

*Renata Pires Barbosa.*



***Investigações preliminares sobre as alterações  
sexo-dependentes da glicemia produzidas por  
Canatoxina em ratos.***

*Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo candidato Renata Pires  
Barbosa e aprovada pela comissão julgadora.*

*Glaci Ribeiro da Silva  
08/03/89*

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia  
da UNICAMP, para a obtenção do Título de Mestre  
em Ciências Biológicas. Área de Concentração:  
Fisiologia.

***Orientadora:***

***Glaci Ribeiro da Silva***  
Professor Assistente Doutor  
Departamento de Farmacologia  
F. C. M. - UNICAMP.

*+ Silva, Glaci Ribeiro da*

B234i

10488/BC

***Campinas - 1989.***

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

Tudo tem o seu tempo determinado, há tempo para  
todo propósito debaixo do céu:

...tempo de plantar...

Eclesiastes 3: 1 e 2.

...Um tributo ao meu pai, que foi um espelho de otimismo para mim.

...À minha querida mãe, pelo seu constante amor e companherismo.

...Aos meus irmãos, Heitor e Cely, Raquel e Marcos Henrique, Regina Otília, Fábio, pelo constante incentivo e apoio.

...Aos amados sobrinhos, Heitor José, Rodrigo, Ana Cecília, Ana Raquel e Gabriela, pelo grande carinho recebido.

AGRADECIMENTOS...

À Deus,

pela felicidade de ter chegado até aqui...

À Profa. Dra. GLACÍ RIBEIRO da SILVA, minha estimada orientadora, pelos conhecimentos adquiridos durante todo o período de trabalho e principalmente pelo entusiasmo com que se dedica à pesquisa com Canatoxina.

Ao Prof. Dr. AQUILES E. PIEDRABUENA, por sua "preciosa" orientação na parte estatística.

Ao Dr. JORGE FERNANDO VILARINO, "prá ti" meu companheiro de micro, por estar sempre apoiando, sugerindo e orientando na confecção deste trabalho e também pelo seu humor contagiante.

À Profa. Dra. GUN BIRGITTA B. MENDES, pela convivência e amizade durante estes anos, e agora, pelas sugestões e críticas na elaboração final da tese.

Ao Prof. Dr. ANTONIO CARLOS BOSCHERO, pelo comportamento sempre acessível mostrado durante o curso de pós-graduação e ainda pela avaliação deste trabalho.

À Profa. Dra. CÉLIA R. CARLINI, pela gentileza com que nos cedeu a Canatoxina, sem a qual seria impossível a realização deste trabalho.

Ao "best" amigo, EDSON ANTUNES, pela sua sempre presença durante este caminhar.

Aos colegas de laboratório de Toxinologia, CARLA BEATRIZ, DORA MARIA, IZILDA, JOAQUIM e MARCIA, pelo "dia a dia".

À TODOS do departamento de Farmacologia, pela ajuda, atenção e sobretudo pelos laços de uma grande amizade que nos uniu ao longo desses anos.

À Comissão de Informática da FCM, nas pessoas do ex-coordenador Dr. JOSÉ HUGO SABATINO e atual coordenador Dr. ANTONIO DE AZEVEDO BARROS FILHO, pelo acesso aos "softwares" e aos micros computadores.

À EUGENIA MARIA BASTOS e ANTONIO FIGUEREDO FILHO, pela sempre pronta colaboração no uso dos mesmos "softwares" e micro computadores, além da atenção dispensada para tirar toda e qualquer dúvida.

À sra. MARISABEL REGINA DO AMARAL e demais funcionárias da Biblioteca da FCM, pela atenção e amabilidade que sempre nos dedicaram.

À srta. VILMA PROIDE e demais funcionários do Setor de Áudio-Visual da FCM, pelo excelente trabalho realizado.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Fisiologia, pela atenção dispensada durante o cumprimento dos créditos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) agradeço a bolsa de mestrado concedida no período de 1985 a 1987.

À todas as pessoas, que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	I
INTRODUÇÃO.....	01
OBJETIVO.....	07
MATERIAIS e MÉTODOS.....	08
I - Animais e esquema de alimentação.....	08
II - Tratamento com canatoxina.....	08
III - Protocolo experimental.....	09
IV - Coleta de sangue.....	13
V - Dosagem de glicose sanguínea.....	13
VI - Drogas.....	13
VII - Apresentação dos resultados.....	14
VIII - Análise estatística.....	15
RESULTADOS.....	16
DISCUSSÃO.....	37
RESUMO.....	43
SUMMARY.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

## ABREVIATURAS

CNTX.....	Canatoxina.
Con A.....	Concanavalina A.
hCG.....	Gonadotrofina Coriônica humana.
im.....	Intramuscular.
ip.....	Intraperitonal.
NDGA.....	Ácido di-hidronorguaiarético.
DE <sub>2</sub> .....	Depo-17-beta Estradiol.
OQX.....	Orquiectomia.
O VX.....	Ovariectomia.
P.....	Progesterona.
PC.....	Punção Cardíaca.
sc.....	Subcutânea.
SNC.....	Sistema Nervoso Central.
T.....	Depo-Testosterona.

## INTRODUÇÃO

O efeito tóxico do extrato das sementes da leguminosa *Canavalia ensiformis*, popularmente chamada de "Feijão de Porco" (Pio-Correia, 1952), é conhecido desde o começo do século. Assmann, em 1911, relatou que o extrato bruto destas sementes, além de apresentar intensa atividade hemaglutinante, era letal para animais de experimentação. Posteriormente, em 1936, Sumner e Howell, atribuíram a toxicidade do extrato das sementes da *Canavalia ensiformis* à presença da lectina concanavalina A (Con A). Entretanto, em 1967, Olson e Liener levantaram a hipótese de que a toxicidade deste extrato não se devesse apenas a lectina Con A, desde que esta, obtida pelo método de Sumner e Howell, poderia estar ligada a alguns contaminantes protéicos.

Uma estreita associação entre toxicidade e presença de lectina têm sido constatadas em outras sementes, por exemplo: *Ricinus communis*, *Abrus precatorius* (Sharon e Lis, 1972), *Glicina max* (Liener e Pallansch, 1952; Sambeth et al., 1967) e *Phaseolus vulgaris* (Jaffé, 1960; Hamaguchi et al., 1977). Todavia, vários estudos têm dissociado as propriedades tóxicas encontradas nas sementes destas leguminosas da presença da lectina (Takahashi et al., 1962; Olsnes e Pihl, 1973; Olsnes et al., 1974; Stead et al., 1966; Lin et al., 1978).

Devido à diversidade das atividades biológicas do extrato da *Canavalia ensiformis*, Sharon e Lis (1972) afirmaram, ser pouco provável que estas se devam, apenas, à Con A. Investigando este fato, Carlini & Guimarães, em 1981, isolaram e caracterizaram uma proteína tóxica das sementes da *Canavalia ensiformis*, a canatoxina (CNTX), mostrando ser ela completamente distinta da Con A.

