

MARIA INEZ FERNANDES POLETO

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA
PROTEÍNA TÓXICA ISOLADA DAS GLÂNDULAS
SUBMANDIBULARES DE CAMUNDONGOS MACHOS**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Cam-
pinas, para obtenção do grau de
Mestre em Ciências - Área de
Fisiologia e Biofísica do Sistema
Estomatognático

**PIRACICABA - SP
1997**

P758p
32753/BC

MARIA INEZ FERNANDES POLETTO

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA
PROTEÍNA TÓXICA ISOLADA DAS GLÂNDULAS
SUBMANDIBULARES DE CAMUNDONGOS MACHOS**

**PIRACICABA - SP
1997**

Ficha Catalográfica Elaborada pela Biblioteca da FOP/UNICAMP

P758p

Poletto, Maria Inez Fernandes.

Purificação e caracterização de uma proteína tóxica isolada das glândulas submandibulares de camundongos machos / Maria Inez Fernandes Poletto. - Piracicaba : [s.n.], 1997.

82f. : il.

Orientador : Carlos Eduardo Pinheiro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Glândulas salivares. 2. Separação de proteínas. 3. Testes de Toxicidade. I. Pinheiro, Carlos Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

19.CDD - 574.1925

- 612.313

Índices para o Catálogo Sistemático

1. Enzimas
2. Glândulas salivares

574.1925

612.313

MARIA INEZ FERNANDES POLETO

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA
PROTEÍNA TÓXICA ISOLADA DAS GLÂNDULAS
SUBMANDIBULARES DE CAMUNDONGOS MACHOS

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Cam-
pinas, para obtenção do grau de
Mestre em Ciências - Área de
Fisiologia e Biofísica do Sistema
Estomatognático

ESTE EXEMPLAR FOI
DEVIDAMENTE CORRIDO
CONFORME RESOLUÇÃO
CCPG/036/88
Piracicaba,

Antônio

PIRACICABA - SP
1997

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de **Mestrado**, em sessão pública realizada em 09/12/97, considerou o candidato aprovado.

1. Carlos Eduardo Pinheiro

2. Alcides Guimarães

3. Maria Cecília Ferraz Arruda Veiga

A meus pais, que me ensinaram que o caminho a percorrer em busca de um objetivo pode ser difícil, mas é compensador.

Ao Thadeu, meu marido, a quem dedico este trabalho, pelas dificuldades partilhadas e pelo estímulo maior em todos os momentos da minha vida profissional.

Às minhas filhas, Priscila e Marina, que souberam entender minhas muitas idas e vindas para a finalização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Carlos Eduardo PINHEIRO, que me guiou pelos caminhos da Pesquisa, ensinando-me critérios, metodologia e observação, por sua paciência, seu carinho e competência na orientação deste trabalho, o meu mais sincero obrigado.

*À Professora Doutora Maria
Cecília Ferraz de Arruda Veiga,
Coordenadora do Curso de Pós-
Graduação de Fisiologia e
Biofísica do Sistema Estomatog-
nático, pela sua atenção e
estímulos constantes, e pela
oportunidade única de realizar
este curso.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor José Martins Filho, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas.

Ao Professor Doutor José Ranali, Digníssimo Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Ao Professor Doutor Mário Fernando de Góes, Coordenador Geral dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Ao Professor Doutor Alcides Guimarães, Professor Titular da Área de Fisiologia e Biofísica, pelo apoio e incentivo demonstrados durante todos estes anos.

Aos professores do Departamento de Ciências Fisiológicas, Professores Doutores Decio Teixeira, Alcides Guimarães, Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga e João Leonel José pelo convívio amigo. A dedicação de todos foi imprescindível em minha formação científica.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação, responsáveis pela minha formação profissional.

À Professora Doutora Maria Fidela de Lima Navarro, pelo estímulo constante e encorajador, pela amizade e apoio recebido para a realização deste curso.

Ao Professor Doutor Eulazio Mikio Taga, pelas sugestões e colaborações recebidas para a execução da parte experimental do nosso trabalho.

Ao Professor Doutor Dagoberto Sottovia Filho, pela valiosa colaboração, através dos conhecimentos transmitidos, úteis ao desenvolvimento de nosso trabalho.

A todos os técnicos do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, pela grande colaboração na parte experimental deste trabalho.

À Sra. Mires Cristina Rocha, pela forma carinhosa e amiga, ajuda inestimável e disponibilidade, demonstradas ao longo de todos estes anos.

À Sra. Shirley Rosana Sbravathi Moreto, pela atenção a mim dispensada.

À Sra. Suely Duarte de Oliveira Idiani, pelo auxílio na revisão bibliográfica.

Aos colegas de Curso, pela convivência amiga que tivemos.

A todos que, direta ou indiretamente, possibilitaram a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	Páginas
Lista de Tabelas.....	1
Lista de Figuras e Fotos	2
Resumo	4
1. Introdução	6
2. Revisão da literatura	10
2.1. <i>Substâncias biologicamente ativas.....</i>	11
2.2. <i>Substâncias tóxicas.....</i>	17
3. Material e Métodos	27
3.1. <i>Obtenção do Extrato Glandular</i>	28
3.2. <i>Cromatografia em DEAE-Celulose</i>	29
3.3. <i>Ensaio da Atividade Tóxica.....</i>	30
3.4. <i>Medida da Concentração de Proteína</i>	31
3.5. <i>Ensaio da Atividade Enzimática</i>	32
3.6. <i>Cromatografia em DEAE Sephadex da Fração II.....</i>	34
3.6.1. <i>Preparação da coluna de DEAE Sephadex A-50.....</i>	34
3.6.2. <i>Cromatografia da Fração II em DEAE Sephadex A-50</i>	34
3.6.3. <i>Concentração da Fração Protéica Obtida da</i>	
<i>Cromatografia em DEAE Sephadex A-50</i>	35
3.7. <i>Filtração Molecular em Sephadex G-100</i>	36
3.7.1. <i>Preparação da Coluna de Sephadex G-100.....</i>	36
3.7.2. <i>Cromatografia F₂P₁ em Sephadex G-100.....</i>	36

3.8.	<i>Eletroforese Analítica em Gel de Poliacrilamida</i>	37
3.9.	<i>Determinação do Peso Molecular</i>	38
3.10	<i>Avaliação Histológica</i>	40
4.	Resultados	41
4.1.	<i>Cromatografia em DEAE Celulose</i>	43
4.2.	<i>Ensaio da Atividade Tóxica</i>	44
4.3.	<i>Cromatografia em DEAE Sephadex</i>	47
4.4.	<i>Filtração Molecular em Sephadex G-100</i>	49
4.5.	<i>Eletroforese Analítica em Gel de Poliacrilamida</i>	50
4.6.	<i>Determinação do Peso Molecular</i>	51
4.7.	<i>Ensaio da Atividade Enzimática</i>	52
4.8	<i>Avaliação Histológica</i>	53
5.	Discussão	57
6.	Conclusões	67
-	Summary	69
-	Referências Bibliográficas	72

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1 - Etapas de purificação de uma proteína tóxica isolada das glândulas submandibulares de camundongos machos.	42
Tabela 2 - Medidas do volume urinário de ratos mantidos em gaiolas metabólicas por 24 horas.	47
Tabela 3 - Valores da atividade esterásica obtidos nas diferentes etapas de purificação.	52
Tabela 4 - Valores da atividade proteolítica obtidos nas diferentes etapas de purificação.	53
Tabela 5 - Peso dos animais e dos respectivos pâncreas que receberam injeção sucutânea de 0.5 ml de água destilada (grupo controle).	53
Tabela 6 - Peso dos animais e dos respectivos pâncreas que receberam injeção subcutânea de 0.5 ml da fração purificada (F ₂ P ₂ -1).	54

LISTA DE FIGURAS E FOTOS

	Página
Figura 1 - Cromatografia do extrato glandular em coluna de DEAE Celulose, equilibrada com Tampão Tris HCl 0,05 M pH 7,6 e eluída com NaCl.	43
Figura 2 - Cromatografia da Fração II em coluna de DEAE Sephadex, equilibrada com Tris HCl 0,05 M pH 7,6 e eluída com Tampão Fosfato.	48
Figura 3 - Filtração molecular do pico 1 (F_2P_1) em coluna de Sephadex G-100.	49
Figura 4 - Determinação do Peso Molecular realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando-se como padrão Albumina, Ribonuclease e Anidrase Carbônica.	51
Foto 1 - Pulmão hemorrágico de rato tratado com proteína tóxica (F_2P_1 -1)	45
Foto 2 - Fígado hemorrágico de rato tratado com proteína tóxica (F_2P_1 -1)	45
Foto 3 - Pâncreas com inflamação e degeneração aguda de rato tratado com proteína tóxica (F_2P_1 -1)	46
Foto 4 - Estômago engurgitado, repleto de suco gástrico de baixa acidez, de rato tratado com proteína tóxica (F_2P_1 -1)	46
Foto 5 - Eletroforese analítica das frações obtidas nas várias etapas de purificação.	50

	Páginas
Foto 6 - Corte histológico do pâncreas de rato do grupo controle. Aumento 100x . HE	55
Foto 7 - Corte histológico do pâncreas de rato com pancreatite. Aumento 100x . HE	55
Foto 8 - Corte histológico do pâncreas de rato com pancreatite. Aumento 100x . HE	56

RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de isolar e caracterizar quimicamente uma proteína tóxica das glândulas submandibulares de camundongos machos, e observar histológica e macroscopicamente seu efeito biológico.

Foram utilizadas 34 g de glândulas submandibulares de camundongos machos, de 3 meses de idade, para a obtenção do extrato glandular cru. Este extrato foi aplicado a uma coluna de DEAE Celulose equilibrada com tampão Tris HCl 0,05 M pH 7,6. A coluna foi lavada com 800 ml do mesmo tampão. O eluente obtido constitui a Fração I. Após a lavagem a coluna foi eluída seqüencialmente, com tampão Tris - NaCl 0,1 M (Fração II) e tampão Tris - NaCl 0,3 M (Fração III). As frações protéicas foram concentradas por ultrafiltração e avaliada sua atividade tóxica e enzimática (Hidrólise do éster sintético BAPNA). A fração mais ativa (II), foi dialisada contra tampão Tris - HCl pH 7,6 e aplicada a uma coluna de DEAE-Sephadex equilibrada com o mesmo tampão. As proteínas da coluna foram eluídas seqüencialmente por diferença de pH com os tampões Fosfato 0,1 M pH 7,0; 6,0 e 5,0. A fração mais ativa foi a obtida com tampão Fosfato 0,1 M pH 7,0 (F_2P_1). Esta fração foi aplicada a uma coluna de Sephadex G-100 e as

frações protéicas foram eluídas com o Tampão Tris HCl 0,05 M pH 7,0. A fração mais ativa, determinada pelos ensaios de toxicidade foi a F₂P₁ -1.

Eletroforese em gel de poliacrilamida desta fração apresentou uma banda de proteína e a determinação do peso molecular foi realizada utilizando-se da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% contendo SDS. Os resultados obtidos da cromatografia em DEAE Celulose apresentaram três picos de proteínas, eluídas seqüencialmente por força iônica com soluções de NaCl; a eluição da Fração II da coluna de DEAE Sephadex por diferença de pH apresentou dois picos de proteínas. A fração ativa corresponde ao Pico I, eluído com Tampão Fosfato 0,1 M pH 7,0. Todas as frações apresentaram atividade esterásica, utilizando o BAPNA como substrato. As alterações dos órgãos dos ratos injetados com a fração ativa, mostrou pulmão hemorrágico, pâncreas com inflamação aguda e degeneração, fígado hemorrágico e estômago engurgitado, repleto de suco gástrico de baixa acidez.

A caracterização química e a atividade biológica desta proteína nos leva a concluir que ela é uma esterase com características tóxicas especiais que diferem das outras esterases tóxicas isoladas das glândulas submandibulares de camundongos, o que vem certificar que as glândulas submandibulares de camundongos machos são ricas em proteínas tóxicas e que a maioria delas apresenta atividade esteroproteolítica.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Várias substâncias com atividade biológica foram isoladas das glândulas submandibulares de camundongos machos e caracterizadas quimicamente. Verificou-se também durante estes estudos que o extrato glandular é altamente tóxico quando injetado em camundongos e ratos recém-nascidos (COHEN, 1960; ATTARDI et al, 1965; HATAKEYAMA et al, 1981).

Foram também isoladas frações não proteicas, as sialotoxinas, que apresentaram efeito letal em camundongos, quando injetadas intraperitonealmente. PINHEIRO (1985).

Existe uma grande variação nas características químicas assim como nas respostas aos ensaios biológicos efetuados com estas frações tóxicas isoladas, variando do efeito tóxico letal a uma toxicidade específica sobre um determinado órgão.

A primeira substância a ser isolada das glândulas submandibulares e caracterizada quimicamente, foi o fator de crescimento nervoso, um peptídeo que promove especificamente o crescimento das células nervosas simpáticas. COHEN (1960).

Outro fator, o qual acelera a erupção dos dentes incisivos e a abertura das pálpebras de rato, foi também isolado por COHEN (1962). Este autor observou que a injeção de um extrato glandular a 5%, na dose de 0,3 mg de proteína, era letal para o rato recém-nascido. Doses menores causam uma inibição acentuada do crescimento corporal e um retardo no crescimento dos pêlos.

A caracterização química e a purificação destes fatores tóxicos, levou ao isolamento e à caracterização de um grande número de proteínas, com atividades esterásicas e proteolíticas.

Uma proteína que estimula os tecidos embrionários musculares e o crescimento de células mesenquimais foi descrita por ATTARDI et al (1965 e 1967).

Por outro lado, extratos de glândulas submandibulares de camundongos machos mostraram uma alta toxicidade quando injetados em camundongos. LIUZZI, ANGELETTI (1968).

Estes resultados foram confirmados por vários outros trabalhos como o de HATAKEYAMA et al (1981), que purificaram 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.

