebe-se que a presença da glicose aumenta, significativamente, o consumo de oxigênio pelo diafragma dos ratos.

O consumo de oxigênio, no experimento considerado controle (Endógeno), constituído pelo diafragma incubado no tampão Krebs-Ringer Fosfato (TKRF), apresenta um valor médio de  $316,6 \pm 5,6$  ul de O<sub>2</sub>/g de tecido/hora. Esse valor médio difere, significativamente, da média obtida do experimento constituído pelos mesmos elementos do grupo controle Endógeno mais SI, na concentração de 0,02 mg/ml, onde o consumo de oxigênio foi de  $113,4 \pm 9,4$ , o que representa uma queda de 64,1 % no consumo de oxigênio, devido à presença da SI no meio de incubação.

Comparando-se, ainda, o consumo de oxigênio pelo diafragma entre os grupos A<sub>2</sub> (Endógeno + Glicose) e aqueles que contêm glicose e SI, em diferentes concentrações (B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub> e B<sub>5</sub>), verifica-se mais uma vez uma queda no consumo de oxigênio nos grupos que contêm a SI no meio de incubação.

Os dados também revelam que, à medida que as concentrações dessa toxina são aumentadas no meio de reação em 5, 10 e 15 vezes, o consumo de oxigênio diminui, respectivamente, em 72,1; 83,3 e 89,9%.

O papel do oxigênio no metabolismo aeróbico do diafragma do rato já é bem conhecido. O oxigênio é a etapa final de uma sequência de reações (fosforilação oxidativa), que

envolvem várias coenzimas e uma série complexa de reações, que tomam lugar nas membranas internas da mitocôndria. Estas membranas contêm um grupo de proteínas, que têm ferro em suas moléculas, conhecidas como citocromos. Nesse sistema os prótons e elétrons, provenientes das atividades metabólicas, escoam numa série de reações de redução e oxidação, que visam o aproveitamento máximo da energia produzida, e, finalmente, a formação de água.

Se o oxigênio não estiver disponível para o sistema de citocromos, o ATP não será formado pela mitocôndria. A interrupção desse sistema pode ser provocada por vários elementos como cianeto, 2-4-dinitrofenol, salicilato e outros. Essas substâncias reagem com um dos componentes do sistema, como por exemplo o cianeto, que reage com o citocromo final da cadeia, dificultando a transferência de elétrons ao oxigênio, e bloqueando a produção de ATP pela mitocôndria (VANDER-SHERMAN-LUCIANO, 1981).

A diminuição da utilização de oxigênio, observada em nossos dados, pode ser explicada por mecanismo semelhante, isto é, a SI pode provocar um bloqueio no sistema de transporte de elétrons, impedindo a formação de ATP, provocando, assim, a diminuição da utilização de oxigênio. Essa ação proposta da SI pode oferecer subsídios para explicar a mortalidade causada por ela nos animais, observada nos experimentos realizados por AGOSTINHO (1987).

O pequeno aumento no consumo de oxigênio ob-

servado na presença de glicose ( $373,1 \pm 19,3$ ) foi eliminado na presença da SI, isto é, a média do consumo de oxigênio obtida, no modelo experimental  $A_1$ , contendo apenas diafragma e tampão ( $316,6 \pm 5,6$ ), foi aumentada para  $373,1 \pm 19,3$  na presença da glicose  $A_2$ , (Endógeno + Glicose). Esse valor médio foi reduzido para  $62,2 \pm 8,1$ ,  $B_4$ , quando adicionou-se SI (0,02 mg/ml) a esse último experimento. Essa redução apresenta o produto somatório do efeito da SI na presença e na ausência da glicose.

Considerando o metabolismo exclusivamente aeróbico do diafragma, admite-se que toda a glicose consumida pelo músculo, após a sua conversão em piruvato, é completamente oxidada no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, provocando funcionamento do sistema de transporte de elétrons, a fim de reoxidar as coenzimas utilizadas neste ciclo. Sendo assim, alterações nos níveis de utilização de oxigênio afetarão, diretamente, o consumo de glicose, pelo diafragma. Esse raciocínio vem diretamente ao encontro dos resultados obtidos nos nossos experimentos.

A ação da SI também foi investigada no meio de incubação contendo insulina e glicose. Para tanto, utilizou-se os subgrupos  $C_1$ ,  $C_2$  e  $C_3$ .

Comparando-se os resultados dos subgrupos  $A_1$  e  $C_1$ , observa-se que a insulina é efetiva em aumentar o consumo de oxigênio, evidenciando que a mesma, além de aumentar o número de receptores e dos transportadores intracelulares (GEMMILL, 1940 e 1941; VILLEE & HASTINGS, 1949; VILLEE, WHITE & HASTINGS, 1952; KARNIELI et alii, 1981; WARDZALA & JEANRENAUD, 1981; KONO et alii, 1982), estimula a ação da hexoquinase no processo da

fosforilação da glicose, sendo insulino-dependente (LEVINE et alii, 1950; PARK, BORNSTEIN & POST, 1955; LEVINE & GOLDSTEIN, 1955 e PARK & JOHNSON, 1955; SHAW & STADIE, 1957).

Essas observações são confirmadas na análise dos subgrupos A<sub>2</sub> e C<sub>2</sub>, que revelam um aumento no consumo de oxigênio de 23,5%, em função da presença da insulina.

Por outro lado, quando se compara o consumo médio de oxigênio na presença de insulina e glicose (C<sub>2</sub>) e insulina + glicose + SI, (C<sub>3</sub>), observa-se uma redução neste consumo de 71,9%, o que demonstra que a SI é efetiva mesmo na presença da insulina.

É importante observar que os níveis de redução do consumo de oxigênio provocados pela SI, na presença ou na ausência de insulina, são praticamente iguais, indicando ações independentes dos dois princípios.

A ação da insulina, sobre receptores ou sobre a ação enzimática, deve ocorrer a nível da entrada de glicose na célula, enquanto nossos resultados sugerem que a SI atua, provavelmente, nas etapas finais da cadeia respiratória.

Quanto à incorporação de glicose (microgramas/miligrama de tecido/hora), a análise de variância indica que existem diferenças, estatisticamente, significantes, ao nível de 5%, entre os diferentes ensaios biológicos, nos grupos D e E, Sialotoxina I e Insulina, respectivamente (Tabela V e gráficos 5 e 6).

Nota-se que a presença de SI em concentrações de 0,002; 0,01; 0,02 e 0,03 mg/ml no meio, contendo glicose, pro

vocou uma redução na sua incorporação de 19,7; 34,1; 46,7 e 68,8%, respectivamente.

Ajustando-se estas doses para uma reta de regressão linear, a sua equação mostra que cada unidade de SI usada, nos diferentes ensaios, causa uma queda de 33,6 microgramas por miligrama de tecido por hora; ou, ainda, um acréscimo de 0,01 mg/ml de SI, causa uma queda de 0,336 microgramas por miligrama de tecido por hora (Gráfico 7).

A incorporação da glicose observada no diafragma de ratos mantidos em tampão Krebs-Ringer Fosfato, contendo somente glicose ( $D_1$ ), foi de  $1,67 \pm 0,04$ . A adição da SI (0,02 mg/ml) ( $D_3$ ), ao meio de incubação, resultou numa queda na utilização de glicose, levando a um valor médio de  $0,89 \pm 0,06$ . Esse fato pode ser entendido como sendo o produto do acúmulo de intermediários no ciclo do ácido tricarboxílico e da glicólise, provocado por um bloqueio no sistema de transporte de elétrons.

Já é sabido que a adição da insulina no meio de reação, aumenta a incorporação da glicose, tanto em tecido adiposo (TEIXEIRA, 1979) quanto em preparação isolada do músculo diafragma (RANDLE & SMITH, 1958). Desse modo, a presença desse hormônio no meio de incubação, aumentou a incorporação de glicose pelo diafragma, elevando o valor médio de  $1,67 \pm 0,04$  para  $2,42 \pm 0,11$  ug/mg/h.