O peso molecular da CNTX quando determinado por gel filtração e na sua forma dimérica é de 115.000. A partir do extrato bruto a toxina é purificada por precipitação com etanol, seguida por fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia em DEAE-celulose e Sephadex G-100 (Carlini & Guimarães, 1981). Quando administrada a ratos e camundongos, seja por via intramuscular, intraperitoneal, endovenosa ou subcutânea, a CNTX promove convulsões tônico-clônicas precedidas por sinais de depressão e sedação ou sinais de excitação, piloereção e exoftalmia. Em camundongos é ainda observado o fenômeno de Straub. A convulsão é do tipo "tudo ou nada" e quando deflagrada leva os animais à morte. Sob este aspecto, o rato apresenta uma sensibilidade cinco vezes maior que o camundongo.

Carlini et al. (1984) descreveram que, em ratos, o tratamento agudo com doses subconvulsivantes de CNTX determinam redução da frequência cardíaca, enquanto que doses convulsivantes causam hipotermia, hipertensão, bradicardia, dificuldades respiratórias e, finalmente, convulsão e morte. Para estes autores, a convulsão tem

origem medular e pode ser modulado por drogas de ação central como Fenobarbital, Diazepam, Mefenesina, Espiroperidol, Haloperidol e Reserpina.

Na tentativa de elucidar um possível envolvimento do sistema nervoso central (SNC) no mecanismo de ação da CNTX, Carlini et al. (1982) investigaram o efeito desta toxina em plaquetas sanguíneas desde que Sneddon (1973) e Pletscher & Laubscher (1980), mostraram que a secreção plaquetária representa um modelo de estudo equivalente à secreção de neurotransmissores em sinaptossomas. Assim, estes autores verificaram que a CNTX em concentrações nanomolares no plasma de coelhos, foi capaz de estimular secreção e agregação das plaquetas. Estes efeitos são dose e tempo-dependente e envolvem a ação da fosfolipase  $A_2$  e a via da lipoxigenação do ácido araquidônico (Carlini et al., 1985).

Por outro lado, a CNTX em sinaptossomas de cérebro de rato, é capaz de induzir a secreção de serotonina e dopamina, sem causar danos às membranas das vesículas. Este efeito também se mostrou dose e tempo dependente e foi inibido pelo ácido dihidronorguaiarético (NDGA), droga esta que bloqueia a via da lipoxigenação do ácido araquidônico (Carlini & Guimarães, 1985; Barja-Fidalgo et al., 1988).

Recentemente, em nosso laboratório, tem sido demonstrado que a CNTX estimula também outras secreções tanto "in vitro" como "in vivo" e que este efeito é lipoxigenase-dependente. Resultados preliminares parecem mostrar que a CNTX induz secreção de histamina de mastócitos

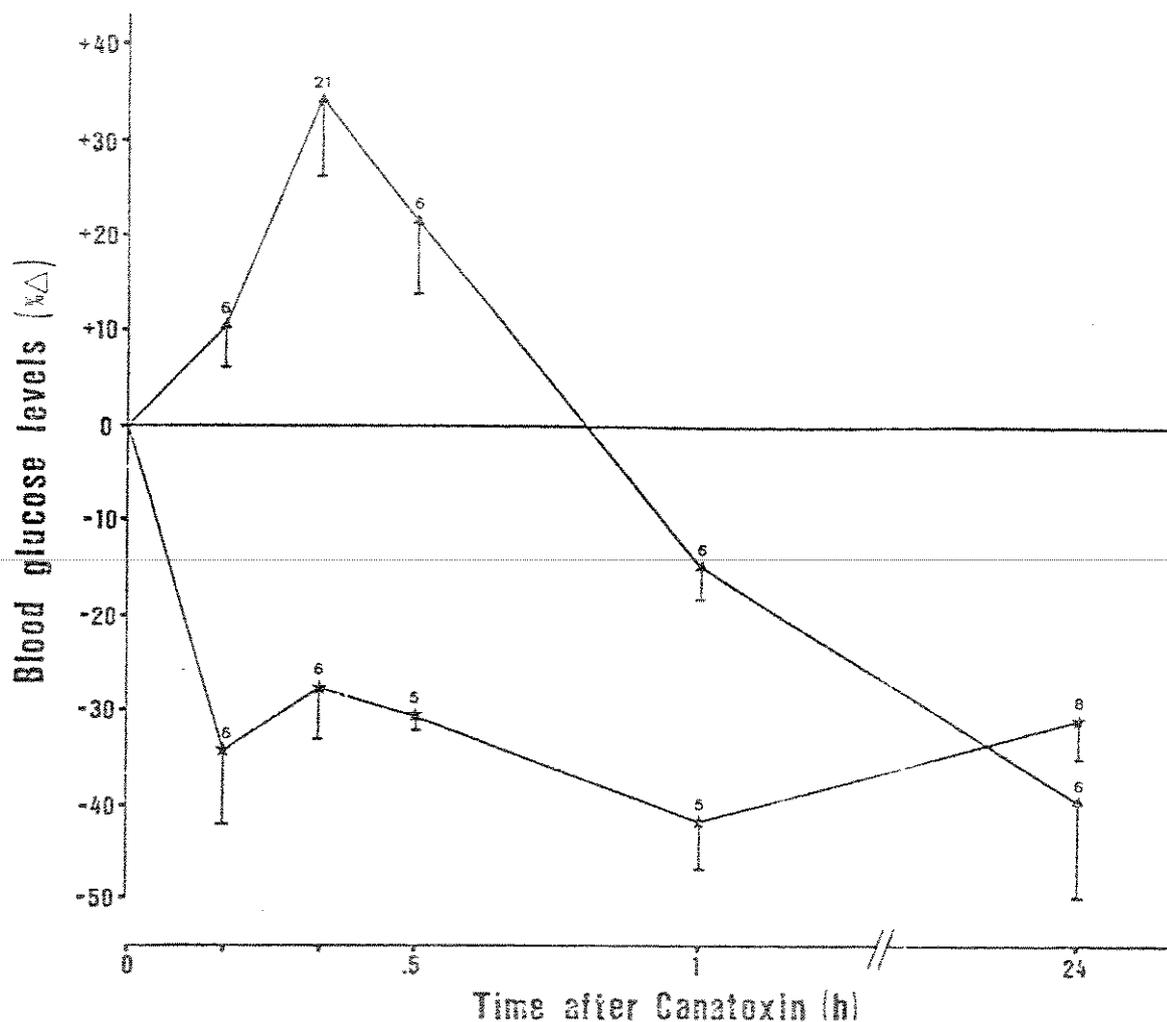
peritoneais de rato (Grassi & Ribeiro-DaSilva, 1988), bem como aumento nos níveis plasmáticos de insulina em ratos tratados agudamente com a toxina (Ribeiro-DaSilva & Prado, 1988). Foi ainda observado, por Ribeiro-DaSilva et al. (1989), que o tratamento crônico com CNTX altera os níveis circulantes das gonadotrofinas (hormônio folículo estimulante e hormônio luteinizante) e prolactina.