Assim, HOSHINO, LIN (1968, 1970 e 1972) isolaram um fator tóxico de glândulas submandibulares de camundongos machos, andrógeno dependente, sugerindo que a produção deste fator ocorre a nível dos túbulos secretórios destas mesmas glândulas; em seu trabalho posterior, demonstraram que este fator é abolido pela ligação dos dutos excretórios das glândulas submandibulares. Estudos subseqüentes foram realizados por AGOSTINHO (1987), BOAVENTURA (1988) e ARRUDA VEIGA, PINHEIRO (1988), demonstrando a presença de fatores tóxicos e letais, especialmente em glândulas submandibulares de camundongos machos

As glândulas submandibulares de camundongos machos tem despertado grande interesse para a pesquisa pois são uma fonte de fatores biológicos com atividade tóxica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. SUBSTÂNCIAS BIOLOGICAMENTE ATIVAS

As pesquisas relacionadas com as glândulas salivares são inúmeras e vem sendo desenvolvidas ao longo dos anos, demonstrando a importância das glândulas salivares quanto às suas propriedades exócrinas e endócrinas que tem sido demonstradas na literatura por um grande número de fatores que atuam de maneiras diferentes.

JUNQUEIRA et al (1949), pela análise histoquímica dos grânulos secretórios dos ductos granulosos de glândulas salivares de camundongos, demonstraram que o nível de atividade da fosfatase ácida era mais intenso nos camundongos machos do que nas fêmeas.

Um dos primeiros fatores biologicamente ativos descritos na literatura, produzido pelas glândulas submandibulares de camundongos machos, foi o Fator de Crescimento Nervoso (NGF); anteriormente este fator tinha sido isolado e purificado do veneno de cobra por COHEN, LEVI-MONTALCINI (1956).

SREEBNY (1960) descreveu a produção de proteases andrógeno dependentes em glândulas submandibulares de camundongos.

COHEN (1960) purificou o fator de crescimento nervoso das glândulas submandibulares de camundongos machos, demonstrando sua importância no desenvolvimento e na manutenção das funções normais do sistema nervoso simpático e de alguns neurônios sensitivos.

Posteriormente, COHEN (1962), isolou e purificou da mesma glândula outro fator protéico com atividade promotora de crescimento para as células epidermais, o Fator de Crescimento Epidermal, onde diferentes efeitos biológicos foram observados. Este fator biologicamente ativo, acelerava a abertura das pálpebras e a erupção dos incisivos em camundongos neonatos. O ensaio biológico foi conduzido através de injeções subcutâneas em camundongos neonatos que receberam um número de microgramas de material constante por 1.5 g de peso; estes animais foram examinados e pesados a intervalos de 24 horas sendo registrados os dias em que ocorreram a abertura dos olhos e a erupção dos incisivos.

A presença da atividade amilásica em glândulas submandibulares de camundongos foi descrita por SWIGART et al (1965), que verificaram ser esta atividade maior em camundongos machos.

ATTARDI et al (1965), isolaram e purificaram do extrato de glândulas submandibulares de camundongos, uma fração macromolecular, que notadamente, estimulava o crescimento do tecido de origem mesenquimal. Esta mesma fração causava diferenciação dos tecidos de origem mesodermal tais como músculos e cartilagens. Os efeitos biológicos observados sobre o crescimento celular mesenquimal, pode ser devido à atividade proteolítica que pareceu estar sempre associada com a fração biologicamente ativa em todas as fases de purificação.

Trabalhando ainda com glândulas submandibulares de camundongos, ATTARDI et al (1967) isolaram uma fração, que estimulava "in vitro" os tecidos embrionários musculares e que possuía atividades esterásica e peptídica. A adição desta fração purificada a uma cultura de tecidos em meios sintéticos causava dissociação das fibras musculares em mioblastos individuais com perda de miosina, sugerindo que este efeito era o resultado de sua atividade enzimática.

COHEN et al (1972) obtiveram das glândulas submandibulares de camundongos machos, duas enzimas na forma pura e estável, semelhantes à renina. Estas duas enzimas, as quais ele chamou renina A e C, e que diferiam um pouco em sua composição básica, apresentaram grande atividade hipertensiva em ratos.

Foi demonstrado também os efeitos dos extratos salinizados de glândulas submandibulares e sublinguais de camundongos machos sobre a histologia do baço, timo, linfonodos e as próprias glândulas, com respostas biológicas que variaram do aumento de peso do timo e do baço, sem variação na histologia dos mesmos, até uma resposta imune com um aumento de linfoblastos no timo.

BARKA (1973) purificou, parcialmente, uma proteína de glândulas salivares de camundongos machos e fêmeas, com atividade supressora da mitose celular, seguindo o padrão de purificação glandular.

Vários outros fatores (enzimas) foram isolados de glândulas submandibulares de camundongos e ratos: quatro a seis isoenzimas semelhantes à tripsina (EKFORS et al, 1967, EKFORS, HAPSU-HAVU, 1972) e duas proteases, A e D (SCHENKEIN et al, 1969, 1974). Estas enzimas apresentaram atividade esterásica e proteolítica, e não pareciam ser andrógeno-dependentes.

TUCH MATTHIESEN (1976) utilizando-se de homogenados de glândulas salivares de camundongos machos, administrados intraperitonealmente em camundongos neonatos, verificaram que este homogenado causava sintomas como desenvolvimento corporal retardado, erupção precoce dos dentes e abertura precoce dos olhos, similares àqueles provocados pelo acetato de cortisol. Também o peso absoluto e relativo do

timo foi drasticamente reduzido. Os autores concluíram que o homogenado das glândulas submandibulares de camundongos machos, contém substâncias semelhantes ao cortisol.

Nos estudos de GRESIK, BARKA (1977-1978), o Fator de Crescimento Epidermal pode ser identificado em torno do 20º dia após o nascimento.

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

Também ARRUDA VEIGA (1979) isolou e caracterizou um peptídeo do extrato de glândulas submandibulares de camundongos machos adultos. Pela análise dos resultados, a autora concluiu que o peptídeo extraído tinha um peso molecular em torno de 2.800 e que o mesmo era composto por 2 componentes: um básico e outro ácido. Quando injetado subcutaneamente na dose de 1,5 mg/kg em ratos, provocava poliúria e albuminúria.

BARKA (1980), analisou em uma revisão, a ocorrência, propriedades químicas, localização, controle hormonal, síntese, secreção e

possível papel fisiológico de 25 fatores, biologicamente ativos, extraídos de glândulas submandibulares de camundongos. Em geral, estes fatores são andrógeno-dependentes, e se localizam nos túbulos granulares convolutos das glândulas. São secretados para a saliva, mas também podem ser encontrados na circulação.

O Fator de Crescimento Epidermal (EGF) também foi detectado em outros tecidos, como os rins. Desta forma, KHASHIMATA et al (1987), verificaram que o fator de crescimento epidermal sintetizado pelos rins de camundongos era estrutural e funcionalmente idêntico ao peptídeo encontrado na glândula submandibular, embora em menor concentração.

ARRUDA VEIGA et al (1989), observaram que as frações II e III do Parotin, hormônio da glândula parótida, um produto comercialmente impuro que apresenta quatro bandas protéicas quando separado pela eletroforese em gel de poliacrilamida, mostraram-se mais efetivas em aumentar o consumo de oxigênio pelo tecido adiposo de ratos diabéticos, apresentando um efeito comparável ao da insulina. Da mesma forma, estas frações mostraram maior atividade, aumentando significativamente a captação da glicose.

Também têm despertado grande interesse, no estudo das glândulas salivares, a presença de fatores biológicos com atividade tóxica,

sendo estes ensaios conduzidos através de injeções subcutâneas de homogenados de glândulas submandibulares de camundongos machos adultos.

2.2. SUBSTÂNCIAS TÓXICAS

Várias substâncias com atividade biológica foram isoladas das glândulas submandibulares de camundongos machos e caracterizadas quimicamente. Verificou-se também, durante estes estudos que o extrato glandular é altamente tóxico quando injetado em camundongos e ratos recém-nascidos.

COHEN (1962) observou que injeção de extrato de glândula submandibular de camundongos machos a 5%, na dose de 0,3 mg de proteína, era letal para o rato recém-nascido. Doses menores causaram uma inibição acentuada do crescimento e um retardo no crescimento dos pêlos.

ANGELETTI et al (1965), comprovaram o que vinha sendo descrito em outras publicações anteriores: a injeção intraperitoneal de extratos glandulares de camundongos machos são altamente tóxicos quando injetados em camundongos adultos. Os camundongos que receberam injeção de homogenados crus, morreram dentro de 5 a 9 horas com doses tão baixas quanto de 0,05 mg de proteína por g de peso corporal. Eles sugeriram que a

toxicidade poderia ser devido a vários componentes do extrato, mesmo com baixas concentrações protéicas.

Resultados semelhantes foram observados após etapas subseqüentes de purificação do extrato, em cromatografia de coluna com Sephadex G-100; o conteúdo de proteína foi determinado em várias frações e pelo menos 3 picos foram obtidos, sendo que, a maior atividade biológica foi detectada no 3º pico, que, injetado intraperitonealmente, na concentração protéica de 15 microgramas por g de peso, levou o número de leucócitos a um aumento de 100% em 3 horas.

Posteriormente, LIUZZI, ANGELETTI (1968) observaram que o fator tóxico presente no extrato da glândula submandibular, mesmo após alguns processos de purificação, como a diálise, não têm o seu nível de toxicidade alterado, sugerindo que este fator deve estar associado a uma macromolécula, provavelmente de natureza protéica, visto que não dializa e é destruído pelo calor.

Submetendo-se o extrato cru das glândulas submandibulares a uma seqüência de purificação em uma coluna de Sephadex G-100, os autores verificaram que existem vários componentes tóxicos responsáveis por um efeito tóxico generalizado quando injetados em camundongos que podem ser separados e caracterizados individualmente. Uma das frações isoladas considerada como mais tóxica, era letal em doses de 0.06 mg/g, mas sua

toxicidade era restrita a um órgão alvo, quando injetado em doses mais baixas (0.04 mg/g), principalmente o timo, que sofreu uma atrofia acentuada.

HOSHINO, LIN (1968 e 1969), demonstraram a existência de um fator letal em glândulas submandibulares de camundongos machos e que este fator tóxico era liberado ao se transplantar estas glândulas para um hospedeiro. Os autores concluíram que este fator deveria estar diretamente relacionado à maturação sexual do camundongo macho e provavelmente também à ação da testosterona uma vez quando transplantaram glândulas de camundongos machos imaturos ou fêmeas este fator não se manifestou.

Também LIN, HOSHINO (1969), demonstraram que os transplantes de glândulas submandibulares de camundongos machos imaturos e de fêmeas adultas, previamente tratados com testosterona, exerciam efeito letal tanto em camundongos machos quanto em camundongos fêmeas.

Em concordância com este trabalho, LIN, HOSHINO (1970) encontraram diferenças no índice de mortalidade entre camundongos machos e fêmeas que receberam o transplante. O camundongo macho apresentou-se mais resistente. Observaram ainda que o hospedeiro macho sialoadenectomizado apresentava maior taxa de mortalidade quando comparado com o não operado e que a testosterona protegia as fêmeas contra o efeito letal, independentemente se os animais eram ou não sialoadenectomizados. Estes

dados sugeriram que a presença da testosterona tinha função protetora para o camundongo macho.

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, sendo estas últimas os doadores.

Os dados obtidos demonstraram que a testosterona e o isoproterenol podem exercer efeitos estimulatórios específicos sobre os diferentes componentes de tecidos submandibulares, sendo a ação da testosterona sobre a regeneração dos túbulos secretórios e a do isoproterenol sobre as células acinares.

LIN, HOSHINO (1972) relataram a existência de um fator hemorrágico evidenciado em transplantes subcutâneos de glândulas submandibulares de camundongos machos, que provocava hematoma local e severa hemorragia sistêmica.

HUANG, HOSHINO, LIN (1972) estudaram o efeito da ligadura prévia do duto excretor das glândulas submandibulares na produção do fator letal, onde ficou demonstrado que esta ligação prévia reduzia a produção do fator letal; ficou demonstrado também que este fator é andrógeno dependente. Ensaio com animais transplantados, demonstraram que o

fator letal estava presente até 3 dias após a ligação do duto excretor, embora permanecesse em pequenas quantidades até 6 semanas após a ligação. A utilização de uma injeção de enantato de testosterona, após a ligação dos dutos e transplante das glândulas, intensificou o efeito do fator letal e que, no grupo que recebeu solução de isoproterenol após o transplante, foi detectada uma menor quantidade de fator letal embora o peso das glândulas operadas fosse maior, provavelmente, devido a hipertrofia das células acinares, pelo uso de isoproterenol.

DE LANGE (1975) realizando a ligação do duto excretor das glândulas submandibulares de camundongos machos, observou, em um período de 7 dias, atrofia das mesmas. Os efeitos do extrato cru das glândulas submandibulares e sublinguais de camundongos sobre a histologia do baço, timo e linfonodos de animais que receberam estes extratos durante 7 dias, foram estudados. Os autores observaram infiltração de células mononucleares e aumento do número de linfoblastos no córtex do timo. Ao mesmo tempo houve uma redução na porção tubular das glândulas submandibulares e um decréscimo no volume das glândulas submandibulares e sublinguais.

HIRAMATSU, HATAKEYAMA, MINAMI (1980), em um experimento com vários grupos de camundongos, observaram o aparecimento do fator letal também na saliva de camundongos machos e sua liberação ocorre quando da indução por estimulação de agentes alfa-adrenérgicos e, que tanto o extrato glandular, preparado de glândulas submandibulares retiradas

de camundongos, como a saliva, foram altamente tóxicos para cobaias, ratos e hamster, e de baixa toxicidade para camundongos. No grupo de animais cujas glândulas submandibulares foram retiradas, a saliva induzida por fenilefrina não apresentou toxicidade, indicando que a origem dos componentes tóxicos está na glândula submandibular, e que são secretados para a saliva. Os dados obtidos revelaram que a toxicidade da saliva pode ser devida a uma enzima similar à Calicreína.

Na tentativa de purificação destes componentes tóxicos, os autores utilizaram de focalização isoeletrica, obtendo-se 8 picos de proteínas, cuja maior atividade tóxica foi detectada no pico IV, pela medida da atividade de calicreína. Esta proteína tóxica foi então purificada por cromatografia em DEAE-sephadex A-50; na eletroforese em gel de poliacrilamida, apareceu uma simples banda de proteína, cujo peso molecular foi estimado em cerca de 31.000 daltons. Os resultados indicaram que o fator letal das glândulas submandibulares de camundongos machos é uma proteína exócrina com atividade semelhante à calicreína..

HIRAMATSU, HATAKEYAMA, MINAMI (1981) confirmaram os dados obtidos no trabalho anterior, onde concluíram que estes componentes tóxicos se localizam nos grânulos serosos dos túbulos secretórios e que são secretados na saliva da mesma forma que os fatores de crescimento nervoso (NGF), o fator de crescimento epidermal (EGF) e as enzimas proteolíticas,

como a esteroprotease, cujas secreções são reguladas pelos receptores alfa-adrenérgicos.