A adição da insulina, no meio de incubação ( $E_1$ ), significa um aumento na captação da glicose pelo diafragma em 44,9%, quando comparado com o meio de reação que contém somente glicose ( $D_1$ ) na concentração de 1,0 mg/ml, elevando o

valor médio de  $1,67 \pm 0,04$  para  $2,42 \pm 0,11$  ug/mg/h, dados estes que são confirmados por inúmeros pesquisadores (CZECH, 1977; CUSHMAN & WARDZALA, 1980; SUZUKI & KONO, 1980; WARDZALA & JEANRENAUD, 1981).

Outra observação que merece destaque, é que o efeito na redução da incorporação da glicose pela SI (0,02mg/ml) foi mantido mesmo na presença da insulina: e isso pode ser comprovado pela análise do meio de reação ( $E_2$ ), contendo glicose, insulina e SI, que mostra uma diminuição de 47,1% na sua incorporação em relação ao meio, contendo glicose + insulina ( $E_1$ ).

Os nossos resultados encontram forte suporte e são similares àqueles descritos por EBOUÉ-BONIS & CLAUSER (1977), quando, analisando o efeito combinado da ação de insulina e florizin no transporte e metabolismo de carboidrato mostraram que o florizin inibe o transporte de glicose, tanto na presença quanto na ausência de insulina.

Tendo em vista, que o estudo desse peptídeo (SI), produzido pelas glândulas submandibulares de camundongos machos, ainda encontra-se na fase de caracterização bioquímica muito daquilo que foi discutido, neste trabalho, deverá ser esclarecido com a realização de estudos mais profundos e completos que, provavelmente, trarão novos subsídios sobre as suas ações biológicas, seu mecanismo de ação e sua atividade letal.

Trata-se, sem dúvida alguma, de um campo de pesquisa que deve ser explorado, no sentido de se obter novos conhecimentos para a sua subsequente aplicação no campo biológico.

Capítulo VI

C O N C L U S Õ E S

## 6. CONCLUSÕES

A análise e a descrição dos resultados obtidos dos estudos "in vitro", sobre os efeitos da Sialotoxina I, subsidiam as seguintes conclusões:

1- A substância, produzida pelas glândulas submandibulares de camundongos machos, denominada de Sialotoxina I, promove, efetivamente, a redução do consumo de oxigênio ("In Vitro"), pelo diafragma de ratos normais.

2- A Sialotoxina I, diminui a captação de glicose ("In Vitro"), pelo diafragma de ratos normais.

3- A Sialotoxina I apresenta diminuição no consumo de oxigênio e redução na incorporação de glicose, mesmo na presença da insulina.

Capítulo VII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADLER, R. & NARBAITZ, R. Action of rat submaxillary gland extracts on neural tube growth in organ culture. J.Embryol.exp.Morph., 114: 281-6, 1965.
2. AGOSTINHO, S.M.S. Sialotoxina I: Determinação da DL<sub>50</sub>, Suas Manifestações Biológicas e Sua Interação com a Testosterona e Estradiol em Camundongos. Piracicaba, 1987. [Tese (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP].
3. ANDERSON, L.C. Effects of alloxan diabetes and insulin in vivo on rat parotid gland. Am.J.Physiol., 245: 431-7, 1983.
4. ANGELETTI, P.U.; SALVI, M.L.; CAPANI, F.; FRATO, L. Granulocytosis inducing factor from the mouse submaxillary gland. Biochim.biophys.Acta, 111: 344-6, 1965.
5. ARRUDA VEIGA, M.C.F. Purificação e caracterização de um peptídeo de glândulas submandibulares de camundongos machos com atividade tóxica renal. Campinas, 1979. [Tese (Mestrado) - Instituto de Biologia - UNICAMP].
6. \_\_\_\_\_ . Efeitos das Frações I, II, III e IV do Parotin Sobre a Incorporação de Glicose e Consumo de Oxigênio Pelo Tecido Adiposo de Ratos Normais e Diabéticos. Piracicaba, 1987. [Tese (Doutoramento) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP].
7. ATTARDI, D.G. & SCHESINGER, R. Submaxillary gland of mouse; properties of a purified protein affecting muscle in vitro. Science, 157: 1253-5, 1967.

8. 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.
  9. AUNAP, E. Ueber die Beziehungen Zwischen Kernn Ergasto - Plasma un Mitrochandriender Parotiszellen der Ratte. Z.mikrosk anat.Forsch., 24: 412-6, 1931.
  10. BARKA, T. Partial purification of a mitotic supressor from the sali vary gland. Expl.mol.Path., 18: 225-53, 1973.
  11. \_\_\_\_\_. Biologically Active Polypeptides in Submandibular Glands. J.Histochem.Cytochem., 28: 836-59, 1980.
  12. BAST, E.M. & MILLS, K.S. Mouse submaxillary gland extract as a growth stimulator and orientor of chick cardiac cells in vitro. Growth, 72: 295-301, 1963.
  13. BIRNKRANT, W.B. The influence of the parotid gland on blood sugar. J.Lab.clin.Med., 26: 1009, 1941.
  14. \_\_\_\_\_ & SHAPIRO, R. The influence of a parotid extract on the blood sugar and structure of the pancreas of the rat. J.Lab.clin. Med., 27: 510-8, 1942.
  15. BUEKER, E.D. & SCHENKEIN, 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.
-

16. 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, 1965.
17. BYYNY, R.L.; ORTH, D.N.; COHEN, S. Radioimmunoassay of epidermal growth factor. Endocrinology, 90: 1261, 1972.
18. CARPENTER, G. & COHEN, S. Epidermal growth factor. A.Rev. Biochem., 48: 193, 1979.
19. CIARALDI, T.P. & OLEFSKY, J.M. Coumpling of insulin receptors to glucose transport: a temperature-dependent time lag in activation of glucose transport. Archs Biochem.Biophys., 193:221-31, 1979.
20. 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. ---
21. \_\_\_\_\_, Isolation of a mouse submaxillary gland protein incisor eruption and eyelid opening in newborn animal. J.Biol. Chem., 237(5): 1552-62, 1962.
22. \_\_\_\_\_ & LEVI-MONTALCINI, R. A nerve growth stimulating factor isolated from snake venom. Proc.natn.Acad.Sci.U.S.A., 42: 571, 1956.
23. \_\_\_\_\_; TAYLOR, J.M.; MURAKAMI, K.; MICHELAKIS, A.M.; INAGAMI, T. Isolation and characterization of renin-like enzymes from mouse submaxillary glands. Biochemistry, 11: 4286, 1972.

24. CORKILL, A.B. & NELSON, J.F. The pituitary gland and carbohydrate metabolism. Part II- The anterior lobe. Med.J.Aust., 1: 172-4, 1947.
25. CRANE, R.K. & SOLS, A.J. The association of hexokinase with particulate fractions of brain and other tissue homogenates. J. Biol.Chem., 203: 273-92, 1953.
26. CUSHMAN, S.W. & WARDZALA, L.J. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cells. J.Biol.Chem., 255: 4758-62, 1980.
27. CZECH, M.P. Molecular basis of insulin action. A.Rev. Biochem., 46: 359-84, 1977.
28. DAVIDSON, D.; LEIBEL, B.S.; BERRIS, B. A symptomatic parotid gland enlargement in diabetes mellitus. Ann.intern.Med., 70: 31-8, 1969.
29. 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.
30. DE TAKÁTS, G. Ligation of tail of pancreas in juvenile diabetes. Endocrinology, 14: 255-62, 1930.
31. DOBREFF, M. Compensatory hypertrophy of the parotid gland in presence of hypofunction of pancreatic islands. Dt.med. Wschr., 62: 67-70, 1936.