A capacidade da Con A, lectina presente nas sementes da *Canavalia ensiformis*, de interferir no metabolismo de carboidrato (Cuatrecasas, 1973 e Cuatrecasas & Tell, 1973) levantou a hipótese de que tal propriedade fosse também apresentada pela CNTX, visto que ambas estão presentes na mesma semente. Desta forma, Ribeiro-DaSilva, et al. (1986<sub>A</sub>), observaram que doses subconvulsivantes de CNTX, injetadas agudamente em ratos produziu alterações glicêmicas bifásicas; inicialmente, foi observado uma hiperglicemia efêmera (aproximadamente 20min), seguida por uma longa fase de hipoglicemia, superior a 24h. A hiperglicemia produzida por CNTX não é inibida por bloqueadores alfa ou beta-adrenérgicos mas drogas como diazepam e hexametônio a bloqueiam.

Como foi descrito anteriormente, dificuldades respiratórias precedem as convulsões produzidas pela toxina (Carlini & Guimarães, 1981). Sabendo-se que a CNTX ativa a via da lipoxigenase (Carlini et al., 1985), é bem possível que os leucotrienos estejam aumentados nos animais tratados com a toxina. Conforme observações de Hedqvist et al.,

(1982) e Samuelsson (1983) os leucotrienos LTC<sub>4</sub> e LTD<sub>4</sub> têm ação na musculatura lisa, promovendo principalmente constrição dos bronquíolos e de pequenos vasos pulmonares podendo ser assim, responsabilizados por um quadro de hipóxia. Em trabalho recente, Collares & Ribeiro-DaSilva (1988), mostraram que de fato a CNTX, em ratos, produz hipóxia lipoxigenase e ciclooxigenase dependentes.

A partir dos conhecimentos de que a hipóxia acarreta modificações no metabolismo de carboidratos e que fêmeas são menos sensíveis que machos à hipóxia (Smith et al., 1985; Britton & Kline, 1945), Ribeiro-DaSilva et al. (1986<sub>B</sub>) sugeriram que a hiperglicemia anteriormente descrita em ratos machos era consequência de um quadro primário de hipóxia. Por outro lado, foi verificado também que as alterações glicêmicas produzidas pelo tratamento agudo de ratos com CNTX eram sexo-dependentes, uma vez que as fêmeas apresentavam somente hipoglicemia. A Figura anexa, adaptada do trabalho de Ribeiro-DaSilva et al. (1986<sub>B</sub>), ilustra esta diferença sexual produzida pela toxina quando administrada agudamente a ratos.



A CNTX (50mU) foi injetada por via iv; os animais do grupo Controle receberam, ao invés da toxina, volumes equivalentes do seu solvente. A glicemia foi dosada em amostras de sangue obtidas por punção cardíaca. Os triângulos (▲) representam a percentagem média de variação da glicemia dos animais machos enquanto que as estrelas (★), a percentagem de variação das fêmeas, tendo sido considerado como 100% os valores dos respectivos grupos Controle. Os traços verticais correspondem ao erro padrão da média (SEM).

## OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo verificar se há correlação entre as alterações glicêmicas produzidas pela canatoxina em ratos e o estado hormonal do animal.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### I. Animais e esquema de alimentação:

Foram usados 201 ratos albinos, 89 machos e 112 fêmeas, da linhagem Wistar com aproximadamente 3 meses de idade, pesando em torno de 200 a 250g. Os animais, procedentes do Biotério Central da Unicamp, foram mantidos a temperatura ambiente e em turnos de 12 horas claro e 12 horas escuro, no biotério do Departamento de Farmacologia da UNICAMP. Com o objetivo de se evitar a competição alimentar e ter a certeza de que os animais estavam bem alimentados, estes foram isolados em gaiolas individuais, com água e alimentação "ad libitum", pelo menos 24h antes da experiência.

### II. Tratamento com canatoxina:

A atividade da canatoxina foi expressa em Unidades de  $DL_{50}$  (U). De acordo com Carlini & Guimarães (1981) uma unidade de  $DL_{50}$  de CNTX corresponde a quantidade de proteína que injetada pela via intra-peritoneal em camundongos produz a morte, em 24h, de 50% dos animais usados; também, segundo os mesmos autores, uma  $DL_{50}$  de CNTX corresponde a cerca de  $2.0 \pm 0.2$ mg de proteína ativa, por quilograma de peso do animal.

Como o rato é aproximadamente 5 vezes mais susceptível às convulsões induzidas por esta toxina do que os

camundongos 0.2U ou seja 200 miliunidades (mU) de canatoxina é a dose convulsivante para rato.

A dose de canatoxina usada neste trabalho foi de 50mU que corresponde aproximadamente a 0.1mg/kg de proteína ativa. Os animais que receberam a toxina pertencem aos grupos Tratado. Nos animais dos grupos Controle a toxina foi substituída por volumes equivalentes do seu solvente (Tris Cl - 25mM; NaCl - 150mM, pH = 7.5)

Para salientar a diferença já observada anteriormente entre machos e fêmeas, em relação às alterações nos níveis de glicose circulante em experimentos agudos (Ribeiro-DaSilva et al., 1986), a toxina foi administrada cronicamente aos animais por via subcutânea (sc), durante três dias num intervalo de 24h.

**III. Protocolo Experimental:** Os animais foram divididos em 6 grupos experimentais conforme esquema abaixo:

**III.1. MACHOS E FEMÊAS INTACTOS:**

O grupo foi formado de 80 animais intactos, que receberam somente o tratamento crônico de CNTX ou seu solvente, sendo: 48 machos e 32 fêmeas. Destes, 38 machos e 26 fêmeas foram mantidos como Controle.

**III.2. FÊMEAS PRENHES:**

O grupo foi constituído de 13 animais prenhes sendo que 5 foram mantidos como Controle. Para obtenção de fêmeas prenhes foi feito o acasalamento, precedido da análise da lavagem vaginal.

### III.2.1. Lavagem vaginal:

O ciclo estral das fêmeas foi acompanhado por análise microscópica da lavagem vaginal que era realizada diariamente em torno das 17h. Os estágios foram identificados de acordo com a técnica descrita por Hafez (1970).

### III.2.2. Acasalamento:

Fêmeas de ciclos regulares comprovados, foram colocadas, nas fases de proestro ou início de estro, em contacto com machos adultos, durante um período de 15h (das 17h de um dia às 8h do dia seguinte), mantendo-se uma proporção de duas fêmeas para cada macho. Após o acasalamento, realizou-se um novo esfregaço vaginal onde se buscava evidenciar a presença de espermatozóides; obtendo-se um teste positivo, considerava-se a fêmea no dia zero da prenhez. Nos dias 18, 19 e 20 da prenhez, os animais foram injetados com CNTX ou seu solvente.