DEAN, HIRAMOTO (1985), observaram que ratos lactentes, quando receberam injeções subcutâneas de homogenado de glândulas submandibulares de ratos machos, morreram em 24 horas; o mesmo não aconteceu com ratos desmamados ou adultos, que receberam doses proporcionalmente maiores, demonstrando não ser um efeito da dosagem. Ratos lactentes que receberam a injeção do homogenado de glândulas, apresentaram um aumento de 120% de atividade tripsínica, enquanto os ratos adultos, que receberam doses proporcionalmente similares, apresentaram um aumento de apenas 46%. Estes dados sugeriram que os ratos recém-nascidos absorveram enzimas semelhantes à tripsina na corrente sangüínea e como não foram capazes de inativá-las, sofreram crise hipotensiva que os levou à morte.

COX et al (1986), trabalhando com glândulas submandibulares de ratos, isolaram uma proteína ativadora de plaquetas, com atividade biológica comparável ao colágeno, capaz, "in vitro", de ativar plaquetas de ratos, coelhos e seres humanos, causando agregados e secreção de serotonina.

AGOSTINHO (1987), determinou a DL 50 da sialotoxina I, em camundongos machos e fêmeas, concluindo que o peptídeo promove

efetivamente a morte dos camundongos, sendo as fêmeas muito mais sensíveis que os machos. A administração do estradiol nos camundongos machos, assim como sua castração, aumentou a sensibilidade dos mesmos em relação à sialotoxina. A testosterona protegeu parcialmente as fêmeas, diminuindo sua sensibilidade. As fêmeas ovariectomizadas apresentaram DL50 e manifestações biológicas semelhantes às das fêmeas normais. Os resultados sugeriram que os efeitos tóxicos da sialotoxina sejam, possivelmente, andrógeno-dependentes.

ARRUDA VEIGA, PINHEIRO (1988) purificaram e caracterizaram um peptídeo obtido de um homogenado de glândulas submandibulares com efeitos tóxicos sobre os rins, produzindo os seguintes sintomas: poliúria, albuminúria, ectasia tubular, vacuolização das células dos túbulos proximal e glomerular e aumento da permeabilidade capilar.

BOAVENTURA (1988), estudando os efeitos da sialotoxina I sobre a incorporação de glicose e o consumo de oxigênio pelo diafragma de ratos, observou que esta promove uma redução do consumo de oxigênio, diminuição da incorporação de glicose, mesmo na presença de insulina.

PINHEIRO (1988) isolou das glândulas submandibulares de camundongos machos, quatro substâncias de baixo peso molecular, de natureza não protéica, denominadas Sialotoxinas I, II, III e IV, todas com atividade letal, quando administradas em camundongos.

EL-THAHER et al (1990) utilizando-se de um procedimento rápido e simples envolvendo cromatografia por interação hidrofóbica, isolaram a calicreína das glândulas submandibulares de ratos com um rendimento igual a 87%. O método de purificação utilizado foi superior tanto à cromatografia de afinidade pela aprotinina, quanto à cromatografia por imunoafinidade. A calicreína purificada era composta por um número de isoenzimas, cujo maior componente, a calicreína glicosada, apresentou peso molecular igual a 38.000 detectado pela eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, e o menor componente, representando uma enzima não glicosada, com um peso molecular igual a 26.000.

ARRUDA VEIGA et al (1992) determinaram a DL_{50} da Sialotoxina III e suas manifestações biológicas, em camundongos machos e fêmeas, assim como em camundongos machos castrados e fêmeas tratadas com testosterona. Os autores concluíram que a Sialotoxina III, produzida pelas glândulas salivares de camundongos machos, quando injetada em camundongos, leva a uma série de reações biológicas e à morte; a DL_{50} em camundongos machos é igual a 133,91 mg/kg, enquanto que nas fêmeas, muito mais sensíveis, a DL_{50} foi igual a 38,36 mg/kg. Ficou também evidenciado que as Sialotoxinas são andrógenos dependentes.

PROPOSIÇÃO

Fundamentados nas observações feitas na Revisão da Literatura, a proposição deste trabalho foi isolar e caracterizar uma proteína das glândulas submandibulares de camundongos machos que apresentasse atividade biológica quando injetada subcutaneamente no rato adulto, observando-se as seguintes condições:

1. Purificação seqüencial submetendo-se o homogenado glândular aos procedimentos padrão de purificação de proteínas;
2. Caracterização química da fração isolada pelos ensaios de atividade enzimática, determinação do peso molecular e eletroforese;
3. Verificação da atividade biológica pela análise dos órgãos internos dos ratos, em especial o pâncreas, fígado, estômago e pulmão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO DO EXTRATO GLANDULAR

No presente trabalho foram utilizados 34 g de glândulas submandibulares de camundongos machos adultos de 3 meses.

Trinta e quatro gramas de glândulas congeladas, foram fragmentadas em pequenos pedaços e então homogeneizadas em 270 ml de álcool etílico (96%) gelado, em um desintegrador de tecidos Waring Blendor, durante dois minutos, a uma velocidade máxima.

O homogenado obtido, foi distribuído em 8 (oito) tubos de centrífuga, e foi centrifugado a 12000 x g durante 15 minutos, em centrífuga refrigerada (Sorval RCB-2B). Os sobrenadantes foram desprezados e os precipitados lavados com 20 ml de tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,6, por tubo, homogeneizados com a ajuda de um bastão de vidro e centrifugados novamente à mesma velocidade. Os sobrenadantes foram coletados em um erlenmeyer e filtrado através de lã de vidro. A extração foi repetida mais uma vez, de forma idêntica à descrita anteriormente; os sobrenadantes foram reunidos, obtendo-se um volume de 300 ml.

3.2. CROMATOGRAFIA EM DEAE-CELULOSE

O extrato glandular foi aplicado a uma coluna, de 2,6 x 15 cm, preenchida com DEAE celulose, previamente ativada, de acordo com o seguinte procedimento:

A resina de troca iônica foi primeiramente tratada com NaOH 1N; em seguida lavada com água destilada até pH próximo da neutralidade. Após esta etapa, adicionou-se HCl 1N, suficiente para tornar a suspensão da resina fortemente ácida; imediatamente após procedeu-se a filtração e a lavagem com água destilada, até eliminação total do ácido. A coluna foi novamente suspensa em NaOH 1N, e os procedimentos de filtração e lavagem foram realizados com água destilada até eliminar toda a alcalinidade. Ajustou-se então o pH com o tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,6 e algumas gotas de álcool butílico foram adicionadas como conservante.

A coluna (um tubo de vidro de 2,6 x 15 cm) foi preenchida com DEAE celulose suspensa em Tris HCl 0,05M, sob pressão, obtida através de uma pêra manual, até que a resina atingisse o volume desejado.

Após a montagem da coluna, a resina foi equilibrada, lavando-a por um período de 15 horas, com tampão Tris HCl 0,05 M pH 7,6, com o fluxo mantido em torno de 60 ml/hora. A amostra do extrato glandular

(300 ml) foi lentamente aplicada sobre a coluna. Após a fixação total do extrato glandular, a resina foi lavada com 800 ml do tampão de equilíbrio, cujo eluente obtido constituiu a **Fração I**. Após a lavagem a coluna foi eluída seqüencialmente com 800 ml de tampão Tris-NaCl 0,1M e tampão Tris-NaCl 0,3M, constituindo-se respectivamente as **Frações II e III**. Para a coleta das frações foi utilizado um coletor de frações LKB 7000; o volume das frações coletadas foi igual a 6,0 ml por tubo, a um fluxo aproximado de 20 ml/hora.

As frações de proteínas eluídas foram concentradas até um volume igual a 20 ml, utilizando-se do sistema de ultrafiltração da AMICON R-402, com membrana UM-10 (Millipore), sob pressão de nitrogênio e mantendo-se o sistema imerso em gelo moído.

Os concentrados foram dialisados contra tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,6, durante 16 horas, em câmara fria, com temperatura de $5^{\circ}\text{C} \pm 0,5$. Após a diálise, as frações foram acondicionadas em frascos de vidro e conservadas sob refrigeração, a uma temperatura entre 2° e 8°C .

3.3. ENSAIO DA ATIVIDADE TÓXICA

As frações de proteínas concentradas foram injetadas em doses que variaram de 0,07 a 0,02 mg/g (correspondendo a 0,5 ml das

frações), em ratas adultas, por via subcutânea, divididos em 3 grupos, respectivamente, e um quarto grupo, controle, que recebeu água destilada. Estes animais foram mantidos em gaiolas metabólicas durante 24 horas após a injeção, para avaliação da poliúria.

Após este período, os animais foram sacrificados e seus órgãos internos, pâncreas, estômago, pulmão e fígado, avaliados quanto a alterações macroscópicas. Estas alterações correspondiam a atividade biológica das frações isoladas.

A intensidade da pancreatite observada foi classificada em pancreatite de 1º, 2º, 3º e 4º graus correspondendo respectivamente a 1/3, 1/2, 2/3 e 3/3 do pâncreas atingido.

O ensaio de atividade tóxica, foi realizado em todas as etapas subsequentes de purificação, mantendo-se o volume da dose igual a 0,5 ml.

3.4. MEDIDA DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

A determinação da quantidade de proteína em algumas fases de purificação, foi realizada utilizando-se o método de LOWRY et al. A

determinação de proteínas nas etapas onde a concentração era muito baixa, foi realizada por leitura a 280 nm, em um espectrofotômetro Beckman DU, utilizando-se como padrão albumina cristalizada de soro bovino.

3.5. ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática esterásica das frações protéicas foi realizada de acordo com o método descrito por ERLANGER et al.(1961)

Neste ensaio, a atividade enzimática foi determinada pela quantidade de p-nitroanilina formada durante a hidrólise do éster sintético benzoil-arginina-para-nitroanilida (BAPNA) preparado pela pesagem de 43,5 mg de BAPNA, dissolvidas em 1 ml de dimetilsulfóxido e ajustado o volume a 100 ml com Tampão Tris HCL 0,05M pH 7,6.

A mistura de incubação em um volume final igual a 7,0 ml, consistia de: 0,1 ml da amostra, ajustados a 1,0 ml com água destilada, foram adicionados 5,0 ml do BAPNA. Os tubos foram incubados por 25 minutos a 37°C e a reação paralisada com 1,0 ml de ácido acético a 30%. A quantidade de p-nitroanilina liberada foi estimada espectrofotometricamente a 410 nm. A quantidade de substrato hidrolisada pela enzima pode ser calculada pela extinção molar da p-nitroanilina a 410 nm ($E = 8.800$). Uma unidade de

BAPNA é a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μ mol do substrato, por minuto, a 37°C. A atividade específica é expressa como o número de unidades enzimáticas por mg de proteína.

A atividade proteolítica foi determinada a 37° C usando 2,0 ml de caseína como substrato, preparado pela pesagem de 0.2 g de caseína em 10 ml de tampão fosfato 0.1 M pH 7.6.

Após incubação a 37°C por 30 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 6,0 ml de ácido tricloroacético a 5%. A quantidade de substrato hidrolisada foi estimada espectrofotometricamente a 280 nm.

A atividade proteolítica por minuto por ml é expressa como o valor da densidade ótica por mg de proteína.

A fração protéica que apresentou maior atividade enzimática foi a fração II; sendo assim, os passos subseqüentes para purificação da proteína tóxica, foram realizados somente com a Fração II.

3.6. CROMATOGRAFIA EM DEAE - SEPHADEX DA FRAÇÃO II

3.6.1. PREPARAÇÃO DA COLUNA DE DEAE SEPHADEX A-50

Uma seringa de vidro de 20 ml, foi preenchida com a resina DEAE-Sephadex A-50, suspensa em Tris HCl 0,05 M pH 7,6, tendo no fundo da seringa um pouco de lã de vidro. Esperou-se até que a resina assentasse e a mesma foi equilibrada por um período de 15 horas, com aproximadamente 300 ml do tampão fosfato 0,01M pH 7,6 com o fluxo mantido em torno de 20 ml/hora.

3.6.2. CROMATOGRAFIA DA FRAÇÃO EM SEPHADEX A-50

Vinte mililitros da amostra da Fração II concentrada e dialisada, foi lentamente aplicada sobre a coluna. Após a fixação total da amostra, a resina foi lavada com 100 ml do tampão de equilíbrio e então eluiu-se as proteínas com tampão fosfato 0,1M, com pH 7,0, 6,0 e 5,0. As soluções eluentes tinham volumes iguais, de 500 ml. Para a coleta das frações foi utilizado um coletor de fração LKB 7000; o

volume das frações coletadas foi igual a 6,0 ml por tubo, a um fluxo aproximado de 20 ml/hora.

A eluição da Fração II em DEAE Sephadex, apresentou dois picos de proteína, determinados por leitura espectrofotométrica a 280 nm, em um espectrofotômetro Beckman DU, usando-se como padrão albumina cristalizada de soro bovino. A fração mais ativa, determinada pelos ensaios de toxicidade e atividade enzimática, saiu no pico 1, eluída com tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. Esta fração é representada por: F₂P₁ (Fração II, pico 1).

3.6.3. CONCENTRAÇÃO DA FRAÇÃO PROTÉICA OBTIDA DA CROMATOGRAPHIA EM DEAE SEPHADEX A-50

A fração II, pico 1 (F₂P₁) obtida da cromatografia em DEAE Sephadex A-50 foi concentrada até um volume igual a 13 ml, utilizando-se do sistema de ultrafiltração da AMICON-R-402, com membrana UM-10, sob pressão de Nitrogênio e mantendo-se o sistema imerso em gelo moído.

3.7. FILTRAÇÃO MOLECULAR EM SEPHADEX G-100

3.7.1. PREPARAÇÃO DA COLUNA DE SEPHADEX G-100

A resina foi embebida com água destilada e deixada em contato por 24 horas. Após este período, um tubo de vidro (3.5 x 100 cm) foi preenchido com a resina Sephadex G-100, equilibrada com solução de NaCl 0,1M em tampão Tris HCl 0,05 M pH 7,0, por um período de 15 horas, trabalhando com 600 ml da solução de equilíbrio, a um fluxo aproximado de 40 ml/hora.