32. DOI, K.; KAWARA, A.; FUJJI, S.; MATSUURA, M.; YOSHIDA, Y.; KISAIA, Y.; YOSHIDA, M.; KANEKO, S.; BABA, S. Insulin-like substance in saliva. Iga Kunoayumi, 106: 477-8, 1978.
33. DUMBAR, J.C.; SILVERMAN, H.; KIRMAN, E. Role of the submaxillary gland and of the kidney in the hyperglycagonaemia of eviscerated rats. In: FOA, P.P.; BAYAY, J.S.; FOA, N.L., eds. Glucagon: its role in physiology and clinical medicine. Berlin, Springer, 1977. p. 157-66.
34. EBOUÉ-BONIS, D. & CLAUSER, H. The combined action of insulin and phlorizin on transport and metabolism of sugars and nucleotide turnover in the isolated rat diaphragm. Biochimie, 59: 527-33, 1977.
35. EKFORSS, T.O.; CHANG, W.W.L.; BRESSLER, R.S.; BARKA, T. Isoproterenol accelerates the postnatal differentiation of rat submandibular gland. Devl.Biol., 29: 38, 1972 .
36. \_\_\_\_\_ & HOPUSU-HAVU, V.K. Properties of the esteropeptidase purified from the mouse submandibular gland. Enzymologia, 43: 177, 1972 .
37. \_\_\_\_\_; RIEKKINEN, P.J.; MALMIHARJU, T.; HOPUSU-HAVU, V.K. Four izozymic forms of a peptidase resembling kallikrein purified from the rat submandibular gland. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem., 348: 111, 1967.
38. FARRONI, B. Funzione endocrine delle glandole salivarid ed eliminazione degli zucheri. Riv.crit.Clin.med., 12: 577-93, 1911.
39. FERRANNINI, A. Glycosialorehée de secretion interne des glands salivaires. Revue Méd., 31: 269-73, 1911.
40. FERRETI, G. Su due casi di ipertrofia, dele parotid in diabetici. G.Clin.med., 17: 1149, 1936.

41. FLAUM, E. Parotishypertrophie ein symptom des Diabetes Mellitus. Klin.Wschr., 11: 1704, 1932.
42. FLEMING, H.S. Pancrease and parotin. Endocr.jap., 9: 41-56, 1962.
43. GAULT, S.D. The effect of parotidectomy on blood sugar levels in the rat and mouse. J.Lab.clin. Med., 43: 119-22, 1954.
44. GEMMILL, C.L. The effect of insulin on the glycogen content of isolated muscles. Bull.Johns Hopkins Hosp., 66: 232, 1940.
45. \_\_\_\_\_. The effects of glucose and of insulin on the metabolism of the isolated diaphragm of the rat. Bull.Johns Hopkins Hosp., 68: 329-36, 1941.
46. \_\_\_\_\_ & HAMMAN, L. Jr. The effect of insulin on glycogen deposition and on glucose utilization by isolated muscles. Bull.Johns Hopkins Hosp., 68: 50-7, 1941.
47. GLASMAN, F. Actividad endocrina de las glandulas salivares. Semana med., 10: 1287-90, 1964.

48. GODLOWSKY, Z.Z. The role of submaxillary glands in homeostasis of insulin. Diabetes, 17: 325-6, 1968.
49. \_\_\_\_\_ & CALANDRA, J.C. Salivary glands as endocrine organs. J.appl.Physiol., 15: 100-5, 1960.
50. \_\_\_\_\_; GAZDA, M.; WITHERS, B.T. Ablation of salivary glands as initial step in the management of selected forms of diabetes mellitus. Laryngoscope, 81(8): 1337-58, 1971.
51. GOLJANITZKI, J.A. Zur frage des eratzes der endokrinen druesen. Arch.Klin.Chir., 130: 763, 1924.
52. GRESIK, E. & BARKA, T. Immunocytochemical localization of epidermal growth factor in mouse submandibular gland. J.Histochem.Cytochem., 25: 1027-35, 1977.
53. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Immunocytochemical localization of epidermal growth factor in the developing submandibular gland of the mouse. Am.J.Anat., 151: 1, 1978.
54. GUIMARÃES, A.; TEIXEIRA, D.; VIZIOLI, M.R.; VIEIRA, S. Efeitos da parotidectomia sobre o nível glicêmico e o teor de glicogênio hepático. Revta bras.Pesq. méd. Biol., 12(1): 53-61, 1979.
55. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; EL-GUINDY, M.M.; CURY, J.

- A. Effects of salivary gland active principle (Parotin) on glycemie level and hepatic glycogen content in aloxan diabetic rats. Archs oral Biol., 25: 11-3, 1980.
56. GUTMAN, Y.; LEVY, M.; SHORR, J. Renin-like activity of the rat submaxillary gland: characterization and the effect of several drugs and stimuli. Br.J.Pharmac., 47: 59, 1973.
57. HALMOS, T. & SOMOGYI, B. Investigations on the correlation between human saliva and carbohydrate metabolism. Nagy Belor Arch., 15: 220-5, 1962.
58. HARING, H.U.; BIERMANN, E.; KEMMLER, W. Coumpling of insulin binding and insulin action on glucose transport in fat cells. Am.J.Physiol., 240: 556-65, 1981.
59. \_\_\_\_\_; KEMMLER, W; HEPP, K.D. Effects of colchicine and vinblastine on the coupling of insulin binding and insulin action in fat cells. FEBS Lett., 105: 329-32, 1979.
60. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; RENNER, R.; HEPP, K.D. Initial lag-phase in the action of insulin on glucose transport and cAMP levels in fat cells. FEBS Lett., 95: 177-80, 1978.
61. HATAKEYAMA, K.; HIRAMATSU, M.; MINAMI, N. Lethal factor in the male mouse submandibular gland. Can.J. Physiol.Pharmac., 59: 1134-38, 1981.
62. HAUGAARD, N. & MARSH, J.B. Effect of insulin on the metabolism of adipose tissue from normal rats. J. Biol.Chem., 194: 33-40, 1952.
63. HECHTER, O.; LEVINE, R.; SOSKIN, S. Relationship between sugar concentration and glycogetic action of insulin on rat diaphragm in vitro. Proc.Soc.exp.Biol. Med.,

46: 390-3, 1941.

64. HERMAN, M.S. & RAMEY, E.R. Epinephrine action on glucose uptake by rat diaphragm; effect of ionic composition. Am.J.Physiol., 199(2): 226-8, 1960.
65. HIKI, Y.; AKAZAKI, K.; BAN, T.; MIYAZAKI, J.; TAKIZAWA, N. Experimental study of salivary glands. Trans. Jap.path.Soc., 22: 273-80, 1932.
66. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; YOSHIDA, T. Experimental studies on diabetes mellitus. Trans-Jap.path.Soc., 19: 49-56, 1929.
67. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; MIYASAKI, Y.; TAKIZAWA, N.; BAN, T.; YOSHIDA, T.; NISHIMURA, S. On the internal secretion of the salivary gland. Tokyo Igakkai Zasshi, 47: 773-814; ibid 48: 856-78, 1934.
68. \_\_\_\_\_; BAN, T.; AKAZAKI, K.; TAKIZAWA, N.; MIYASAKI, Y. Experimental studies on the salivary gland. Trans. Jap.path.Soc., 20: 130-3, 1930.
69. HILL, T.J. 1955. Apud GLASMAN, F., op.cit.ref. 47.
70. HILTON, S.M. The physiologic role of glandular kallikreins. In Bradykinin, Kallidin and Kallikrein. In: ERDOS, E.G. Handbk expl.Pharmac., 25: 389, 1970.
71. HIRAMATSU, M.; HATAKEYAMA, K.; MINAMI, N. Male mouse submaxillary gland secretes highly toxic proteins. Experimentia, 36: 940-2, 1980.
72. HOFFMAN, A.; Mc AUSLAN, B.; ROBERTSON, D.; BURNETT, E. An endothelial growth-stimulating factor from salivary glands. Expl Cell Res., 102: 269, 1976.