### III.3. MACHOS E FÊMEAS GONAECTOMIZADOS:

O grupo foi formado de 53 animais castrados sendo: 20 orquiectomizados e 33 ovariectomizados. Destes foram mantidos como Controle 8 e 17 animais, respectivamente.

O tratamento com os animais castrados iniciou 21 dias após a cirurgia.

### III.3.1. Gonadectomia:

Os animais foram anestesiados com cloral hidratado, na dose de 350 mg/kg, pela via intraperitoneal (ip) e mantidos aquecidos sob lâmpada, 60 watts até o término do efeito anestésico, evitando, com isso, possível hipotermia decorrente da anestesia.

III.3.1.1 Orquiectomia (OQX): Através de uma incisão na parte inferior da bolsa escrotal, os testículos foram localizados e submetidos a exérese, após prévia ligadura dos canais deferentes e vasos sanguíneos. Em seguida, procedeu-se a sutura da ferida cirúrgica.

III.3.1.2 Ovariectomia (OVX): Os ovários foram localizados e extirpados, através de incisões dorsais a direita e a esquerda da coluna vertebral, cerca de 10mm abaixo da última costela. A seguir, procedeu-se o fechamento da parede por planos.

### III.4. MACHOS E FÊMEAS INTACTOS TRATADOS COM GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA (hCG):

O grupo foi constituído de 20 animais intactos pré-tratados com hCG, sendo: 10 machos e 10 fêmeas. Destes, foram mantidos como Controle 5 animais de cada sexo.

#### III.4.1. Tratamento hormonal:

Foi feito segundo o esquema utilizado por Reich et al. (1985). Os animais foram injetados com hCG,

40 UI/rato, a cada 24h, durante três dias seguidos pela via intramuscular (im). O tratamento com CNTX ou seu solvente iniciou-se seis horas após a administração de hCG.

### III.5. ANIMAIS CASTRADOS SUBMETIDOS À TERAPÊUTICA DE REPOSIÇÃO COM HORMÔNIOS ESTERÓIDES SEXUAIS:

O grupo foi formado de 23 animais gonadectomizados que receberam tratamento hormonal de substituição sendo: 11 machos e 12 fêmeas. Destes foram mantidos como Controle 5 e 6 animais, respectivamente. O tratamento dos animais iniciou-se 21 dias após a castração.

#### III.5.1 Esquema da terapia de reposição hormonal:

O esquema utilizado baseou-se naquele usado por Pomerantz et al. (1980), que consiste em injeções a cada 72h, por via im, com quatro doses de 0.5ml/kg de depo-testosterona (T-10mg/kg) ou depo-17-beta estradiol (OE<sub>2</sub>-10mcg/kg), às 15h. O tratamento, com canatoxina ou seu solvente, iniciou-se após o oitavo dia da suplementação com os respectivos esteróides gonadais.

### III.6. FÊMEAS INTACTAS PRÉ-TRATADAS COM TESTOSTERONA (T):

O grupo foi constituído de 12 fêmeas pré-tratadas com T, sendo que 6 foram mantidas como Controle.

#### III.6.1. Pré-tratamento hormonal:

Neste grupo, ratas intactas foram submetidas a um pré-tratamento com T empregando-se o mesmo esquema

de Pomerantz et al. (1980), citado acima. No oitavo dia após a primeira injeção de T iniciou-se a administração de CNTX ou seu solvente.

#### IV. Coleta de Sangue:

As amostras de sangue, para dosagem de glicose, foram obtidas por punção cardíaca (PC), 24h após a última administração de CNTX ou seu solvente. Para a PC os animais foram anestesiados por via ip com cloral hidratado (350mg/kg).

#### V. Dosagem de glicose sanguínea:

Os níveis de glicose sanguínea foram determinados pelo método de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944), e expressos em miligramas de glicose por 100ml de sangue (mg%).

#### VI. Drogas:

- Ácido Benzoico (Merck, Darmstadt, Germany)
- Ácido Sulfúrico (Merck, Darmstadt, Germany)
- Arseniato Dissódico.7H<sub>2</sub>O (Mallinckrodt Chemical Words, New York, USA)
- Bicarbonato de Sódio (Merck, Darmstadt, Germany)
- Canatoxina - foi cedida gentilmente pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Célia R. Carlini, do Departamento de Bioquímica do I.C.B. da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil

- Cipionato de Testosterona (Sanval, Rio de Janeiro, Brasil)
- Cloreto de Sódio (Merck, Darmstadt, Germany)
- Carbonato de Sódio (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil)
- 17-beta-Estradiol (Berlimed, São Paulo, Brasil)
- D (+) Glicose (monohidratada)
- Gonadotrofina Coriônica Humana de mulher grávida (Ceme, São Paulo, Brasil)
- Fenolftaleína (Baker Analyzed Reagent, São Paulo, Brasil)
- Heparina (Ceme, São Paulo, Brasil)
- Hidróxido de Bário (Carlo Erba, São Paulo, Brasil)
- Molibdato de Amônio (Berzog, New York, USA)
- Sal de Rochelle (Ecibra, Paraná, Brasil)
- Sulfato de Cobre.5H<sub>2</sub>O (Merck, Darmstadt, Germany)
- Sulfato de Sódio (Riedel-De Haen AG, Hannover, Germany)
- Sulfato de Zinco (Ecibra, Paraná, Brasil)
- Tris (hidroximetil) aminometano (Merck, Darmstadt, Germany)

## VII. Apresentação dos resultados

Os dados são expressos através da média da glicemia dos animais, mais ou menos o erro padrão da média (SEM). A glicemia foi expressa como miligrama por 100ml de sangue (mg%) e/ou como a percentagem de variação em relação ao grupo Controle, que foi considerado como 100%.

### VIII. Análise Estatística:

Os valores absolutos de glicemia foram analisados através do teste "t" de Student e os percentuais de variação, pelo teste "U" de MANN-WHITNEY. Em ambos, a hipótese alternativa foi definida como bicaudal e o nível de significância foi considerado como 5%.

## RESULTADOS

I. Efeito do tratamento crônico com CNTX sobre a concentração de glicose sanguínea em ratos machos e fêmeas intactos.

A administração crônica de doses subconvulsivantes de CNTX (50mU) em ratos, acentuou a variação sexo-dependente da glicemia, a que já se reportara anteriormente, Ribeiro-DaSilva et al. (1986<sub>K</sub>). Assim, enquanto a fêmea apresentava uma queda significativa de glicemia (-36.54%;  $P < 0.001$ ), no macho observou-se o fenômeno inverso, ou seja, os animais apresentavam hiperglicemia (+36.03%;  $P < 0.001$ ). Estes dados estão sumarizados na Figura 1.