3.7.2. CROMATOGRAFIA DA F_2P_1 EM SEPHADEX G-100

13,0 mililitros da F_2P_1 concentrada foi lentamente aplicada sobre a coluna. Após a fixação total da amostra, foi feita a eluição com tampão Tris HCl 0,05 M pH 7,0, com volume igual a 500 ml. As frações foram coletadas em volumes de 6,0 ml por tubo, a um fluxo de 40 ml/hora.

As frações coletadas apresentaram dois picos de proteína (F_2P_1-1 e F_2P_1-2). A fração mais ativa, determinada pelos ensaios de toxicidade e atividade enzimática, foi o pico 1 (F_2P_1-1).

3.8. ELETROFORESE ANALÍTICA EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Utilizou-se um aparelho de eletroforese em disco Canalco, modelo 300-B e do método descrito por DAVIS, (1964). O gel de separação foi preparado em tampão do gel de separação pH 8,6 e acrilamida-bis-acrilamida na concentração de 30:0,8, respectivamente. A polimerização do gel foi catalisada com persulfato de amônio a 10%. Cerca de 2,8 ml de gel, foram adicionados em tubos de eletroforese de 12,5 x 0,5 cm e cuidadosamente cobertos com água destilada. Após a polimerização do gel de separação, colocou-se sobre ele, 0,2 ml do gel de concentração preparado com tampão pH 8,6, acrilamida-bis-acrilamida na concentração de 10:2,5 respectivamente. A polimerização do gel de concentração foi catalisada com riboflavina e exposição à luz fluorescente.

Na câmara inferior do eletrodo foi colocado o tampão Tris-glicina pH 8,6 diluído 20 vezes.

As amostras oriundas das etapas de purificação, extrato glandular, DEAE-celulose, DEAE-sephadex e sephadex G-100, num volume de 0,1 ml, e com concentrações de proteínas variando de 100 a 200 μ g, contendo 1 gota de glicerol e 0,2 ml de Bromofenol blue, foram lentamente colocadas nos tubos e cobertas com o tampão do eletrodo diluído, e submetidas à eletroforese. O início da corrida eletroforética teve uma corrente igual a 2mA por tubo; depois que a amostra entrou no 1º gel, a amperagem foi aumentada para 3mA por tubo. Depois de corrida a eletroforese, os géis foram retirados e corados com a solução corante Comassie Blue. A descoloração foi feita após um período de 12 horas com a solução descorante apropriada. Outras descolorações se sucederam para uma perfeita nitidez das bandas.

3.9. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR

A determinação do peso molecular foi realizada de acordo com WEBER, OSBORN (1969), utilizando-se da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% contendo SDS.

Os padrões utilizados consistiram de: Albumina, Ribonuclease e Anidrase Carbônica. Para a preparação das soluções padrões foram

tomados 1 mg de cada um deles, 0,1 ml de beta-mercaptoetanol e 0,9 ml de tampão fosfato SDS para incubação. A amostra contendo 100 µg de proteína, foi preparada no mesmo tampão e deixados em banho-maria, sob fervura por 5 minutos; após fervura, os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C, por 12 horas. Após este período de incubação, foram adicionados aos tubos 40 µl de bromofenol blue, 5 gotas de glicerol e 50 µl de betamercaptoetanol.

O gel de poliacrilamida - bis acrilamida, foi preparado em tampão fosfato de corrida SDS, adicionado de TEMED e água destilada; a polimerização do gel foi catalisada por persulfato de amônio a 10%. Cerca de 2,5 ml de gel foram adicionados a cada tubo de eletroforese. A câmara inferior do eletrodo foi preenchida com o tampão Fosfato Eletroforese SDS, diluído 1:3.

As amostras foram lentamente colocadas nos tubos e submetidas à eletroforese. A corrida eletroforética teve uma corrente igual a 8mA por tubo e durou aproximadamente 7 horas. Depois da corrida eletroforética a coloração dos géis foi realizada com uma solução de Comassie blue e a descoloração com solução descorante apropriada. As mobilidades eletroforéticas das amostras foram medidas em milímetros. Um gráfico feito em papel com escala semilogarítmica, foi obtido colocando na ordenada o peso molecular e na abcissa as medidas das mobilidades.

3.10. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Foi realizada em dois grupos de animais: um grupo controle, que recebeu 0,5 ml de água destilada, e um experimental, que recebeu 0,5 ml da fração II (F_2P_1-1) após seu último estágio de purificação (Sephadex G-100). Os animais, foram deixados sem alimentação por um período de 24 horas, recebendo somente água "ad libitum".

Todos os animais, tanto aqueles do grupo controle quanto os do grupo experimental, foram pesados antes e após receberem a injeção de água destilada e fração purificada, respectivamente.

Após o período de 24 horas, os animais foram sacrificados, os pâncreas retirados, lavados ligeiramente em soro fisiológico e secos com ajuda do papel de filtro. Em seguida foram pesados.

Para a avaliação histológica, o pâncreas foi fixado em 10 vezes seu peso, de solução de Bowin, para obtenção de um melhor padrão de fixação e conservação, durante um período de 3 horas, após o qual foi retirado e colocado em álcool 70°. A seguir foi incluído em parafina, seguindo a metodologia convencional. Os cortes foram corados com Hematoxilina / eosina.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

O resultado dos estágios de purificação a partir do extrato glandular encontra-se expresso na Tabela 1. A quantidade de proteína obtida na preparação do extrato glandular, apresentou um resultado igual a 4.090,0 mg e a sua determinação foi realizada empregando-se o método de LOWRY et al, tomando-se 10 ul da amostra.

Na primeira etapa de purificação, como mostrado na tabela 1, o resultado de proteína total igual a 459,86 mg corresponde a Fração II (F_2). Os resultados de proteínas totais em DEAE Sephadex e Sephadex G-100 correspondem à Fração II Pico 1 (F_2P_1) e à Fração II Pico1 -1 (F_2P_{1-1}) respectivamente, sendo que ao final a proteína apresentou um fator de purificação de 115 vezes.

Tabela 1 -Etapas de purificação de uma proteína tóxica isolada das glândulas submandibulares de camundongos machos

Fração	volume	proteína	proteínas totais	purificação
	(ml)	(mg/ml)	(mg)	(x)
Extrato glandular	300,0	13,63	4.090,0	0
DEAE Celulose (F_2)	19,4	23,7	459,85	8,89
DEAE Sephadex (F_2P_1)	13,0	22,07	286,9	14,25
Sephadex G-100 (F_2P_{1-1})	6,0	5,93	35,56	115,01

4.1. CROMATOGRAFIA EM DEAE CELULOSE

A Figura 1 apresenta os três picos protéicos obtidos pela eluição em Tris-HCl, 0,05 M; Tris NaCl 0,1 M e Tris NaCl 0,3 M. A cromatografia realizada nestas condições resultou nas frações I, II e III.

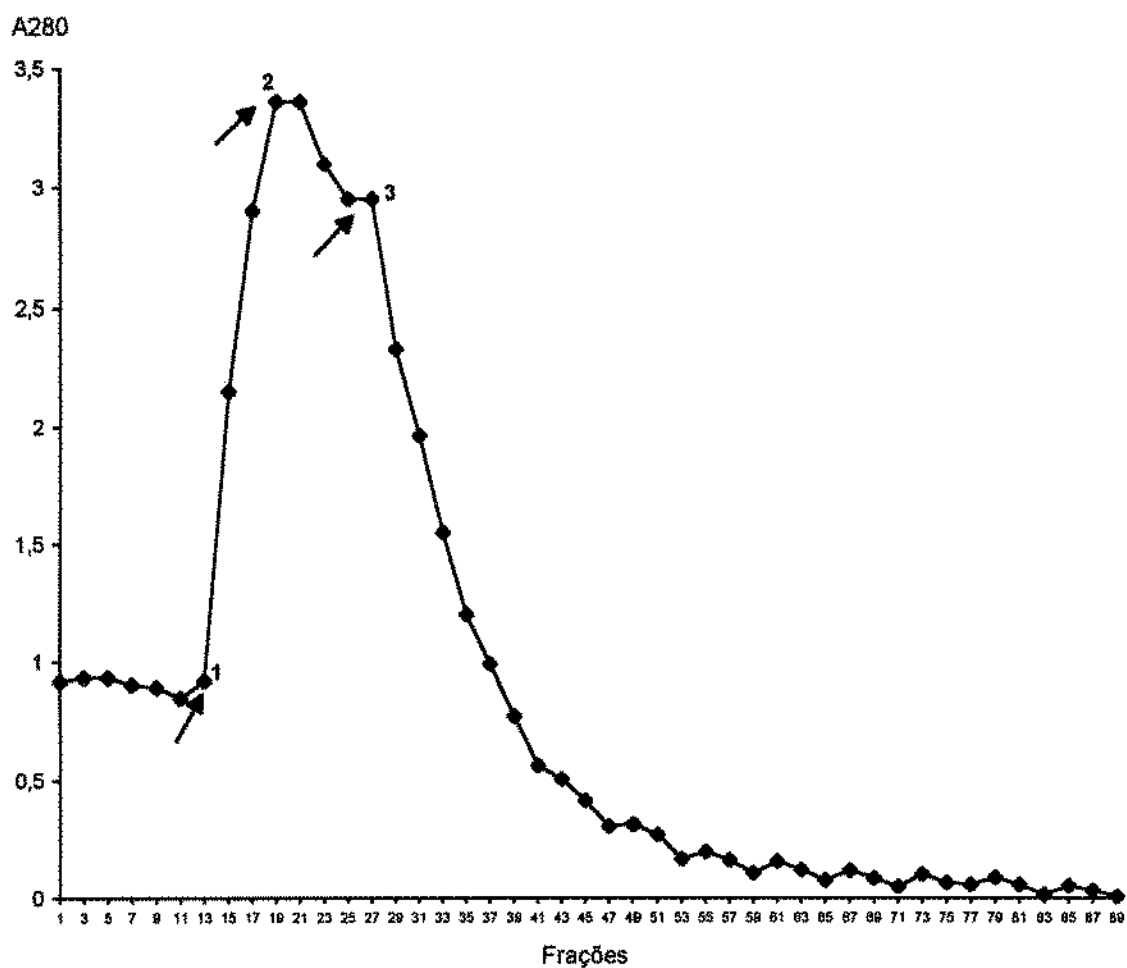


Figura 1 - Cromatografia do extrato glandular em coluna de DEAE Celulose, equilibrada com Tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,6 e eluída com NaCl.

A resposta ao ensaio biológico, no que diz respeito à produção de pancreatite, constrição gástrica, hemorragia pulmonar e hepática e volume urinário, indicou a fração II (F_2) como a mais tóxica. A partir deste ponto, todos os resultados apresentados nas outras etapas de purificação e caracterização correspondem a esta fração.

4.2. ENSAIO DA ATIVIDADE TÓXICA

Os efeitos tóxicos provocados pela injeção subcutânea da Fração F_2P_1-1 , em ratas adultas, são mostradas nas fotos 1, 2, 3, e 4. A ação tóxica local da proteína é evidenciada pela presença de um líquido gelatinoso, em proporção mais acentuada no lado oposto do pâncreas. O edema pulmonar se deve provavelmente ao extravasamento dos vasos sangüíneos periféricos, pelo aumento da permeabilidade capilar.

As medidas dos volumes urinários demonstrou que os animais que receberam a Fração F_2P_1-1 subcutâneamente (grupo experimental), apresentaram intensa poliúria, quando comparados com o grupo controle que recebeu igual volume de água destilada. (Tabela 2).

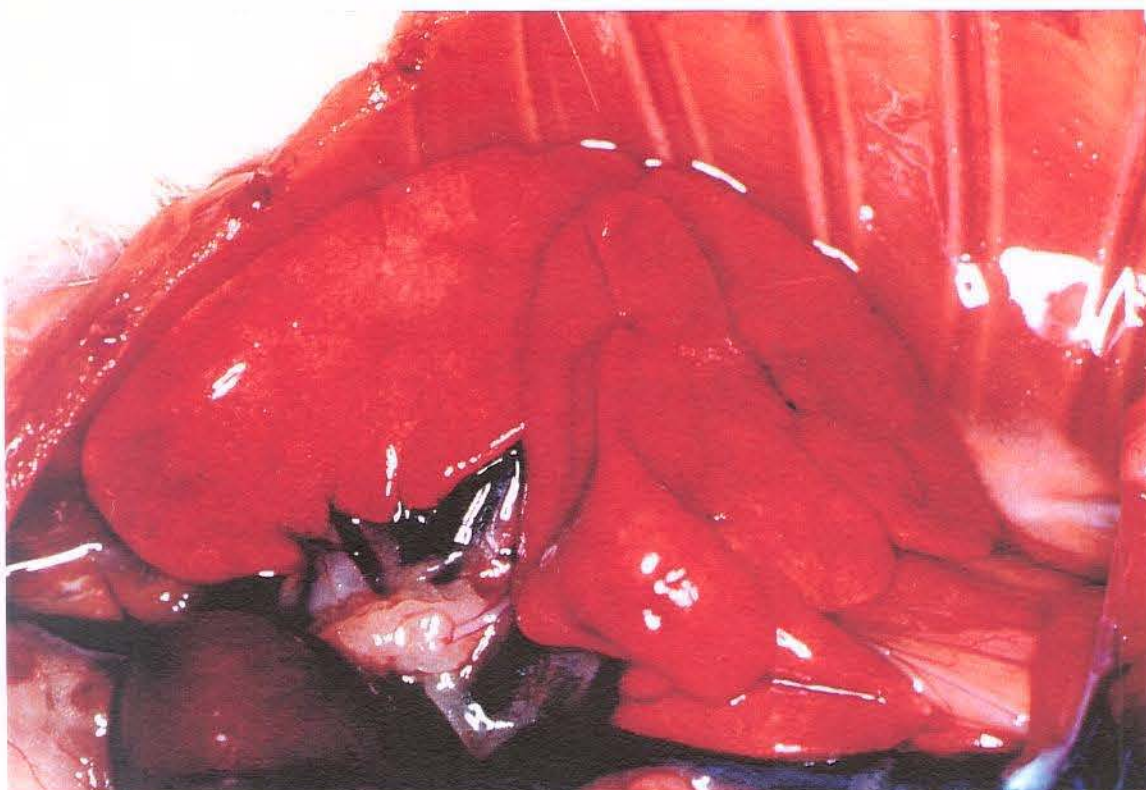


Foto 1 - Pulmão hemorrágico de rato tratado com proteína tóxica ($F_2P_1 - 1$)