73. 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.
74. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Transplantability of \_\_\_\_\_ salivary glands of mice and its lethal effects on the host. Anat.Rec., 160: 474-5, 1968.
75. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Lethal factor released from submandibular grafts in mice. Can.J.Physiol. Pharmac., 46: 329-34, 1969.
76. \_\_\_\_\_; DECKER, R.F.; MOLNAR, F.; KIM, Y.T. hypoglycaemic effects of salivary duct ligation upon diabetes mellitus in mice. Archs oral Biol., 21: 105-11, 1976.
77. HUANG, J.C.C.; HOSHINO, K.; LIN, C.D. Effect of ligation of the mouse submandibular excretory duct on the production of the lethal factor. Anat.Rec., 172: 455-56, 1972.
78. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; KIM, Y.T.; CHEBIB, F.S. Species and strain differences in the lethal factor of the mouse submandibular gland. Can.J.Physiol.Pharmacol., 55: 1107-11, 1977.
79. HUTSON, J.M.; EVANS, D.; FOWLER, R. Effect of salivary glands on wound contraction in mice. Nature, 279: 793, 1979.
80. ITO, Y. Biochemical studies on salivary gland hormone. Endocr.Jap., 1: 1-50, 1954.
81. \_\_\_\_\_. Parotin: a salivary gland hormone. Ann.N.Y. Acad.Sci., 85: 228-310, 1960.
82. JONES, R.O. The in vitro effect of epithelial growth

- factor on rat organ cultures. Expl Cell Res., 43: 645, 1966.
83. 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.
84. JOSÉ, J.L. Análise dos efeitos das diferentes frações do parotin sobre a hiperglicemia de ratos diabéticos experimentais. Piracicaba, 1987. [Tese (livre-docência) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP].
85. 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.
86. KAKIZAKI, G.; SASAHARA, M.; SOENO, T.; ISHIDATE, T.; SENOO, A. Mechanism of the pancreas-parotid gland interaction. An experimental study in parabiotic rats. Am.Gastroenterol., 70: 635-44, 1978.
87. KARNIELI, T.E.; ZARNOWSKI, M.J.; HISSIN, P.J.; SIMPSON, I.A.; SALANS, L.B.; CUSHMAN, S.M. Insulin - stimulated - Translocation of Glucose Transport Systems in the Isolated Rat Adipose Cell. J.Biol.Chem., 256: 4772-7, 1981.
88. KIPNIS, D.M. & CORI, C.F. Studies of tissue permeability. V-The penetration and phosphorylation of 2-deoxyglucose in the rat diaphragm. J.Biol.Chem., 234: 171-7, 1959.
89. KONO, T.; ROBINSON, F.W.; BLEVINS, T.L.; EZAKI, O. Evidence that translocation of the glucose transport activity is the major mechanism of insulin action on

- glucose transport in fat cells. J.Biol.Chem., 257: 10942-10947, 1982.
90. KRAHL, M.E. & CORI, C.F. The uptake of glucose by the isolated diaphragm of normal, diabetic and adrenalectomized rats. J.Biol.Chem., 170: 607-18, 1947.
91. LAWRENCE, A.M.; KIRSTEIN, L.; HOJUAT, S.; RUBIN, L.; POLOYAN, V. Salivary gland glucagon: a potent extra-pancreatic hyperglycemic factor. Clin.Res., 23: 563A, 1975.
92. LEVI-MONTALCINI, R. & BOOKER, B. Excessive growth of the sympathetic ganglia evoked by a protein isolated from mouse salivary glands. Proc.natn.Acad.Sci.USA, 46: 373, 1960.
93. \_\_\_\_\_ & ANGELETTI, P.U. Hormonal control of the NGF content in the submaxillary glands of mice. In Salivary glands and their secretions. Edited by L.M. Sreenby and J. Meyer. Pergamon Press Book, The Macmillan Company, New York. pp. 129-39, 1964.
94. LEVINE, R. & GOLDSTEIN, M.S. On the mechanism of action of insulin. Recent Prog.Horm.Res., 11: 343, 1955.
95. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; HUDDLESTON, B.; KLEIN, S.P. Action of insulin on the permeability of cells to free hexoses, as studied by its effect on the distribution of galactose. Am.J.Physiol., 163: 70, 1950.
96. LIN, C.D. & HOSHINO, K. Testosterone dependency of the lethal factor in mouse submandibular gland isografts. Can.J.Physiol.Pharmac., 47: 335, 1969.
97. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Hemorrhagic phenomena caused in the host mice by submandibular gland isografts from males. Proc.Can.Fed.Biol.Soc., 12: 8-21, 1969.

98. LIN, C.D. & HOSHINO, K. Strain differences in the lethal factor exerted by submandibular glands transplanted from male mice. Experientia, 26: 753, 1970.
99. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Testosterone protection against the lethal factor in grafts of mouse submandibular gland. Toxicon, 9: 299-300, 1971.
100. LIUZZI, A. & ANGELETTI, P.U. Studies on the toxic effects of mouse submaxillary gland extracts. Experientia, 24: 1034, 1968.
101. MANSFELD, G. & SZIRTES, L. Ueber die begehungen zwischen aeusserer und innerer sekretion der druesen. Arch.exp.Path.Pharmak, 130: 1-28, 1928.
102. MAYNER, D.A. & ACKERMAN, G.A. Tissue localization of ribonuclease activity by the substrate film technique. J.Histochem.Cytochem., 11: 573, 1963.
103. 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.
104. MURAKAMI, K.; TANIGUCHI, H.; BABA, S. Presence of insulin-like imunoreactivity and its biosynthesis in rat and human parotid gland. Diabetologia, 22: 358-61, 1982.
105. NEWSHOLME, E.A. & RANDLE, P.J. Effects of anoxia, insulin, adrenaline and prolonged starving on concentrations of hexose phosphates in isolated rat diaphragm and perfused isolated rat heart. Biochem. J., 80: 655, 1961.
106. OGATA, T. Ueber du innere sekretion der mundspeschel drusen. O Trans. of the 99 Congr.Far.East.Ass.Trop. Med.Nanking, 2: 709-12, 1934. Apud OGATA, T., op.cit.ref. 107.

107. OGATA, T. The internal secretion of salivary glands. Endocr. jap., 2: 247-61, 1955.
108. \_\_\_\_\_; 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. 107.
109. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; ISHII Z. Chemical and pathological studies on the isolation of salivary hormone. Igakuto-Seibutsu gaku, 5: 253-7, 1944.
110. PARHOM, C.I.; BABES, A.E.; PETREA, I. Endocrinologie des glands salivaires. 1957. Apud GLASMAN, F., 1964, op. cit. ref. 47.
111. PARK, C.R.; BORNSTEIN, J.; POST, R.L. Effect of insulin on free glucose content of rat diaphragm in vitro. Am.J.Physiol., 182: 12, 1955.
112. \_\_\_\_\_ & JOHNSON, L.H. Effect of insulin on transport of glucose and galactose into cells of rat muscle and brain, Am.J.Physiol., 182: 17, 1955.
113. PHILLIP, H.; SMITH, D.; PATEL, G. Immunochemical studies of the insulin-like material in the parotid gland of rats. Diabetes, 33: 661, 1984.
114. PINHEIRO, C.E. Caracterização química e biológica das Sialotoxinas. In: Simpósio Anual da Academia de Ciências do Estado de São Paulo, 10., São Paulo, 1985. Resumos, p. 17.
115. \_\_\_\_\_. Sialotoxins: A family of toxic substance isolated from the sub-mandibular glands of the male mice. Revista de Odontologia da USP, 1988. [no prelo]
116. RAFAELSEN, O.J. Glycogen content of rat diaphragm after after intraperitoneal injection of insulin and other hormones. Acta physiol. scand., 61: 314-22, 1964.