A Figura 1A mostra os valores absolutos da glicemia em miligrama por 100ml de sangue (mg%) dos machos e fêmeas nos grupos Controle e Tratado. Na Figura 1B estão representados estes mesmos dados em percentual de variação.

No grupo Controle de machos intactos, a glicemia variou de 75.00 a 170.00 mg%, tendo a média se situado em 117.25 mg% com erro padrão de 3.36. Por outro lado, no grupo Tratado o menor valor glicêmico foi de 117.50 e o maior de 197.50 mg%, ficando a média em 159.50 mg% com erro padrão de 9.03. O percentual médio de variação do grupo Tratado em relação ao grupo Controle foi de  $36.03 \pm 7.70$ , sendo o valor mínimo 0.21 e máximo de 68.44%. A comparação estatística

entre o grupo Controle e Tratado, pelo Teste "t" de Student, teve como resultado:  $t=-5.2799$ ; G.L.=46;  $p<0.001$ .

No grupo Controle de fêmeas intactas, a glicemia variou de 125.00 a 250.00 mg%, tendo a média se situado em 159.62 mg% com erro padrão de 5.39. Por outro lado, no grupo Tratado o menor valor glicêmico foi de 90.00 e o maior de 125.00 mg%, ficando a média em 103.33 mg% com erro padrão de 5.29. O percentual médio de variação do grupo Tratado em relação ao grupo Controle foi de  $-36.54 \pm 3.24$ , sendo o valor mínimo -44.73 e máximo de -23.24%. A comparação estatística entre o grupo Controle e Tratado, pelo Teste "t" de Student, teve como resultado:  $t=4.8504$ ; G.L.=30;  $p<0.001$ .

A comparação dos percentuais de variação de machos intactos com fêmeas intactas foi analisada através do teste de "U" de Mann-Whitney e resultou:  $U=0$ ; diferença estatisticamente significativa, a nível de 1%.

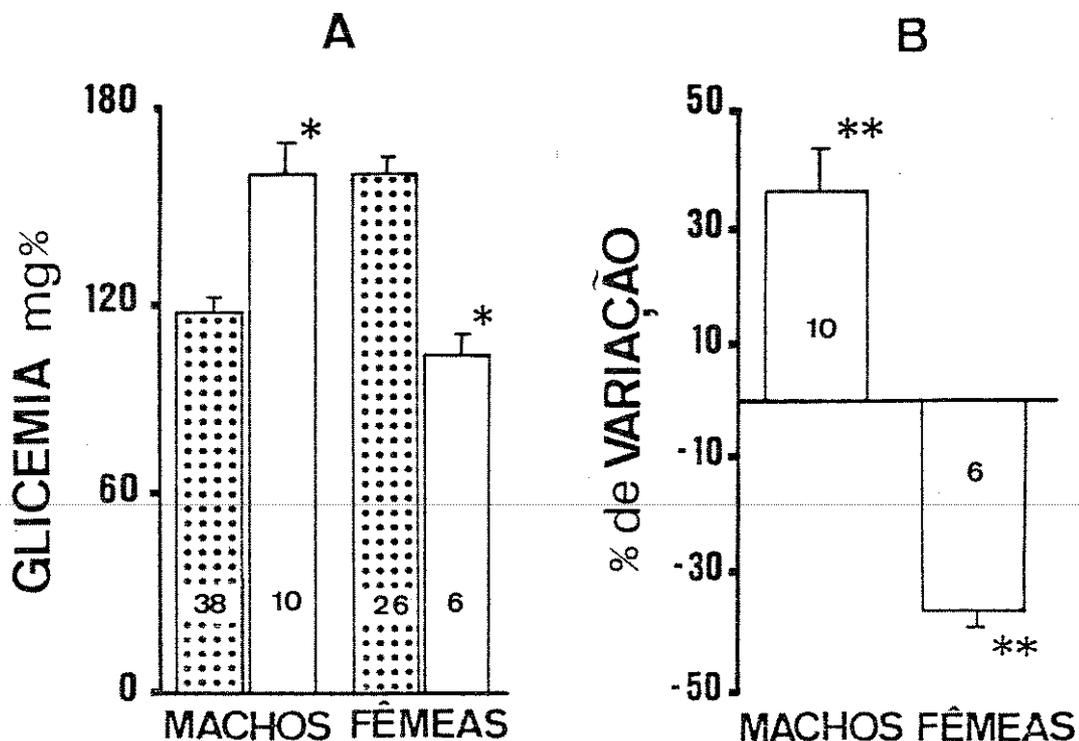


FIGURA 1 - EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM CNTX SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE SANGUÍNEA EM RATOS MACHOS E FÊMEAS INTACTOS - A CNTX (50mU) foi injetada por via sc, durante três dias, com intervalos de 24h; os animais dos grupos CONTROLE receberam ao invés da toxina, volumes equivalentes do seu solvente. A glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por PC, 24h após o último tratamento. Na fig.1-A estão representados os valores médios da glicemia em mg% de sangue, dos MACHOS e FÊMEAS dos grupos CONTROLE (■) e TRATADO (□). O coeficiente de variação dos mesmos pode ser visto na Fig 1-B.; tendo sido considerado como 100%, os valores dos respectivos grupos CONTROLE. Nas colunas as barras verticais correspondem ao SEM e os números, ao total de animais usados nos respectivos grupos.

\*  $p < 0.001$

\*\*  $p < 0.01$

## II. Influência da administração crônica de CNTX sobre os níveis de glicose circulante na rata prenhe.

Em contraste com a placenta humana que produz grandes quantidades de progesterona (P) e  $OE_{22}$ , a placenta do rato não produz  $OE_{22}$  (Sybulski, 1969; Townsend & Ryan, 1970) e secreta quantidades mínimas de P (Matt & Macdonald, 1984). No entretanto, a placenta do rato produz grandes quantidades de androstenediona e testosterona principalmente a partir do 12º da prenhez (Warshaw *et al.*, 1986; Gibori *et al.*, 1979).

Os dados mostraram que fêmeas prenhes tratadas cronicamente com CNTX (50mU) durante os três últimos dias da prenhez (dias 18, 19 e 20) tiveram, quando comparadas ao Controle e da mesma forma que os machos, um aumento nos níveis circulantes de glicose (+29.57%;  $P < 0.05$ ). Estes dados estão sumarizados na Figura 2.

No grupo Controle, a glicemia das fêmeas prenhes variou de 65.00 a 85.00 mg%, tendo a média se situado em 75.00 mg% com erro padrão de 4.19. Por outro lado, no grupo Tratado o menor valor glicêmico foi de 85.00 e o maior de 110.00 mg%, ficando a média em 97.18 mg% com erro padrão de 3.52.

O percentual médio de variação do grupo Tratado em relação ao grupo Controle foi de  $29.57 \pm 4.70$ , sendo o valor mínimo 13.33 e máximo de 46.66%.

A comparação estatística entre o grupo Controle e Tratado, pelo Teste "t" de Student, teve como resultado:  $t = -3.9969$ ; G.L.=11;  $p < 0.01$ .