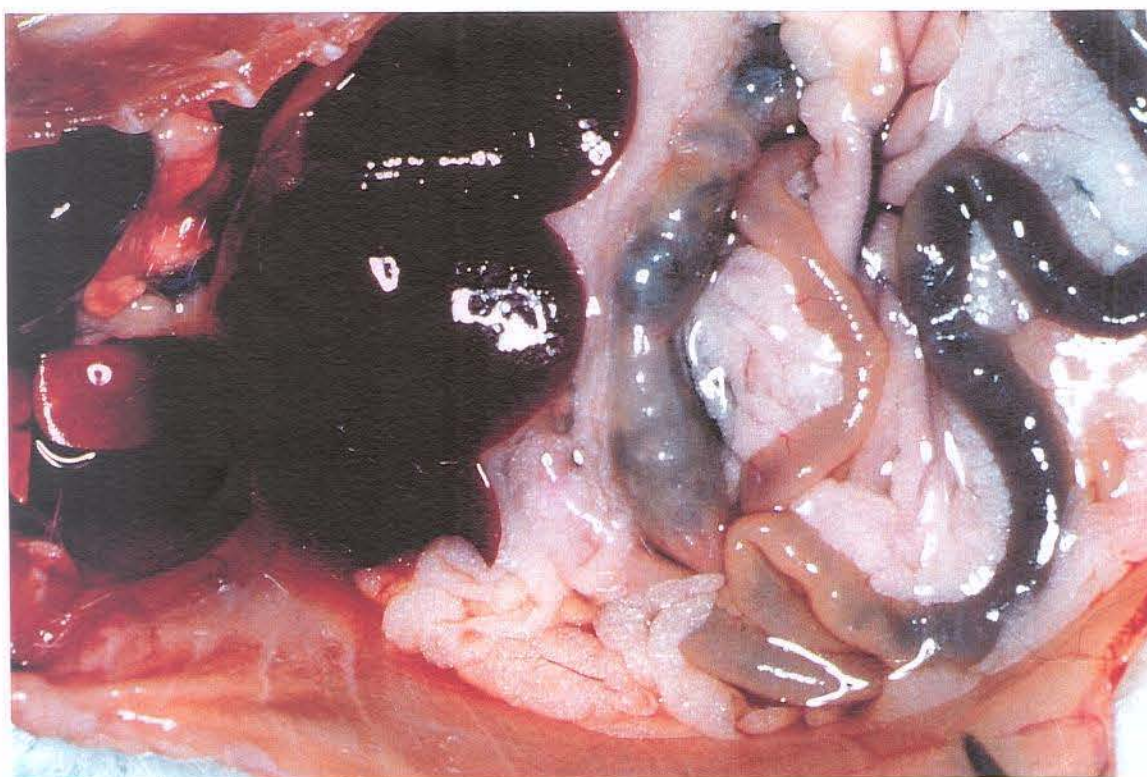


Foto 2 - Fígado hemorrágico de rato tratado com proteína tóxica (F_2P_1-1)

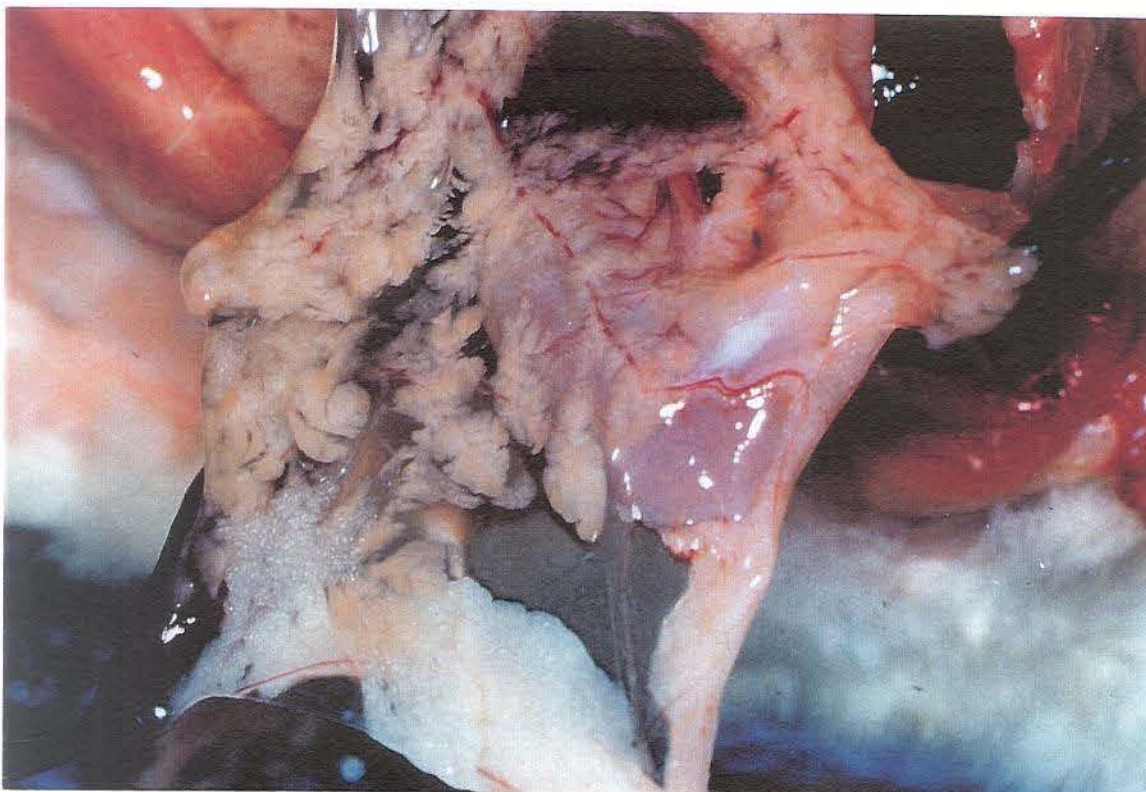


Foto 3 - Pâncreas com inflamação e degeneração aguda de rato tratado com proteína tóxica (F_2P_1 - 1)

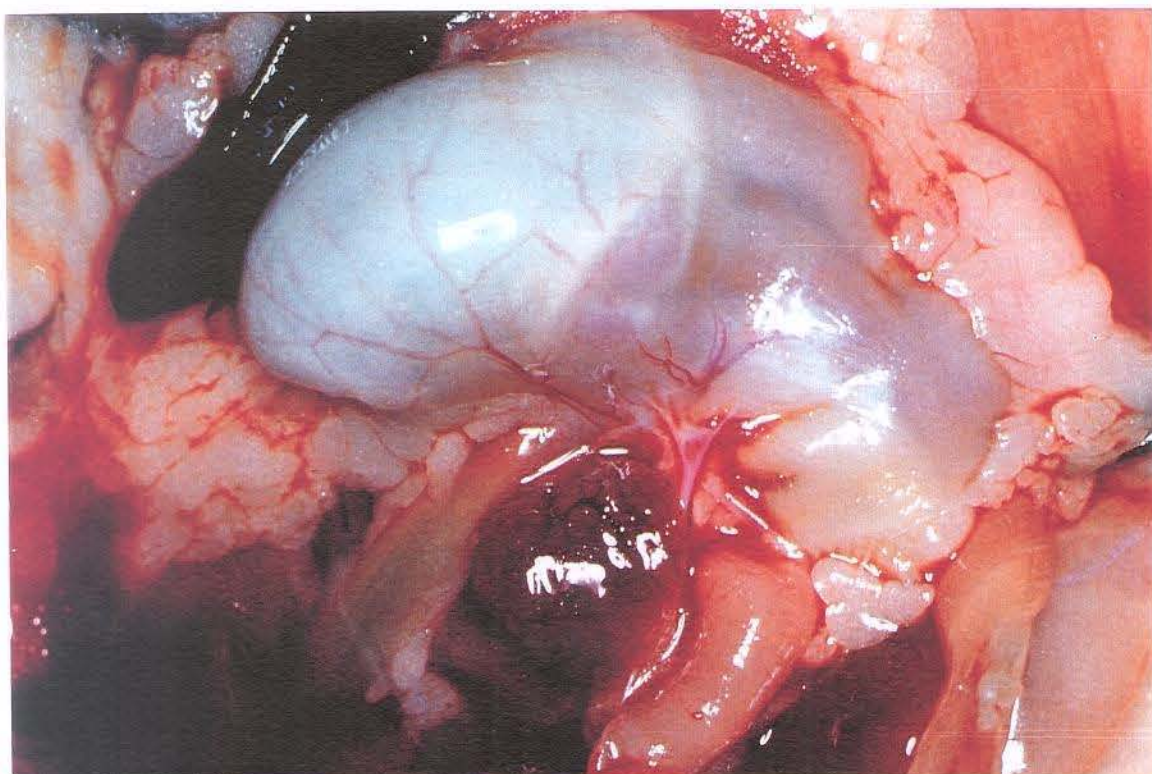


Foto 4 - Estômago engurgitado, repleto de suco gástrico de baixa acidez, de rato tratado com proteína tóxica (F_2P_1 - 1).

Tabela 2- Medidas do volume urinário de ratos mantidos em gaiolas metabólicas por 24 horas.

RATOS	VOLUME URINÁRIO (ml)	
	GRUPO CONTROLE	GRUPO EXPERIMENTAL
1	7,6	19,8
2	10,2	23,0
3	11,0	25,0
4	10,5	24,0
Média	9,82	22,95

4.3. CROMATOGRAFIA EM DEAE SEPHADEX

Vinte mililitros da fração F₂ concentrada por ultrafiltração e com uma concentração de proteína igual a 23,7 mg por ml, foram fixadas na coluna de DEAE Sephadex. As proteínas da coluna foram eluídas seqüencialmente por gradiente de pH, que apresentou dois picos de proteínas, com o tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, 6,0 e 5,0. A fração mais ativa corresponde ao pico 1 (F₂P₁) e foi obtida com tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. O pico 2 foi obtido com tampão fosfato 0,1 M pH 6,0 enquanto a eluição em pH 5,0 não apresentou nenhum pico protéico (Figura 2).

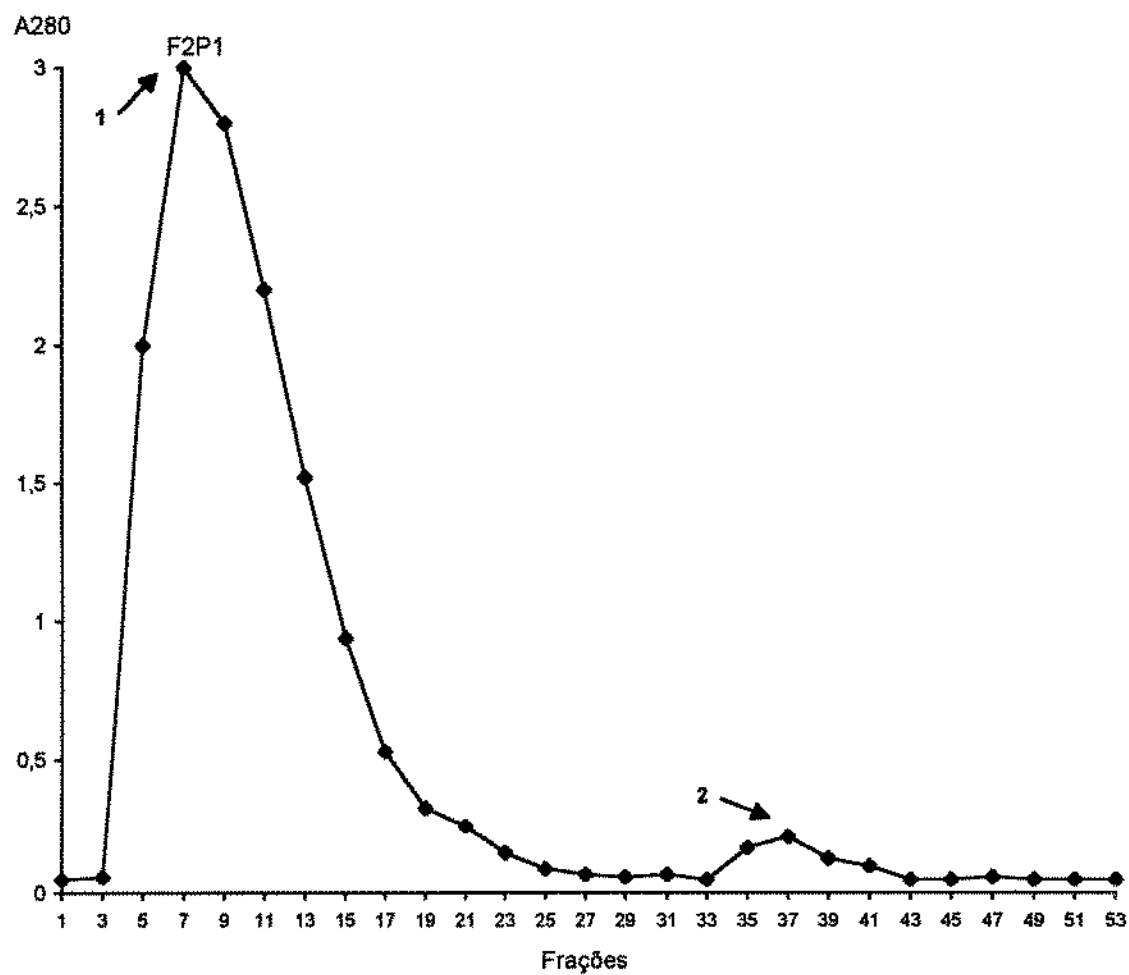


Figura 2 - Cromatografia da Fração II em coluna de DEAE Sephadex equilibrada com Tris-HCl 0,05 M pH 7,6 e eluída com tampão fosfato.

4.4. FILTRAÇÃO MOLECULAR EM SEPHADEX G-100

Treze mililitros (13 ml) da F_2P_1 concentrada por ultrafiltração, com uma concentração de proteína igual a 22,07 mg por ml, foram fixadas na coluna de Sephadex G-100. As proteínas da coluna foram eluídas com o tampão Tris HCl 0,05 M pH 7,0 e apresentou dois picos de proteínas(1 e 2). A fração que apresentou maior atividade tóxica correspondeu ao pico 1 (F_2P_1-1) (Figura 3).