117. RAFAELSEN, O.J.; VILMA, L.; RENOLD, A.E. Localized intraperitoneal action of insulin on rat diaphragm and epididymal adipose tissue. Diabetes, 14(1): 19-26, 1965.
118. RANDLE, P.J. & SMITH, G.H. Regulation of the uptake of glucose by isolated rat diaphragm. Biochim. biophys. Acta, 25: 442, 1957.
119. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Regulation of glucose uptake by muscle. 1. The effects of insulin, anaerobiosis and cell poisons on the uptake of glucose and release of potassium by isolated rat diaphragm. Biochem. J., 70: 490, 1958 .
120. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Regulation of glucose uptake by muscle. 2. The effects of insulin, anaerobiosis and cell poisons on the penetration of isolated rat diaphragm by sugars. Biochem. J., 70: 501-8, 1958 .
121. ROSENFELD, G. Speicheldrusen Kohlehydrat soff Wechsel. Klin. Wschr., 12: 711, 1933. Apud BIRNKRANT; W.B. & SHAPIRO, R. op.cit.ref. 14.
122. SCHACHTER, M. Vasodilation in the submaxillary gland of the cat rabbit and sheep. In Bradykinin, Kallikrein. In: ERDOS, E.G. Handbk expl Pharmac., 25: 400, 1970.
123. SCHENKEIN, I.; LEVI, M.; BUEKER, E.D. & WILSON, J.D. Immunological and enzymatic evidence for the absence of an esteroproteolytic enzyme, protease D, in the submandibular gland of the mouse. Endocrinology, 94: 840, 1974.
124. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; FRANKLIN, E.C.; FRANGIONE, B. Proteolytic enzymes from the mouse submaxillary gland. Archs Biochem. Biophys., 182: 64, 1977.

125. SCHENKEIN, I.; BOESMAN, M.; TOKARSKY, E.; FISHMAN, L.; LEVY, M. Proteases from mouse submaxillary gland. Biochem.Biophys.Res.Commun., 36: 156, 1969.
126. SEALS, J.R.; Mc DONALD, J.M.; JARRET, L. Insulin effect on protein phosphorylation of plasma membrane and mitochondria in a subcellular system from rat adipocytes. J.Biol.Chem., 254: 6991, 1979.
127. SEELIG, S. Ueber beziehungen zwischen parotis, pankreas, blutzucker under diabetes mellitus. Klin.Wschr., 7: 1228-32, 1928. Apud GLASMAN, F. op.cit.ref. 47.
128. SHAW, W.N. & STADIE, W.C. Coexistence of insulin-responsive glycolytic systems. J.Biol.Chem., 227: 115, 1957.
129. 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.
130. SHERIDAN, J.W. & STANLEY, E.R. Tissue sources of bone marrow colony stimulating factor. J.cell.Physiol., 78: 451, 1971.
131. SILVERMAN, H. & DUMBAR, J.C. The submaxillary gland as a possible source of glucagon. Bull.Sinai Hosp. Detroit, 22: 192-3, 1974.
132. SMITH, S.; MAZUR, A.; VOYLES, N.; BHATHENA, S.; RECENT, L. Is submaxillary gland immunoreactive glucagon important in carbohydrate homeostasis. Metabolism, 28: 343, 1979.
133. SREEBNY, L.M. Studies of salivary gland proteases. Ann.N.Y.Acad.Sci., 85: 182, 1960.

134. 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.
135. STADIE, W.C. Current concepts of the action of insu-  
lin. Physiol.Rev., 34: 52-100, 1954.
136. \_\_\_\_\_ & ZAPP, J.A. The effect of insulin upon  
the synthesis of glycogen by rat diaphragm in vi-  
tro. J.Biol.Chem., 170: 55-65, 1947.
137. \_\_\_\_\_; HAUGAARD, N.; MARSH, J.B. Combination of  
insulin with muscles of hypophysectomized rat. J.  
Biol.Chem., 188: 167-72, 1951.
138. STEINBERG, T. & GWINUP, C. Effect of submaxillary  
gland extirpation on glucose and insulin toleran-  
ce in dogs. Diabetes, 21(6): 722-32, 1972.
139. SUZUKI, K. & KONO, T. Evidence that insulin causes  
translocation of glucose transport activity to  
the plasma membrane from an intracellular storage  
site. Proc.natn.Acad.Sci.U.S.A., 77: 2542-5, 1980.
140. SWIGART, R.H.; HILTON, F.K.; DICKIE, M.M.; FOSTER,  
B.J. Effect of gonadal hormones on submandibular  
gland amylase activity in male and female (57 BL  
16) mice. Endocrinology, 76: 776, 1965.
141. TAKADORO, S.; SUZUKI, S.; NAKAMURA, K.; UCHIYAMA, S.;  
SHIBATA, K. Salivary glands and carbohydrate me-  
tabolism. Naibunpi, 21(6): 129-34, 1955.
142. TAKIZAWA, N. A pathological research of the internal  
secretion on the salivary glands. Acta path.jap.,  
4: 129-66, 1954.

143. 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. In: Simpósio Anual da Academia de Ciências do Estado de São Paulo. 10., São Paulo, 1985. Resumos. p. 15.
144. TEIXEIRA, D. Efeitos do Parotin sobre a hiperglicemia incorporação de glicose e consumo de oxigênio pelo epidídimo de ratos normais e diabéticos. Piracicaba, 1979. [Tese (Livre-docência) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP].
145. \_\_\_\_\_; GUIMARÃES, A.; CURY, J.A. Effects of the active principle from salivary glands parotin on the glycaemic of diabetic rats. Archos Biol. Technol., 28(3): 363-9, 1985.
146. \_\_\_\_\_; CURY, J.A.; PINHEIRO, C.E.; GUIMARÃES, A.; ARRUDA VEIGA, M.C.F. Efeito da castração na atividade tóxica do extrato de glândulas submandibulares de camundongos. Anais da SBPqO, 2: 53, 1986.
147. TURRIAN, H. Quelques caracteristiques du principe hypertensif contenu dans les glandes salivaires de la souris. Helv.phys.Acta., 18: 259, 1960.
148. UTIMURA, S. 1927. - Apud GLASMAN, F., op.cit.ref. 47.
149. VANDER, A.J.; SHERMAN, J.H.; LUCIANO, D.S. Fisiologia Humana; Mc Graw-Hill, 1981.
150. VERZAR, F. & WENNER, V. The action of steroids on glycogen breakdown in surviving muscle. Biochem. J., 42: 48-51, 1948.
151. VILLEE, C.A. & HASTINGS, A.B. The metabolism of  $C^{14}$ -labeled glucose by the rat diaphragm in vitro. J. Biol.Chem., 179: 673-87, 1949.

152. VILLEE, C.A.; WHITE, V.K.; HASTINGS, A.B. Metabolism of C<sup>14</sup>-labeled glucose and pyruvate by rat diaphragm muscle in vitro. J.Biol.Chem., 195: 287, 1952.
153. WALAAS, E. & WALAAS, O. Effect of insulin on rat diaphragm under anaerobic conditions. J.Biol.Chem., 195: 367, 1952.
154. WANG, C. Insulin-stimulated glucose uptake in rat diaphragm during postnatal development: lack of correlation with the number of insulin receptors and of intracellular glucose transporters. Proc. natn.Acad.Sci.U.S.A., 82: 3621-5, 1985.
155. WARBURG, O. In: UMBREIT, W.M.; BURRIS, R.M.; STAUFFER, J.F. Manometric and biochemical technique. Minneapolis, Burgess, 1972.
156. WARDZALA, L.J. & JEANRENAUD, B. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat diaphragm. J.Biol.Chem., 256(14): 7070-93, 1981.
157. WERLE, E. & RODEN, P. Ueber das vorkommen von kalikrein in der spercheldruesen und in munds perchel. Biochemie, 286: 213, 1936.
158. \_\_\_\_\_; VOGEL, R.; GOLDEL, L.F. Ueber ein blurdurchsteigerndes Prinzip in Extrakten aus der Glandula Submacillaris der Weissen Maus. Arch.exp. Patho.Pharmak., 230: 236, 1957.
159. \_\_\_\_\_; TRAUTSCHOLD, I.; SCHMAL, I. Ueber ein Isoenzym des Renins una ueber die Isolierung eines biologisch aktiven spalproduktes seines. Substrates. Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem., 332: 79, 1963.