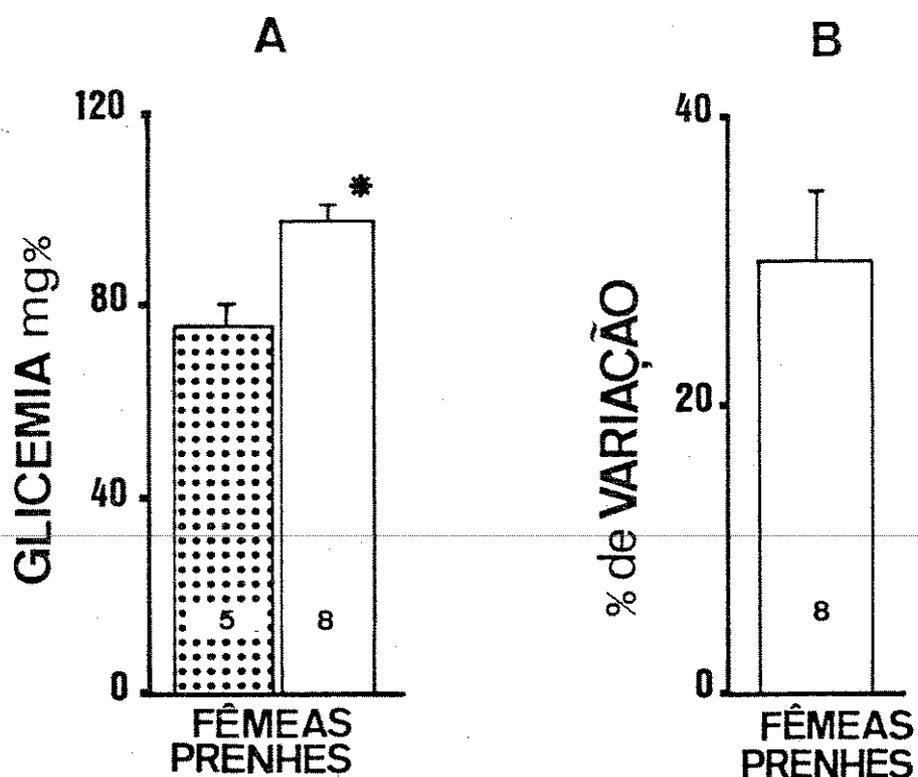


FIGURA 2 - INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE CNTX SOBRE OS NÍVEIS DE GLICOSE CIRCULANTE EM RATAS PRENHES - A CNTX (50mU) foi injetada por via sc, com intervalos de 24h durante os três últimos dias da prenhez (18<sup>o</sup>, 19<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> dia); os animais do grupo CONTROLE receberam ao invés da toxina, volumes equivalentes do seu solvente; a glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por PC, 24h após o último tratamento. Na fig.2-A estão representados os valores médios da glicemia em mg% de sangue, das FÊMEAS PRENHES no grupo CONTROLE (  $\blacksquare$  ) e TRATADO (  $\square$  ). O percentual de variação dos mesmos pode ser visto na Fig.2-B; tendo sido considerado como 100%, o valor do grupo CONTROLE. Em cada coluna podem ser vistos uma barra vertical e um número; a primeira corresponde ao SEM e o último, ao total de animais usados no respectivo grupo.

\* p < 0.01

III. Comparação das alterações glicêmicas produzidas pela administração crônica de CNTX em ratos machos, fêmeas e fêmeas prenhes.

A Figura 3 ilustra os diferentes efeitos produzidos pela administração crônica de CNTX sobre a glicemia de machos e fêmeas intactos e fêmeas prenhes.

A comparação, já observada, dos percentuais de variação entre machos intactos e fêmeas intactas através do teste de "U" de Mann-Whitney resultou:  $U=0$ ; diferença estatisticamente significativa, a nível de 1%.

A comparação dos percentuais de variação de fêmeas intactas com fêmeas prenhes através do teste de "U" de Mann-Whitney resultou:  $U=0$ ; diferença estatisticamente significativa, a nível de 1%.

A comparação dos percentuais de variação de machos intactos com fêmeas prenhes através do teste de "U" de Mann-Whitney resultou:  $U=34$ ; diferença estatisticamente não significativa.

Portanto, em relação ao tratamento crônico com a toxina, machos e fêmeas prenhes apresentaram uma mesma resposta glicêmica, tanto qualitativa como quantitativa, por outro lado, que fêmeas não prenhes, ou seja, intactas diferem estatisticamente dos machos intactos e das fêmeas prenhes, de uma forma tanto qualitativa como quantitativa.