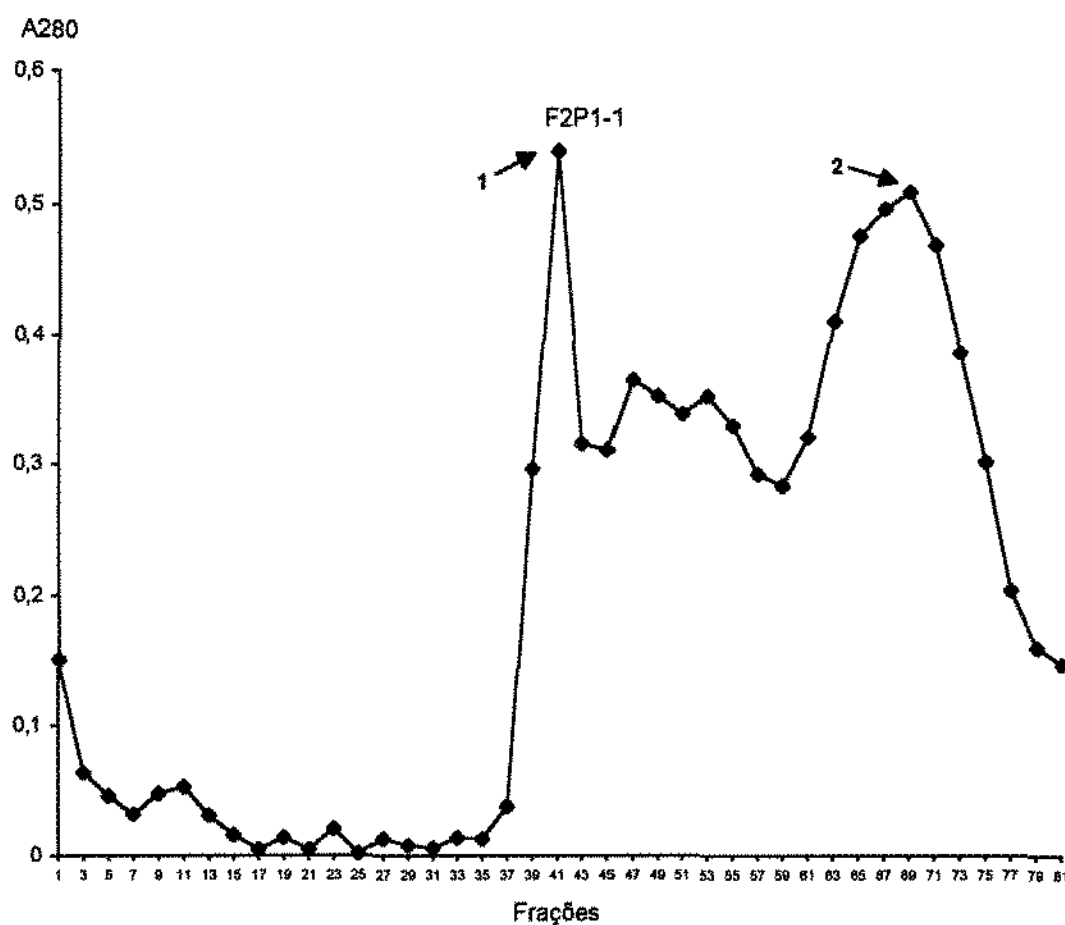


Figura 3 - Filtração molecular do pico 1 (F_2P_1) em coluna de Sephadex G-100.

4.5. ELETROFORESE ANALÍTICA EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A Foto 5 mostra o resultado da eletroforese analítica em gel de poliacrilamida. O primeiro tubo à esquerda corresponde às bandas protéicas do extrato glandular. Sequencialmente da esquerda para a direita temos DEAE Celulose (F_2), DEAE Sephadex (F_2P_1) e Sephadex G-100 (F_2P_1-1). Pode-se verificar que o número de bandas protéicas diminuiu com os procedimentos de purificação realizados.

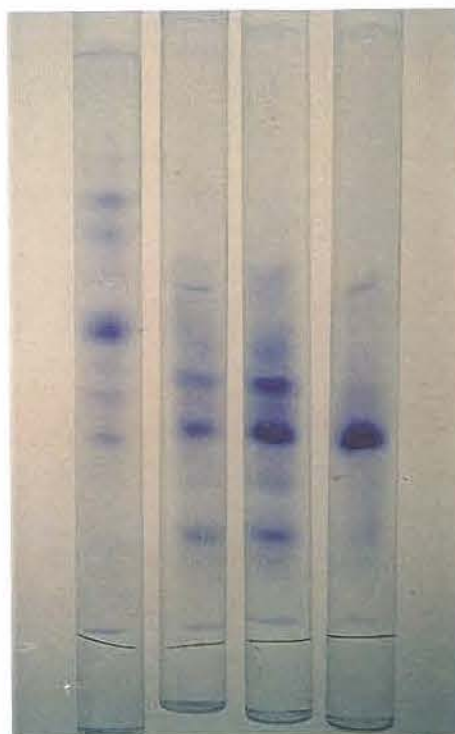


Foto 5 - Eletroforese analítica das frações obtidas nas várias etapas de purificação.

Da esquerda para direita temos: extrato glandular, cromatografia em DEAE Celulose (F_2), cromatografia em DEAE Sephadex (F_2P_1) e filtração em Sephadex G-100 (F_2P_1-1)

4.6. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR

A caracterização da proteína isolada, quanto ao peso molecular, encontra-se expressa na Figura 4, demonstrando que o peso molecular da fração protéica obtida da última etapa de purificação (F_2P_1-1), está em torno de 72.000 Daltons.

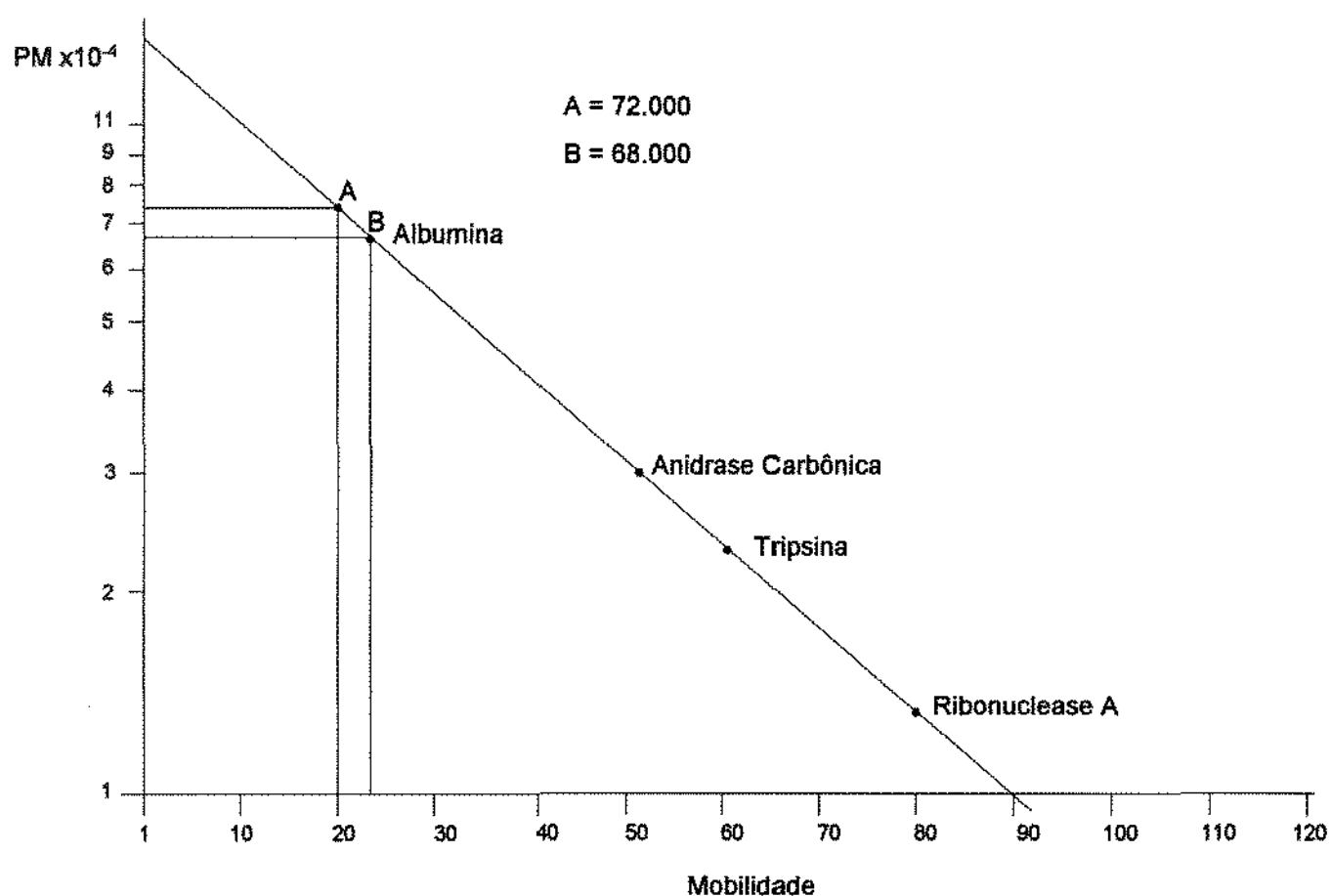


Figura 4 - Determinação do Peso Molecular realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando-se como padrão Albumina, Ribonuclease e Anidrase Carbônica.

4.7. ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática das frações protéicas em todas as etapas de purificação foi avaliada pela hidrólise do éster sintético Benzilarginina p-nitroanilida (BAPNA) e os resultados obtidos estão na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores da atividade esterásica obtidos nas diferentes etapas de purificação

Fração	UE/ml	AE	UE totais
Extrato glandular	2,11	0,226	633,0
DEAE Celulose (F ₂)	2,02	0,085	39,20
DEAE Sephadex (F ₂ P ₁)	1,99	0,090	25,0
Sephadex G-100 (F ₂ P ₁ -1)	0,18	0,030	0,84

Da mesma forma, a atividade proteolítica foi avaliada em todas as etapas de purificação pela hidrólise da caseína a 2% e os resultados obtidos estão na Tabela 4.

Tabela 4 -Valores da atividade proteolítica obtidos nas diferentes etapas de purificação

Fração	Atividade prot/min/ml	Atividade proteolítica. Total
Extrato glandular	0,41	122,5
DEAE Celulose (F ₂)	0,34	6,6
DEAE Sephadex (F ₂ P ₁)	0,23	3,0
Sephadex G-100 (F ₂ P ₁ -1)	0,15	0,9

4.8. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Os pesos dos animais que receberam 0,5 ml de água destilada (Grupo Controle) e dos seus respectivos pâncreas, estão expressos na tabela 5.

Tabela 5 -Peso dos animais e peso dos respectivos pâncreas que receberam injeção subcutânea 0,5 ml de água destilada(Grupo Controle)

Animal	Peso (g) antes da injeção	Peso (g) após injeção	Peso pâncreas (mg)
1	174,5	166,0	42,0
2	174,5	168,5	45,5
3	170,0	163,0	30,5
4	169,5	166,0	37,5
Média	172,1	165,9	38,9

Da mesma forma, os pesos correspondentes aqueles animais que receberam 0,5 ml da fração purificada e dos pâncreas destes animais, estão expressos na tabela 6.

Tabela 6 -Peso dos animais e dos respectivos pâncreas que receberam injeção subcutânea de 0,5 ml da fração purificada.

Animal	Peso (g) antes da injeção	Peso (g) após injeção	Peso pâncreas (mg)
1	214,0	221,0	53,5
2	184,0	199,0	51,5
3	193,0	213,0	42,0
4	217,0	223,0	43,0
Média	202,0	214,0	47,5

A ação da proteína isolada sobre as estruturas do pâncreas evidenciou modificação morfológica, com diminuição da densidade acinar com dissociação de fibras conjuntivas, sugerindo edema. Dissociação do estroma das ilhotas de Langehrans, dilatação dos dutos secretórios que também sugere edema e dutos capilares dilatados. Essas modificações caracterizam pancreatite exsudativa. Fotos 6,7,8.

5. DISCUSSÃO

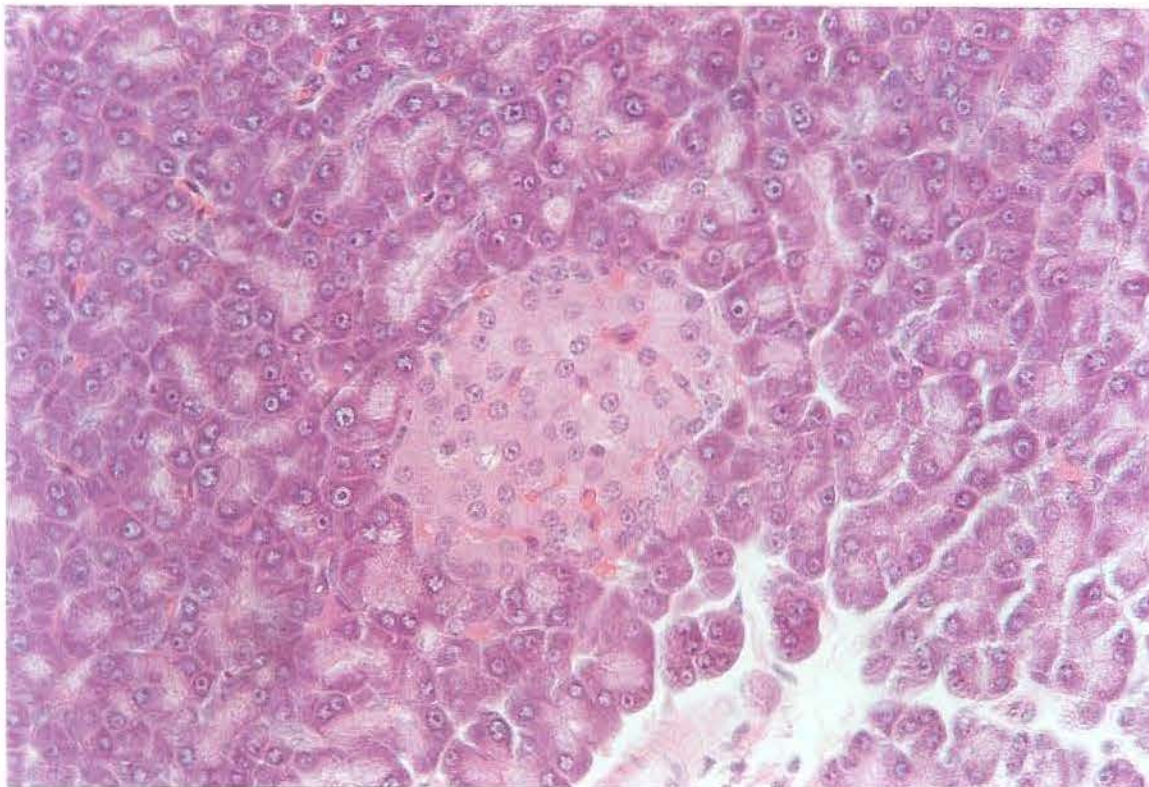


Foto 6 - Corte histológico do pâncreas de rato do grupo controle, mostrando regularidade nos diâmetros dos ácinos, parênquima homogêneo. Aumento 100x . HE.