160. WINEGRAD, A.I. & RENOLD, A.E. Studies on rat adipose tissue in vitro. J.Biol.Chem., 233(2):267-76, 1958.
161. ZIMMERMAN, L.N. Effect of ligation of the parotid ducts on the carbohydrate tolerance of normal dogs. Archs.intern.Med., 49: 409-20, 1932.

De acordo com:

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

WORLD LIST OF SCIENTIFIC PERIODICALS. 4. ed. London, Butterworths, 1963 3v.

C a p í t u l o VIII

R E S U M O

## 8. RESUMO

O presente trabalho foi realizado com a finalidade de se verificar "In Vitro", os eventuais efeitos da Sialotoxina I (SI), sobre a incorporação de glicose e o consumo de oxigênio pelo diafragma de ratos.

Foram utilizados 102 ratos machos (Rattus, norvergicus, albinus, Wistar), com 2 a 3 meses de idade, pesando entre 150 e 200 gramas.

A parte experimental foi desenvolvida em 2 modelos experimentais: a) determinação do consumo;

b) determinação da incorporação de glicose.

No modelo experimental, determinação do consumo de oxigênio, foram utilizados 60 animais, distribuídos em 3 grupos: Controle, Sialotoxina I e Insulina, ou seja, grupos A, B e C, respectivamente, na seguinte forma:

Grupo A: Controle - Constituído de 12 ratos e redistribuídos em 2 subgrupos, A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>.

Subgrupo A<sub>1</sub>: Controle - Endógeno - 6 ratos;

Subgrupo A<sub>2</sub>: Controle - Endógeno + Glicose - 6 ratos.

Grupo B: Sialotoxina I (SI) - Constituído de 30 ratos, redistribuídos em 5 subgrupos de 6 ratos cada:

Subgrupo B<sub>1</sub>: Endógeno + SI (0,02 mg/ml);

Subgrupo B<sub>2</sub>: Endógeno + Glicose + SI (0,002 mg/ml);

Subgrupo B<sub>3</sub>: Endógeno + Glicose + SI (0,01 mg/ml);

Subgrupo B<sub>4</sub>: Endógeno + Glicose + SI (0,02 mg/ml);

Subgrupo B<sub>5</sub>: Endógeno + Glicose + SI (0,03 mg/ml).

Grupo C: Insulina - Constituído de 18 ratos, redistribuídos em 3 subgrupos, constando de 6 ratos cada:

Subgrupo C<sub>1</sub> : Endógeno + Insulina;

Subgrupo C<sub>2</sub> : Glicose + Insulina;

Subgrupo C<sub>3</sub> : Glicose + Insulina + SI (0,02 mg/ml).

Para a determinação da incorporação de glicose, foram utilizados 42 ratos, distribuídos em 2 grupos: Sialotoxina I e Insulina, grupos D e E, respectivamente.

Grupo D: Sialotoxina I - Constou de 30 ratos, redistribuídos em 5 subgrupos, com 6 animais cada:

Subgrupo D<sub>1</sub> : Glicose;

Subgrupo D<sub>2</sub> : Glicose + SI (0,002 mg/ml);

Subgrupo D<sub>3</sub>: Glicose + SI (0,01 mg/ml);

Subgrupo D<sub>4</sub>: Glicose + SI (0,02 mg/ml);

Subgrupo D<sub>5</sub>: Glicose + SI (0,03 mg/ml).

Grupo E: Insulina - Constou de 12 ratos, re-  
distribuídos em 2 subgrupos, contendo 6 animais cada:

Subgrupo E<sub>1</sub>: Glicose + Insulina;

Subgrupo E<sub>2</sub>: Glicose + Insulina + SI (0,02  
mg/ml).

Os animais pertencentes aos 2 modelos experi-  
mentais, após jejum de 36 horas, foram sacrificados por de-  
capitação e o músculo diafragma foi removido e mantido em tam-  
pão Krebs-Ringer à 4°C. A seguir, os tecidos foram incubados  
em frascos de Warburg, a fim de se determinar "In Vitro", o  
consumo de oxigênio e a incorporação de glicose.

Nas condições experimentais utilizadas, con-  
cluiu-se que o peptídeo produzido pelas glândulas submandibula-  
res de camundongos machos, denominado Sialotoxina I, promove,  
efetivamente, a redução do consumo de oxigênio; diminui a in-  
corporação de glicose pelo diafragma de ratos normais, como  
também induz a uma diminuição do consumo de oxigênio e redução  
na incorporação de glicose, mesmo na presença da insulina.

Capitūlo IX

A P E N D I C E

TABELA VII:- Consumo de Oxigênio.

ENSAIOS BIOLÓGICOS \ TEMPO	15'	30'	45'	60'	75'	90'
ENDÓGENO	a 60.6 ± 6.8	a 152.1 ± 9.4	a 230.3 ± 13.7	a 316.6 ± 5.7	a 390.1 ± 24.0	a 471.3 ± 22.2
ENDÓGENO + GLICOSE	b 85.1 ± 5.2	b 184.3 ± 3.2	b 285.4 ± 17.7	b 373.1 ± 19.3	bg470.4 ± 26.7	bg573.7 ± 24.0
ENDÓGENO + SIALOTOXINA I (0,02 mg/ml)	cj35.8 ± 7.1	ci 68.1 ± 7.0	ch 84.9 ± 6.4	ci113.4 ± 9.4	ci136.3 ± 5.7	ci160.5 ± 10.9
ENDÓGENO + GLICOSE + SIALOTOXINA I(0,002mg/ml)	de44.6 ± 2.5	di 99.7 ± 3.4	d 158.6 ± 4.0	d 208.6 ± 6.5	d 267.0 ± 6.9	d 314.2 ± 4.6
ENDÓGENO + GLICOSE + SIALOTOXINA I (0,01mg/ml)	ec26,7 ± 2.9	c 59.7 ± 4.7	c 83.0 ± 4.9	c 104.0 ± 6.4	c 115.8 ± 4.6	c 136.2 ± 8.1
ENDÓGENO + GLICOSE + SIALOTOXINA I (0,02mg/ml)	fe18.2 ± 1.8	f 32.1 ± 4.3	e 48.4 ± 8.3	e 62.2 ± 8.1	e 80.8 ± 6.4	e 95.1 ± 3.7
ENDÓGENO + GLICOSE + SIALOTOXINA I (0,03mg/ml)	gf14.1 ± 1.1	f 26.3 ± 1.5	e 32.6 ± 2.5	f 37.5 ± 3.1	f 41.7 ± 3.6	f 45.8 ± 2.5
DIFERENÇA MÍNIMA SIGNIFICATIVA	10.5	20.7	22.4	22.4	29.6	27.2

Valores médios, desvios padrões das médias ( $S_x$ ), Diferença Mínima Significativa, de consumo de oxigênio, "In Vitro", (ul/g de tecido), aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos, pelo diafragma de ratos, nos diferentes ensaios biológicos.

Os tratamentos seguidos das mesmas letras não diferem, significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, entre si.

TABELA VIII:- Consumo de Oxigênio.

ENSAIOS BIOLÓGICOS \ TEMPO	15'	30'	45'	60'	75'	90'
ENDÓGENO + INSULINA	130.8 ± 2.4 h	g224.8 ± 6.8	f306.5 ± 14.9	g409.4 ± 19.1	g485.4 ± 21.1	g593.6 ± 3.1
ENDÓGENO + GLICOSE + INSULINA	i157.6 ± 8.7	h264.3 ± 26.5	g352.5 ± 14.0	460.9 ± 9.6 h	544.4 ± 6.5 h	645.1 ± 18.7 h
ENDÓGENO + GLICOSE + INSULINA + SIALOTOXINA I (0,02 mg/ml)	j 30.3 ± 4.9	i 66.3 ± 4.2	105.4 ± 7.9 h	i129.8 ± 4.8	i150.7 ± 7.7	i173.1 ± 4.4
DIFERENÇA MÍNIMA SIGNIFICATIVA	10.5	20.7	22.4	22.4	29.6	27.2

Valores médios, desvios padrões das médias ( $s_x$ ), Diferença Mínima Significativa, do consumo de oxigênio, "In Vitro", (ul/g de tecido), aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos, pelo diafragma de ratos, nos diferentes ensaios biológicos.