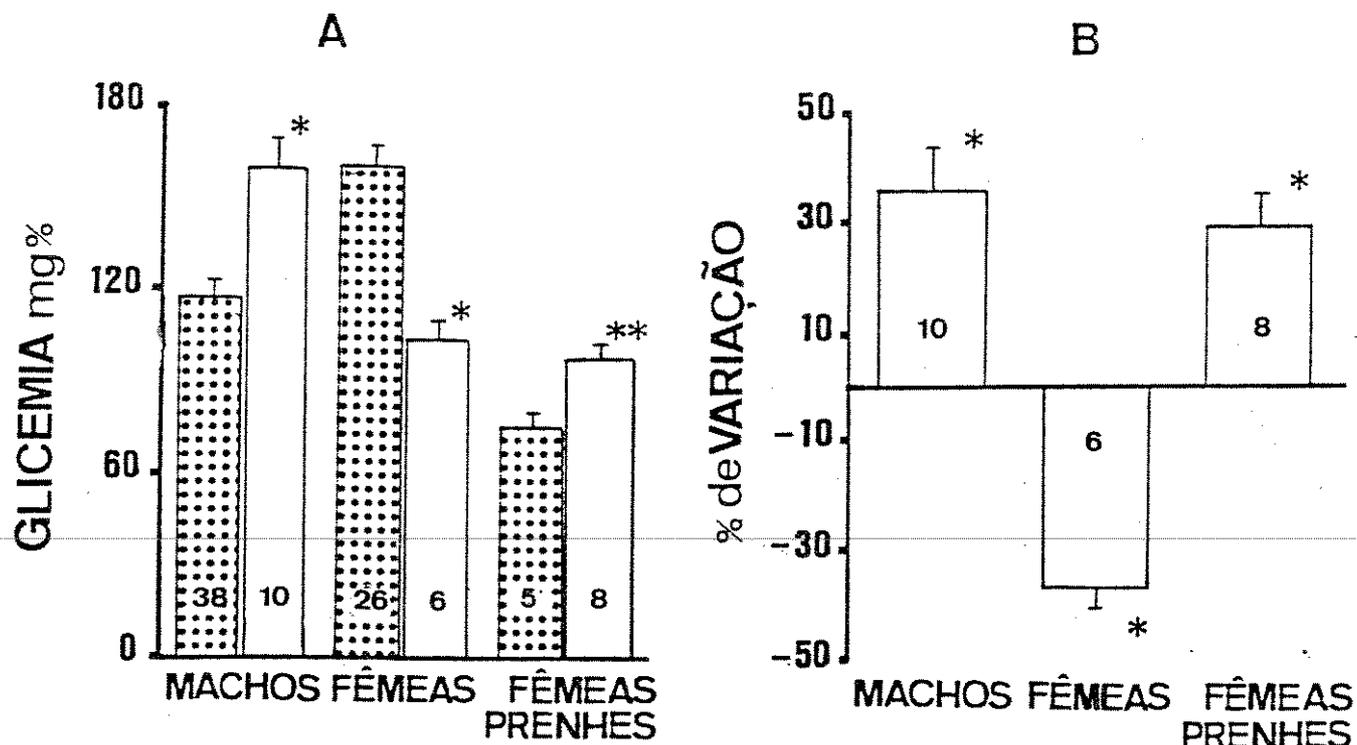


FIGURA 3 - COMPARAÇÃO DAS ALTERAÇÕES GLICÊMICAS PRODUZIDAS PELA CNTX EM RATOS FÊMEAS, FÊMEAS PRENHES E MACHOS - A CNTX (50mU) foi injetada por via sc, durante três dias, com intervalos de 24h entre as doses, as ratas prenhes receberam este tratamento nos dias 18, 19 e 20 da prenhez; os animais dos grupos CONTROLE, foram injetados com volumes equivalentes do solvente da toxina; a glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por PC, 24h após o último tratamento. Na fig.3-A estão representados os valores médios da glicemia em mg% de sangue, das FÊMEAS, FÊMEAS PRENHES e MACHOS nos grupos CONTROLE (■) e TRATADO (□). O coeficiente de variação dos mesmos pode ser visto na Fig.3-B; tendo sido considerado como 100%, os valores dos respectivos grupos CONTROLE. As barras verticais, em cada coluna, correspondem ao SEM de cada grupo; dentro das colunas estão representados o número de animais usados.

\* p < 0.001

\*\* p < 0.01

#### IV. Efeito da orquiectomia sobre a hiperglicemia produzida pelo tratamento crônico com CNTX em ratos.

Ratos orquiectomizados tratados cronicamente com CNTX, três semanas após a cirurgia, não apresentaram a alteração glicêmica observada anteriormente com animais intactos. Estes dados indicaram, portanto, que a castração inibia a hiperglicemia produzida pela toxina. Assim, enquanto o animal intacto, apresentava um aumento nos níveis glicêmicos (+36.03%;  $P < 0.001$ ), nos ratos castrados a glicemia não se alterava significativamente (+2.51%). Estes dados estão ilustrados na Figura 4.

No grupo Controle dos ratos orquiectomizados, a glicemia variou de 120.00 a 157.00 mg%, tendo a média se situado em 143.69 mg% com erro padrão de 4.85. Por outro lado, no grupo Tratado o menor valor glicêmico foi de 115.00 e o maior de 190.00 mg%, ficando a média em 147.29 mg% com erro padrão de 6.94. O percentual médio de variação do grupo Tratado em relação ao grupo Controle foi de  $2.51 \pm 4.83$ , sendo o valor mínimo -19.96 e máximo de 32.23%. A comparação estatística entre o grupo Controle e Tratado, pelo Teste "t" de Student, teve como resultado:  $t = -0.3829$ ; G.L. = 18.

A comparação dos percentuais de variação de machos intactos com machos gonadectomizados através do teste de "U" de Mann-Whitney resultou:  $U = 15$ ; diferença estatisticamente significativa, a nível de 1%.

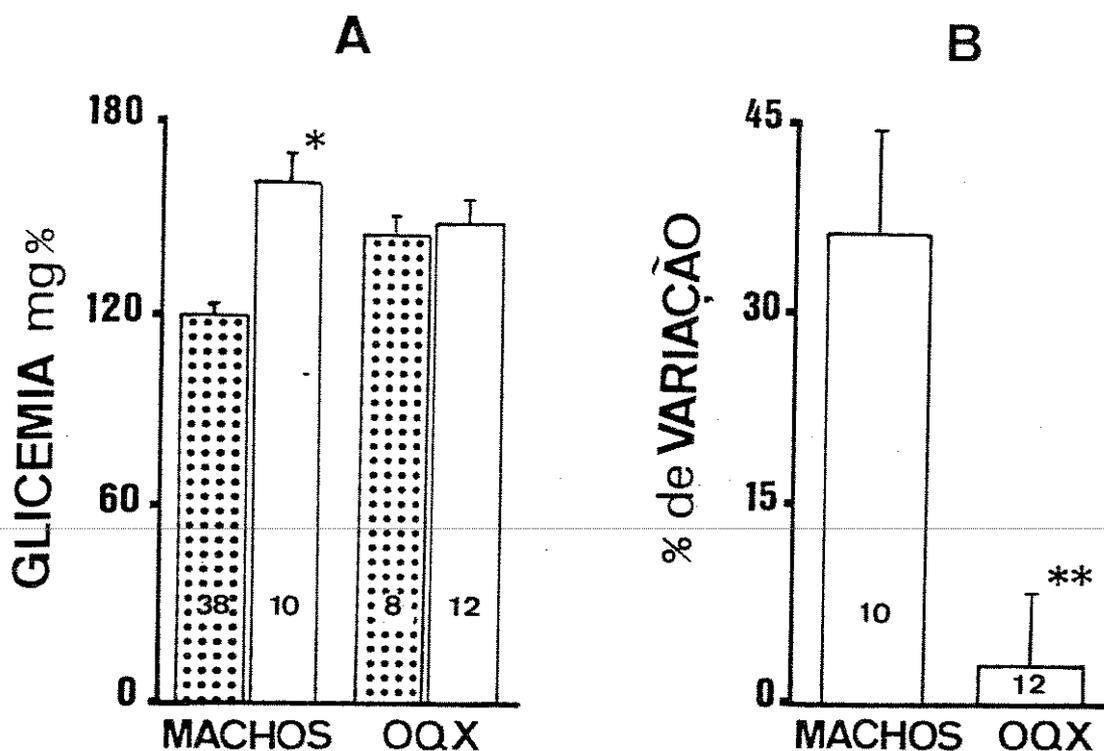


FIGURA 4 - EFEITO DA ORQUIECTOMIA SOBRE A HIPERGLICEMIA PRODUZIDA PELO TRATAMENTO CRÔNICO COM CNTX EM RATOS - Os animais castrados foram usados somente 21 dias após a cirurgia. A CNTX (50mU) foi injetada por via sc, durante três dias com intervalos de 24h entre as doses; os animais dos grupos CONTROLE receberam ao invés da toxina, volumes equivalentes do seu solvente; a glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por PC, 24h após o último tratamento. Na fig.4-A estão representados os valores médios da glicemia em mg% de sangue, dos MACHOS e MACHOS OQX nos grupos CONTROLE (■) e dos TRATADO (□). O coeficiente de variação dos mesmos pode ser visto na Fig.4-B; tendo sido considerado como 100%, os valores dos respectivos grupos CONTROLE. As barras verticais, em cada coluna, correspondem ao SEM de cada grupo; dentro das colunas estão representados o número de animais usados.