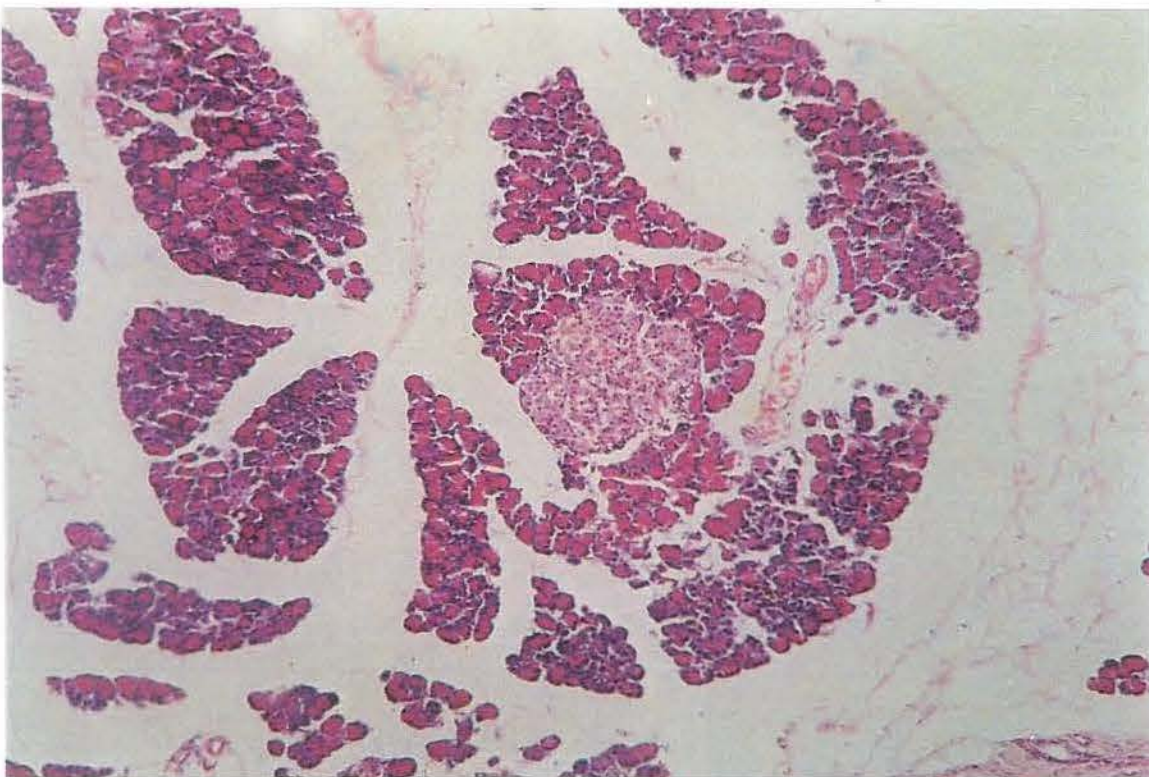


Foto 7 - Corte histológico do pâncreas de rato com pancreatite aguda exsudativa, mostrando diminuição da densidade acinar com dissociação das fibras conjuntivas. Dissociação do estroma das Ilhotas de Langerhans, dilatação dos dutos secretórios, dilatação dos dutos capilares. Aumento 100x . HE.

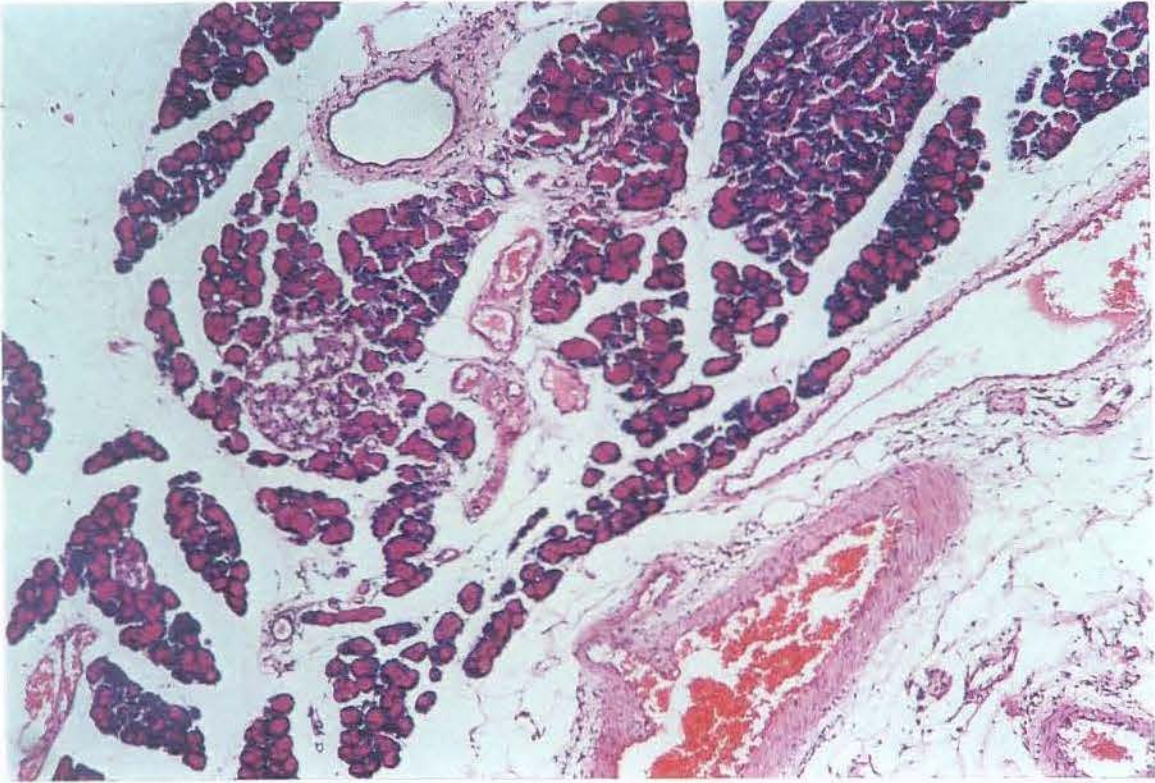


Foto 8 - Corte histológico do pâncreas de rato com pancreatite aguda exsudativa, mostrando lobos pancreáticos dissociados por um estroma com fibras extremamente dissociadas, vasos dilatados (hiperemia). Aumento 100x . HE.

5. DISCUSSÃO

Pelos resultados obtidos do fracionamento de uma proteína tóxica extraída das glândulas submandibulares de camundongos machos, constatamos efetivamente que a proteína isolada neste trabalho possui alta atividade biológica, mantida ao longo de todas as etapas de purificação e detectada pelo ensaio em ratas adultas, com respostas sensíveis em três órgãos alvos: pâncreas, fígado e estômago, ficando as observações concentradas no pâncreas, o órgão mais reativo.

A presença de fatores tóxicos em glândulas submandibulares de camundongos machos, ficou anteriormente evidenciada pelo trabalho de HUANG et al (1972), que demonstraram o efeito tóxico letal do extrato glandular, quando injetado em camundongos e em outros animais de experimentação, mas não evidenciaram detalhes quanto a natureza deste componente tóxico.

Da mesma forma, LIUZZI, ANGELETTI (1968), em diferentes experimentos com extratos crus e parcialmente purificados, extraídos de glândulas submandibulares de camundongos machos, concluíram que vários componentes tóxicos são os responsáveis pelo efeito tóxico generalizado, quando injetados em camundongos. Estes componentes podem ser separados e individualmente caracterizados. Uma das frações isoladas e consi-

derada como a mais tóxica, era letal em doses elevadas, mas sua toxicidade ficava restrita a um órgão alvo, o timo, quando injetada em doses mais baixas.

Os resultados deste trabalho se assemelham aos dos autores citados acima, quando, em diferentes etapas do processo de purificação utilizando a cromatografia, observou-se que as frações correspondentes aos picos de proteínas, apresentavam efeito tóxico em maior ou menor grau, quando injetadas subcutâneamente em ratas adultas, sendo que algumas frações não apresentavam toxicidade.

O volume da dose injetada foi mantido durante todo o experimento, independente do grau de purificação ou da concentração protéica, o que deixa inconclusiva a influência desta concentração sobre o grau de toxicidade alcançado. Foi determinante neste trabalho a caracterização da fração tóxica que resultou na identificação química de uma proteína. Para caracterização deste material, o fator tóxico foi purificado e suas propriedades enzimáticas determinadas. O fator tóxico purificado resultante é uma proteína de peso molecular em torno de 72.000 daltons, contendo ambas as atividades enzimáticas: esterásica e proteolítica.

O extrato glândular cru, biologicamente ativo, foi eluído de uma coluna de DEAE Celulose com tampão Tris- HCl 0.05M pH 7.6 e NaCl 0.1M e 0.3M; subsequentemente, estas frações eluídas, correspondentes a 3

picos de proteínas foram concentradas e dializadas e examinadas quanto à sua atividade biológica pela injeção subcutânea em ratas adultas. Destas frações, a fração II apresentou maior atividade biológica pelos efeitos provocados no pâncreas e no pulmão. Esta fração com alta atividade biológica foi concentrada e dializada, aplicada a uma coluna de Sephadex A-50 sendo eluída por gradiente de pH. A eluição apresentou 2 picos de proteínas, sendo que a fração mais ativa determinada pelos ensaios biológicos, foi aquela correspondente ao pico 1. De forma similar, a manifestação biológica produzida por esta proteína, já nesta fase de purificação, era a mesma em intensidade daquela produzida pelo extrato cru. O mecanismo de ação desta proteína, principalmente sobre o pâncreas, não pode ser esclarecido neste trabalho. Após 24 horas em contato com esta proteína, as estruturas do pâncreas evidenciaram modificação morfológica, como diminuição da densidade acinar com dissociação de fibras conjuntivas, sugerindo edema; dissociação do estroma das ilhotas de Langerhans, dilatação dos dutos secretórios que também sugere edema e dilatação dos dutos capilares. Todas estas modificações caracterizam pancreatite aguda exsudativa.

A evidência de que esta fração, biologicamente ativa, é uma proteína, ficou confirmado quando primeiramente, pôde ser submetida aos procedimentos padrões aplicáveis à separação de proteínas, descritas acima, com uma resposta satisfatória; em segundo lugar pela propriedade de clivagem de substratos enzimáticos como o BAPNA(benzoil arginina p - nitroanilida) e caseína. A unidade esterásica total do extrato cru (633

unidades esterásicas totais) reflete a ação combinada de uma grande variedade de enzimas na glândula submandibular de camundongos machos atuando sobre o substrato; em ambos os casos, a atividade biológica se manteve associada a todas as etapas de purificação. Estes resultados indicam a possibilidade de que os efeitos biológicos observados sejam provenientes da liberação de peptídeos ativos.

A proteína isolada neste trabalho, hidrolisou o BAPNA de uma forma moderada e a caseína de uma forma bem lenta. Por ser o BAPNA um substrato típico para tripsina, sugere uma semelhança entre estas duas proteínas.

A caracterização química e a purificação dos fatores biologicamente ativos, já foram descritos anteriormente por ATTARDI et al (1965), que purificaram uma proteína das glândulas submandibulares de camundongos machos, que estimulava os tecidos embrionários musculares "in vivo" e "in vitro" e que possuía atividades esterásica e proteolítica. O mecanismo de ação desta proteína sobre os tecidos musculares embrionários não ficou totalmente esclarecido, embora os autores atribuam sua ação à sua atividade enzimática.

ANGELETTI et al (1965), comprovaram que o fator tóxico por eles isolados das glândulas submandibulares de camundongos machos, era de natureza protéica e que a atividade biológica inerente a este fator, estava

ligada ao aumento do número de leucócitos, após a purificação parcial do extrato cru, por fracionamento com sulfato de amônio e posterior diálise e ultrafiltração.

Resultados semelhantes foram obtidos por HIRAMATSU, HATAKEYAMA e MINAMI (1980) partindo do homogenado de glândulas submandibulares de camundongos machos. Estes autores purificaram por cromatografia em DEAE Celulose, filtração em Sephadex G-100 e eletroforese em gel de poliacrilamida, uma proteína tóxica e que esta atividade tóxica era devida à atividade enzimática e se assemelhava a calicreína.

Também COHEN, (1972) isolou e purificou um fator biologicamente ativo de glândulas submandibulares de camundongos machos, cuja caracterização resultou na obtenção de uma proteína, de características químicas distintas como ausência de fenilalanina e da lisina em sua molécula.

Nossos resultados encontraram suporte e são similares a vários outros trabalhos utilizando as glândulas submandibulares de camundongos machos e com propriedades biológicas específicas.(SCHENKEIN et al (1969); COHEN et al (1972); HOSHINO, LIN (1972); HATAKEYAMA et al (1981); COX et al.(1986).

Como podemos observar, a quantidade de proteínas contidas no homogenado de 34 g de glândulas submandibulares de camundongos

machos, perfazem um total de aproximadamente 4000 mg. Na 1ª etapa de purificação, pela passagem em DEAE Celulose, obtivemos aproximadamente 460 mg de proteínas (F_2). A seguir, pela cromatografia em DEAE Sephadex A-50, e eluição por gradiente em pH, conseguimos uma purificação de aproximadamente 14 vezes em relação ao extrato cru, com uma concentração de proteínas igual a 280 mg(F_2P_1). Na última etapa de purificação, as proteínas da F_2P_1 foram filtradas em Sephadex G-100. Nesta filtração obtivemos a F_2P_1-1 , contendo aproximadamente 36 mg de proteína com atividade biológica.