Os tratamentos seguidos das mesmas letras não diferem, significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, entre si.

TABELA IX:- Consumo de oxigênio.

ENSAIOS BIOLÓGICOS	TEMPO	1	2	3	4	5	6	MÉDIA/HORA	
								±	s $\bar{x}$
ENDÓGENO		312.0	316.7	313.7	309.7	322.0	326.0	±	316.6 5.6
ENDÓGENO + GLICOSE		377.8	360.5	342.5	371.7	406.0	380.2	±	373.1 19.3
ENDÓGENO + SIALOTOXI- NA I (0,02 mg/ml)		125.1	119.7	114.8	98.2	119.0	103.6	±	113.4 9.4
ENDÓGENO + GLICOSE + SIALOTOXINA I (0,002mg/ml)		198.8	218.0	204.9	205.2	210.0	215.2	±	208.6 6.5
ENDÓGENO + GLICOSE + SIALOTOXINA I (0,01mg/ml)		106.0	90.0	106.8	107.6	104.6	109.2	±	104.0 6.4
ENDÓGENO + GLICOSE + SIALOTOXINA I (0,02mg/ml)		68.1	69.8	50.9	50.7	67.3	66.4	±	62.2 8.1
ENDÓGENO + GLICOSE + SIALOTOXINA I (0,03mg/ml)		41.0	34.0	40.1	32.9	37.1	40.2	±	37.5 3.1

Valores médios, desvios padrões do consumo de oxigênio, (ul/g de tecido/hora), "In Vitro", pelo diafragma de ratos, nos diferentes ensaios biológicos.

TABELA X :- Consumo de Oxigênio.

ENSAIOS BIOLÓGICOS	TEMPO						MÉDIA/HORA ± s $\bar{x}$
	1	2	3	4	5	6	
ENDÓGENO + INSULINA	441.1	383.4	401.9	409.3	395.4	425.8	409.4 ± 19.1.
ENDÓGENO + GLICOSE + INSULINA	462.1	467.0	446.8	468.9	471.8	449.0	460.9 ± 9.6
ENDÓGENO + GLICOSE + INSU- LINA + SIALOTOXINA I (0,02 mg/ml)	134.5	128.0	131.4	128.9	120.8	135.6	129.8 ± 4.8

Valores médios, desvios padrões do consumo de oxigênio, (ul/g de tecido/hora), "In Vitro", pelo diafragma de ratos, nos diferentes ensaios biológicos.

TABELA XI :- Consumo de Oxigênio.

		TRATAMENTO - E N D Ő G E N O					
		15'	30'	45'	60'	75'	90'
RATOS	TEMPO						
	1		54.7	164.1	233.4	312.0	408.5
2		73.0	160.4	232.4	316.7	361.8	471.6
3		61.0	144.9	213.6	313.7	351.9	428.2
4		51.6	136.4	217.5	309.7	398.2	472.0
5		63.5	156.4	256.2	322.0	410.6	495.8
6		59.8	150.8	228.9	326.0	409.9	493.6
MEDIA		60.6 ± 6.8	152.1 ± 9.4	230.3 ± 13.7	316.6 ± 5.6	390.1 ± 24.0	471.3 ± 22.2

Valores individuais, médias e respectivos desvios padrões ( $s_{\bar{x}}$ ), do consumo de oxigênio (microlitro/grama de peso de tecido), em função do tempo de incubação do diafragma de ratos, obtidos nos intervalos de tempo de 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos.

TABELA XII:- Efeito da glicose sobre o consumo de oxigênio.

TRATAMENTO - E N D Ő G E N O + G L I C O S E						
TEMPO	15'	30'	45'	60'	75'	90'
RATOS						
1	92.3	182.0	303.9	377.8	509.0	609.5
2	80.2	186.0	289.7	360.5	447.5	547.4
3	82.5	189.4	266.7	342.5	460.9	580.7
4	78.0	179.2	256.2	371.7	432.2	542.2
5	87.5	185.5	301.0	406.0	497.0	594.5
6	90.1	184.0	295.0	380.2	476.2	568.1
M É D I A	85.1 ± 5.2	184.3 ± 3.2	285.4 ± 17.7	373.1 ± 19.3	470.4 ± 26.7	573.7 ± 24.0

Valores individuais, médias e respectivos desvios padrões ( $s_{\bar{x}}$ ), do consumo de oxigênio (microlitro/grama de peso de tecido), em função do tempo de incubação do diafragma de ratos, obtidos nos intervalos de tempo de 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos.

TABELA XIII:- Efeito da Sialotoxina I (0,02mg/ml) sobre o consumo de oxigênio.

TRATAMENTO - ENDÓGENO + SIALOTOXINA I (0,02 mg/ml)						
TEMPO	15'	30'	45'	60'	75'	90'
RATOS						
1	44.4	75.2	90.0	125.1	143.3	161.1
2	39.4	72.3	89.2	119.7	139.0	159.2
3	43.5	71.2	83.1	114.8	136.7	156.5
4	32.7	69.1	87.3	98.2	126.4	141.0
5	29.8	68.0	88.6	119.0	138.0	175.5
6	25.1	53.2	71.4	103.6	134.6	170.0
MÉDIA	35.8 ± 7.1	68.1 ± 7.0	84.9 ± 6.4	113.4 ± 9.4	136.3 ± 5.1	160.5 ± 10.9

Valores individuais, médias e respectivos desvios padrões ( $s_{\bar{x}}$ ), do consumo de oxigênio (microlitro/grama de peso de tecido), em função do tempo de incubação do diafragma de ratos, obtidos nos intervalos de tempo de 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos.

TABELA XIV:- Efeito da glicose + Sialotoxina I (0,002 mg/ml) sobre o consumo de oxigênio.

TRATAMENTO - ENDÓGENO + GLICOSE + SIALOTOXINA I(0,002mg/ml)						
R A T O S	T E M P O					
	15'	30'	45'	60'	75'	90'
1	41.5	100.9	154.7	198.8	258.3	308.3
2	46.1	100.5	159.5	218.0	276.4	316.8
3	43.0	96.1	162.5	204.9	264.9	310.6
4	46.4	102.6	160.1	205.2	275.6	318.0
5	42.1	94.1	151.9	210.0	260.1	321.3
6	48.6	104.0	163.0	215.2	266.8	310.6
M É D I A	44.6 ± 2.5	99.7 ± 3.4	158.6 ± 4.0	208.6 ± 6.5	267.0 ± 6.9	314.2 ± 4.6

Valores individuais, médias e respectivos desvios padrões ( $s_{\bar{x}}$ ), do consumo de oxigênio (microlitro/grama de pêsso de tecido), em função do tempo de incubação do diafragma de ratos, obtidos nos intervalos de tempo de 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos.

TABELA XV :- Efeito da glicose + Sialotoxina I (0,01 mg/ml) sobre o consumo de oxigênio.

TRATAMENTO - ENDÓGENO + GLICOSE + SIALOTOXINA I (0,01mg/ml)						
TEMPO	15'	30'	45'	60'	75'	90'
RATOS						
1	30.6	63.6	84.8	106.0	120.6	140.2
2	28.8	50.4	72.0	90.0	107.2	126.0
3	27.5	58.5	86.1	106.8	113.7	148.1
4	22.8	65.2	84.1	107.6	120.6	143.5
5	22.8	58.8	85.2	104.6	117.7	130.7
6	28.0	62.0	86.0	109.2	115.7	128.8
MEDIA	26.7 ± 2.9	59.7 ± 4.8	83.0 ± 4.9	104.0 ± 6.4	115.8 ± 4.6	136.2 ± 8.1

Valores individuais, médias e respectivos desvios padrões ( $s_{\bar{x}}$ ), do consumo de oxigênio (microlitro/grama de peso de tecido), em função do tempo de incubação do diafragma de ratos, obtidos nos intervalos de tempo de 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos.

TABELA XVI :- Efeito da glicose + Sialotoxina I (0,02 mg/ml)  
sobre o consumo de oxigênio.

TRATAMENTO - ENDÓGENO + GLICOSE + SIALOTOXINA I (0,02mg/ml)						
TEMPO	15'	30'	45'	60'	75'	90'
RATOS						
1	17.7	32.0	53.3	68.1	88.8	96.0
2	20.7	36.4	52.5	69.8	86.9	99.9
3	15.9	25.7	40.7	50.9	71.1	94.7
4	20.3	27.1	33.9	50.7	74.1	87.9
5	16.3	36.7	52.0	67.3	82.6	98.0
6	18.6	35.0	58.1	66.4	77.8	94.6
MÉDIA	18.2 ± 1.8	32.1 ± 4.3	48.4 ± 8.3	62.2 ± 8.1	80.2 ± 6.4	95.1 ± 3.7

Valores individuais, médias e respectivos desvios padrões ( $s_{\bar{x}}$ ), do consumo de oxigênio (microlitro/grama de peso de tecido), em função do tempo de incubação do diafragma de ratos, obtidos nos intervalos de tempo de 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos.

TABELA XVII- Efeito da glicose + Sialotoxina I (0,03 mg/ml) sobre o consumo de oxigênio.

TRATAMENTO - ENDÓGENO + GLICOSE + SIALOTOXINA I (0,03mg/ml)						
TEMPO	15'	30'	45'	60'	75'	90'
RATOS						
1	14.7	27.0	34.2	41.0	46.2	49.7
2	13.5	24.5	30.0	34.0	37.5	46.3
3	15.0	28.7	36.7	40.1	43.1	46.8
4	14.8	24.4	29.6	32.9	36.2	42.8
5	12.0	26.1	31.1	37.1	39.2	42.2
6	15.1	27.2	34.0	40.2	44.4	47.1
MÉDIA	14.1 ± 1.1	26.3 ± 1.5	32.6 ± 2.5	37.5 ± 3.1	41.1 ± 3.6	45.8 ± 2.5

Valores individuais, médias e respectivos desvios padrões ( $s_{\bar{x}}$ ), do consumo de oxigênio (microlitro/grama de peso de tecido), em função do tempo de incubação do diafragma de ratos, obtidos nos intervalos de tempo de 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos.

TABELA XVIII:-Efeito da insulina sobre o consumo de oxigênio.

TRATAMENTO - E N D Ő G E N O + I N S U L I N A						
T E M P O R A T O S	15'	30'	45'	60'	75'	90'
	1	133.1	235.8	322.2	441.1	521.0
2	127.3	220.5	285.6	383.4	481.3	589.8
3	133.9	231.1	317.7	401.9	451.7	598.4
4	131.1	226.5	321.8	409.3	472.8	594.4
5	131.6	217.1	289.5	395.4	494.8	596.0
6	128.0	218.3	302.4	425.8	489.1	589.8
M É D I A	130.8 ± 2.4	224.8 ± 6.8	306.5 ± 14.9	409.4 ± 19.1	485.1 ± 21.1	593.6 ± 3.1

Valores individuais, médias e respectivos desvios padrões ( $s_{\bar{x}}$ ), do consumo de oxigênio (microlitro/grama de pêsso de tecido), em função do tempo de incubação do diafragma de ratos, obtidos nos intervalos de tempo de 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos.

TABELA XIX.- Efeito da glicose + insulina sobre o consumo de oxigênio.

TRATAMENTO - ENDÓGENO + GLICOSE + INSULINA						
TEMPO						
RATOS	15'	30'	45'	60'	75'	90'
1	174.6	294.7	356.6	462.1	545.9	644.9
2	163.1	287.4	372.8	467.0	546.1	627.6
3	153.9	288.7	364.4	446.8	548.4	647.8
4	153.4	248.2	350.5	468.9	530.7	636.7
5	150.6	229.7	331.4	471.8	544.6	683.7
6	149.8	237.6	339.8	449.0	551.2	630.1
MÉDIA	157.6 ± 8.7	264.3 ± 26.5	352.5 ± 14.0	460.9 ± 9.6	544.4 ± 6.5	645.1 ± 18.7

Valores individuais, médias e respectivos desvios padrões ( $s_{\bar{x}}$ ), do consumo de oxigênio (microlitro/grama de peso de tecido), em função do tempo de incubação do diafragma de ratos, obtidos nos intervalos de tempo de 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos.

TABELA XX :- Efeito da glicose + insulina + Sialotoxina I  
(0,02 mg/ml) sobre o consumo de oxigênio.

TRATAMENTO - ENDÓGENO + GLICOSE + INSULINA + SIALOTOXINA I (0,02mg/ml)						
TEMPO	15'	30'	45'	60'	75'	90'
RATOS						
1	38.0	67.4	114.0	134.5	161.1	176.5
2	24.0	60.0	94.0	128.0	142.0	166.8
3	34.8	73.4	104.4	131.4	150.8	170.1
4	25.2	64.8	108.1	128.9	151.3	180.1
5	30.4	63.4	96.9	120.8	140.4	170.5
6	29.5	69.1	115.0	135.6	159.1	174.8
MÉDIA	30.3 ± 4.9	66.2 ± 4.2	105.4 ± 7.9	129.8 ± 4.8	150.7 ± 7.7	173.1 ± 4.4

Valores individuais, médias e respectivos desvios padrões ( $s_x$ ), do consumo de oxigênio (microlitro/grama de pêso de tecido), em função do tempo de incubação do diafragma de ratos, obtidos nos intervalos de tempo de 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos.

TABELA XXI:- Efeitos da Sialotoxina I sobre a Incorporação da Glicose.

ENSAIOS RATOS	GLICOSE	GLICOSE + SI ALOTOXINA I (0,002mg/ml)	GLICOSE + SI ALOTOXINA I (0,01mg/ml)	GLICOSE + SI ALOTOXINA I (0,02mg/ml)	GLICOSE + SI ALOTOXINA I (0,03mg/ml)
1	1.62	1.28	1.13	0.82	0.60
2	1.72	1.29	1.08	0.83	0.59
3	1.68	1.42	1.08	1.01	0.44
4	1.72	1.36	1.12	0.95	0.45
5	1.65	1.41	1.12	0.86	0.59
6	1.63	1.30	1.10	0.91	0.48
MÉDIAS $\pm (s_{\bar{x}})$	1.67 $\pm 0.04$	1.34 $\pm 0.05$	1.10 $\pm 0.01$	0.89 $\pm 0.06$	0.52 $\pm 0.06$

Valores individuais e médios, seus respectivos desvios padrões, da Incorporação da Glicose "In Vitro" (micrograma/mg/tecido/hora) pelo diafragma de ratos.

TABELA XXII:- Efeitos da Insulina e da associação da Insulina + Sialotoxina I sobre a Incorporação da Glicose.

ENSAIOS RATOS	GLICOSE	GLICOSE + INSULINA	GLICOSE + INSULINA + SIALOTOXINA I (0,02mg/ml)
1	1.62	2.21	1.48
2	1.72	2.53	1.44
3	1.68	2.34	1.10
4	1.72	2.48	1.10
5	1.65	2.55	1.30
6	1.63	2.43	1.26
MÉDIAS $\pm (s_{\bar{x}})$	1.67 $\pm 0.04$	2.42 $\pm 0.11$	1.28 $\pm 0.14$

Valores individuais e médios, e seus respectivos desvios padrões, da Incorporação da Glicose "In Vitro" (micrograma/mg/te-cido/hora) pelo diafragma de ratos.