Uma comparação direta entre a proteína isolada e parcialmente caracterizada neste trabalho com outras parcialmente purificadas por outros autores é muito difícil, devido à variedade de ensaios empregados e relativamente poucos dados disponíveis, principalmente em relação às características físicas das preparações utilizadas. No entanto, a similaridade de algumas características químicas entre a proteína isolada e aquelas isoladas por outros autores, COHEN et al. (1972); HIRAMATSU et al. (1979) HATAKEYAMA et al. (1980); se fazem presente por serem macromoléculas, não alterarem sua atividade biológica e/ou tóxica quando dialisadas, por hidrolisarem substratos específicos e por terem sua atividade biológica associada a somente uma banda de proteína, determinada pela eletroforese.

Outros ensaios se fazem necessários para complementação da caracterização desta proteína tóxica.

Quanto aos efeitos biológicos, foram observadas variações nas diversas frações de proteínas que variavam de resposta nula até pancreatite de grau 4. Outras alterações biológicas como engurgitamento gástrico e hemorragia pulmonar também apresentaram variações e nos levou a trabalhar somente com a fração que apresentasse maior toxicidade, no que diz respeito à produção de pancreatite e edema pulmonar. Durante todo o desenvolvimento do experimento, e após as sucessivas etapas de purificação, pode-se acompanhar as respostas dos ensaios biológicos, evidenciados pela uniformidade e padronização destas respostas, indiferentes ao grau de purificação alcançado; desta forma, a manifestação biológica produzida pelo extrato cru, era a mesma, em intensidade, daquela produzida pela fração protéica obtida na última etapa de purificação.

O ensaio da atividade tóxica neste experimento foi realizado em ratas adultas, pois parece unânime na literatura o fato que as ratas fêmeas são muito mais sensíveis que os ratos machos, COHEN (1962); SCHENKEIN et al. (1974); AGOSTINHO (1987); BOAVENTURA (1988).

ARRUDA VEIGA et al (1992), determinaram a DL_{50} da Sialotoxina III, isolada por PINHEIRO (1988), em camundongos machos e fêmeas, assim como em camundongos machos castrados e fêmeas tratadas por testosterona, concluindo que a DL_{50} desta toxina era muito mais baixa em fêmeas do que em machos. Os camundongos machos adultos, provavel-

mente tenham entrado em contato com o fator tóxico em doses fisiológicas durante a fase de desenvolvimento e crescimento, apresentando desta forma um certo grau de tolerância ou imunidade a esta toxina.

A interrelação entre o sexo dos animais e a presença do fator tóxico está fortemente estabelecida e cientificamente comprovada em vários trabalhos.

HUANG et al (1976), relataram que a suscetibilidade ao fator letal variava quando se faziam comparações entre diferentes espécies animais; diferiam ainda segundo o sexo e o grau de maturação sexual dos camundongos. Concluíram que o fator extraído de glândulas submandibulares de camundongos machos adultos era letal para todas as espécies de animais testados.

HATAKEYAMA et al (1980), observaram que a atividade tóxica da saliva estava presente em todas as espécies de camundongos machos examinadas. Em camundongos fêmeas esta atividade era extremamente baixa. No entanto, as respostas biológicas a estes fatores eram mais pronunciadas quando injetados em ratos fêmeas.

Resta-nos ressaltar que a proteína tóxica isolada neste trabalho difere das outras proteínas isoladas em relação ao seu alto peso molecular, sua atividade enzimática demonstrou baixa especificidade pelo

substrato e seus efeitos biológicos específicos. Nenhum outro autor verificou alterações pancreáticas e pulmonares em seus experimentos.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Baseados nos resultados experimentais foi isolada das glândulas salivares de camundongos machos uma proteína tóxica para o rato.

Uma característica importante apresentada por esta proteína tóxica é a produção de pancreatite aguda para o rato adulto. Além da pancreatite, que é a alteração mais comum, foram observados edema pulmonar, fígado hemorrágico e engurgitamento gástrico, resultando em um estômago repleto de suco gástrico.

A caracterização química desta proteína, através da determinação do PM (72.000 daltons) e ensaio da atividade enzimática, nos leva a concluir que ela é uma proteína tóxica diferente das outras esterases das glândulas submandibulares de camundongos, por apresentar uma baixa atividade esterásica e proteolítica e toxicidade específica para o fígado, pulmão, pâncreas e estômago.

SUMMARY

SUMMARY

The purpose of this study was to isolate and to characterize a toxic protein from male mice submaxillary glands.

The crude extract was obtained from 34 gr. of male adult mice. The extract was applied to a column of DEAE Cellulose. Initially the column was washed with 800 ml of Tris-HCL buffer. Then the column was successively eluted with Tris-NaCl 0.1M (fraction II), Tris-NaCl 0.3 M (fraction III). All these fractions were concentrated by ultracentrifugation and the biological activity was tested by subcutaneous injection into adult female rats (toxic activity) and enzymatic activity was carried out using BAPNA as substrate.

The highest toxic fraction, the fraction II, was dialyzed against Tris-HCL and further fractionated with DEAE Sephadex A-50 and eluted with a Phosphate 0.1 M pH gradient (pH range from 5.0 to 7.0). In the three protein peaks (F_2P_1 , F_2P_2 , F_2P_3), the highest toxic fraction was obtained with Phosphate buffer 0.1M pH 7.0 (F_2P_1). This sample was again applied to a column of Sephadex G-100 and eluted with Tris-HCL 0.05M pH 7.6 buffer. The more active fraction determined by toxicity assays was the sample F_2P_1 -1.

This fraction appeared as a single protein band with polyacrilamide gel electrophoresis.

The polyacrilamide gel electrophoresis with SDS 10% was used to determine the approximate molecular weight of the isolated enzyme.

The effects observed at the rats organs, were hemorrhagic lungs and liver, pancreas with acute inflammation and stomach fully of low acidity gastric juice.

The chemistry characterization and the biologic activity from this protein indicate that it is an esterase with toxic properties that make it different from another toxic esterase isolated from male mice submandibular glands, confirming that these glands are a rich source of toxic proteins and the majority of them have estereoproteolytic activities.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGOSTINHO, S.M.S. **Sialotoxina I: determinação da DL₅₀, suas manifestações biológicas e sua interação com a testosterona e estradiol em camundongos.** Piracicaba, 1987. 99p. [Tese (Mestrado) - Faculdade Odontologia de Piracicaba - UNICAMP].
2. ANGELETTI, P.U. et al. Granulocytosis inducing factor from the mouse submaxillary gland. **Biochim. biophys. Acta**, 3: 344-6, 1965.
3. ARRUDA VEIGA, M.C.F. **Purificação e caracterização de um peptídeo de glândulas submandibulares de camundongos machos com atividade tóxica renal.** Campinas, 1979. 59p. [Tese (Mestrado) - Instituto de Biologia - UNICAMP].
4. _____, & PINHEIRO, C.E. Purificação e caracterização de um peptídeo de glândulas submandibulares de camundongos machos com atividade tóxica renal em ratos. **Arq. Biol. Tecnol.**, 31(4): 575-85, 1988.
5. _____; TEIXEIRA, D.; BOAVENTURA, M. C. Efeito das frações I, II, III e IV do princípio ativo "Parotin" sobre a captação de glicose pelo

- tecido adiposo de ratos normais e diabéticos. **Fomean**, **98**(3): 79-82, 1989.
6. _____ et al. Efeito das frações I, II, III e IV do princípio ativo (Parotin) sobre o consumo de oxigênio pelo tecido adiposo epididimal de ratos normais e diabéticos. **Arq. Biol. Tecnol.**, **32**(3): 589-601, 1989.
7. ARRUDA VEIGA, M.C.F. Determinação da DL₅₀ da Sialotoxina III e sua interação com a testosterona em camundongos. **Arq. Biol. Tecnol.** **35**(3): 449-58, 1992.
8. ATTARDI, D.G. et al. Submaxillary gland of mouse. Effects of a fraction on tissues of mesodermal origin in vitro. **Science**, **150**: 1307-9, 1965.
9. _____. & SCHESINGER, R. Submaxillary gland of mouse; properties of a purified protein affecting muscle in vitro. **Science**, **152**: 1253-5, 1967.
10. BARKA, T. Partial purification of a mitotic - suppressor from the salivary gland. **Exp. molec. Path.**, **18**: 225-33, 1973.

11. _____. Biologically active polypeptides in submandibular glands. **J. Histochem. Cytochem.**, **28**: 836-59, 1980.
12. BOAVENTURA, M.C. **Efeitos da Sialotoxina I sobre a incorporação de glicose e consumo de oxigênio pelo diafragma dos ratos.** Piracicaba, 1988. 125p. [Tese (doutoramento) Faculdade Odontologia de Piracicaba - UNICAMP].
13. CARPENTER, G. & COHEN, S. Epidermal growth factor. **A. Rev. Biochem.**, **48**: 193, 1979.
14. COHEN, S. & LEVI-MONTALCINI, R. A nerve growth stimulating factor isolated from snake venom. **Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.**, **42**: 571, 1956.
15. 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.
16. _____. Isolation of a mouse submaxillary gland protein incision eruption and eyelid opening in newborn animal. **J. Biol. Chem.**, **237(5)**: 1552-62, 1962.

17. _____. et al. Isolation and characterization of renin-like enzymes from mouse submaxillary glands. **Biochemistry**, **11**: 4286, 1972.

18. COX, P.C. et al. An extract of rat submandibular glands activates platelets and enhances cutaneous vascular permeability in rats and guinea pigs. **Life Sci.**, **39**(20): 1917-25, 1986.

19. DAVIS, B.J. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, **121**: 404-27, 1964.

20. DE LANGE, G.L. The effect of salivary glands extracts on the histology of lymphoid organs and salivary glands in mice. **Archs oral Biol.**, **20**: 515-20, 1975.

21. DEAN, D.H. & HIRAMOTO, R.N. Lethal effect of male rat submandibular gland homogenate for rats neonates. **J. Oral Path.**, **14**: 666-9, 1985.

22. EI - THAHER, T.S.; LAED, G.M.; BAILEY, G.S. A simple and rapid purification of kallikrein from rat submandibular gland. **Biochim. Biophys. Acta**, **1034**: 157-61, 1990.

23. EKFORS, T.O. et al. Four isozymic forms of a peptidase resembling kallicrein purified from the rat submandibular gland. **Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.**, 348:111, 1967
24. _____ . & HOPSU-HAVU, V.K. Properties of the esteropeptidase purified from the mouse submandibular gland. **Enzimologia**, 43: 177, 1972.
25. GRESIK, E. & BARKA, T. Immunocytochemical localization of epidermal growth factor in mouse submandibular gland. **J. Histochem. Cytochem.**, 25: 1027-35, 1977.
26. _____ . _____ . Immunocytochemical localization of epidermal growth factor during the postnatal development of the submandibular gland of the mouse. **Am. J. Anat.**, 151:1, 1978.
27. HATAKEYAMA, K.; HIRAMATSU, M.; MINAMI, N. Lethal factor in the male mouse submandibular gland. **Can. J. Physiol. Pharmac.**, 59: 1134-8, 1981.
28. HIRAMATSU, M.; HATAKEYAMA, K. _____. Male mouse submaxillary gland secretes highly toxic proteins. **Experientia**, 36: 940-2, 1980.

29. HOSHINO, K. & LIN, C.D. Hiperplasia-inducing factor in mouse salivary gland isografts. **Cancer Res.**, **28**: 2556-8, 1968.
30. _____. & _____. Transplantability of salivary glands of mice and its lethal effects on the hosts. **Anat. Rec.**, **160**: 474-5, 1968.
31. _____. & _____. Lethal factor released from submandibular grafts in mice. **Can. J. Physiol. Pharmac.**, **47**: 329-34, 1969.
32. HOSHINO, K. et al. Species and strains differences in the lethal factor of the mouse submandibular gland. **Can. J. Physiol. Pharmac.**, **55**: 1107-11, 1977.
33. 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**: 455-6, 1972.
34. JUNQUEIRA, L.C. et al. Biochemical and histochemical observations on the sexual dimorphism of mice submaxillary glands. **J. cell. comp. Physiol.**, **34**: 129-58, 1949.

35. KASHIMATA, M.; HIRAMATSU, M.; MINAMI, V. Biochemical properties of growth factor in the mouse kidney. **Comp. Biochem. Physiol.**, **86B**(4): 651-3, 1987.
36. LIN, C.D. & HOSHINO, K. Hemorrhagic phenomena caused in the host mice by submandibular gland isografts from males. **Proc. Can. Fed. Biol. Soc.**, **12**: 8-21, 1969.
37. _____. & _____. Testosterone dependency of the lethal factor in mouse submandibular gland isografts. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **47**: 335, 1969.
38. _____. & _____. Strain differences in the lethal factor exerted by submandibular glands transplanted from male mice. **Experientia**, **26**: 753, 1970.
39. _____. & _____. Hemorrhage caused by isografts of submandibular glands of male mouse. **Archs Oral Biol.**, **17**: 1241-3, 1972.
40. LIUZZI, A. & ANGELETTI, P.V. Studies on the toxic effects of mouse submaxillary glands extracts. **Experientia**, **24**: 1034, 1968.

41. LOWRY, O.H. et al. Protein measurements with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, **193**: 263-75, 1951.
42. PETERSON, G.L. Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosenbrough, Farr & Randall. **Analyt. Biochem.**, **100**, 201-20, 1979.
43. PINHEIRO, C.E. Sialotoxins: a family of toxic substance isolated from the submandibular glands of the male mice. **Revta Odont. Univ. S. Paulo**, **2**(3): 157-60, 1988.
44. SCHENKEIN, I. et al. Proteases from mouse submaxillary gland. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **36**: 156, 1969.
45. _____. et al. Immunological and enzymatic evidence for the absence of an esteroproteolytic enzyme, protease D, in the submandibular gland of the mouse. **Endocrinology**, **94**: 840, 1974.
46. SREEBNY, L.M. Studies of salivary glands proteases. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, **85**: 182, 1960.

47. SWIGART, R.H. et al. Effect of gonadal hormones on submandibular gland amylase activity in male and female (57BL16) mice. **Endocrinology**, **76**: 776, 1965.
48. TUCH, K. & MATTHIESEN, T.H. Wasting syndrome in neonatal mice after administration of salivary gland homogenate. **Experientia**, **33**: 764-5, 1976.
49. WEBER, K. & OSBORN, M. The reability of molecular weight determinations by dodecyl-sulfate poly acrylamide gel electroforesis. **J. Biol. Chem.**, **244**: 4406-12, 1969.
50. WILLIAMS, D.E. & REISFEID, R.A. Disc electrophoresis in polyacrylamide gels: Extension to new condition of pH an buffer. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, **121**: 373-81, 1964.