\* p < 0.001  
 \*\* p < 0.01

#### V. Efeito da ovariectomia sobre a hipoglicemia produzida pelo tratamento crônico com CNTX em ratos.

Ratas castradas que, três semanas após a cirurgia, foram tratadas cronicamente com CNTX, tiveram também a inibição da alteração glicêmica (hipoglicemia) anteriormente observada. Portanto, a castração também inibiu o efeito hipoglicêmico produzido pela CNTX em fêmeas. Assim, enquanto o animal intacto apresentava queda dos seus níveis glicêmicos com a toxina (-36.54%;  $P < 0.001$ ), nas ratas castradas a glicemia não se alterava significativamente (-9.45%). Estes resultados estão ilustrados na figura 5.

No grupo Controle das ratas ovariectomizadas, a glicemia variou de 120.00 a 200.00 mg%, tendo a média se situado em 161.91 mg% com erro padrão de 6.40. Por outro lado, no grupo Tratado o menor valor glicêmico foi de 120.00 e o maior de 180.00 mg%, ficando a média em 146.56 mg% com erro padrão de 4.21. O percentual médio de variação do grupo Tratado em relação ao grupo Controle foi de  $-9.48 \pm 2.60$ , sendo o valor mínimo -25.88 e máximo de 11.17%. A comparação estatística entre o grupo Controle e Tratado, pelo Teste "t" de Student, teve como resultado:  $t=1.9768$ ; G.L.=31.

A comparação dos percentuais de variação de fêmeas intactas com fêmeas gonadectomizadas através do teste de "U" de Mann-Whitney resultou:  $U=1$ ; diferença estatisticamente significativa, a nível de 1%.

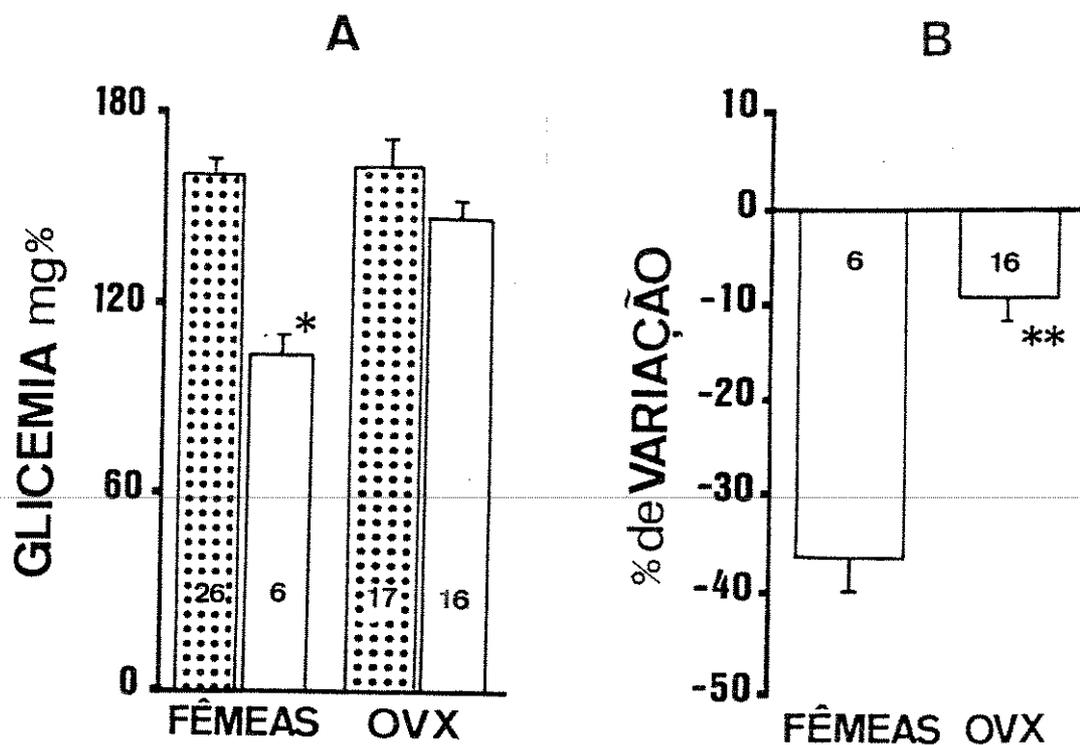


FIGURA 5 - EFEITO DA OVARIECTOMIA SOBRE A HIPOGLICEMIA PRODUZIDA PELO TRATAMENTO CRÔNICO COM CNTX EM RATAS - Os animais castrados foram usados somente 21 dias após a cirurgia. A CNTX (50mU) foi injetada por via sc, durante três dias, com intervalos de 24h entre as doses; os animais dos grupos CONTROLE receberam ao invés da toxina, volumes equivalentes do seu solvente; a glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por PC, 24h após o último tratamento. Na fig.5-A estão representados os valores médios da glicemia em mg% de sangue, das FÊMEAS e FÊMEAS OVX nos grupos CONTROLE (▣) e TRATADO (□). O coeficiente de variação dos mesmos pode ser visto na Fig.5-B; tendo sido considerado como 100%, os valores dos respectivos grupos CONTROLE. As barras verticais, em cada coluna, correspondem ao SEM de cada grupo; dentro das colunas estão representados o número de animais usados.

\* p < 0.001

\*\* p < 0.01

## VI. Influência da Gonadotrofina Coriônica sobre as alterações glicêmicas produzidas por CNTX em ratos machos e fêmeas.

De acordo com os resultados da Figura 4 e 5 a castração de machos e fêmeas inibiu completamente as alterações glicêmicas produzidas por CNTX. É classicamente sabido que a castração de animais libera o eixo hipotálamo-gonadal e aumenta os níveis circulantes de gonadotrofinas (Daughaday, 1985). Portanto, procuramos verificar se o tratamento com Gonadotrofina Coriônica influenciava as alterações glicêmicas produzidas pela toxina em machos e fêmeas. Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento de animais intactos com hCG inibiu tanto a hiperglicemia observada anteriormente com a toxina no macho, como também a hipoglicemia apresentada pelas fêmeas. Na Figura 6 estão representados os resultados obtidos com o macho (Machos Intactos=+36.03%; Machos Intactos+hCG=+7.81%;  $p < 0.001$ ) e na Figura 7, os dados obtidos com a fêmea (Fêmeas Intactas = -36.54%; Fêmeas Intactas+hCG=-14.37%;  $p < 0.001$ ).

No grupo Controle de machos intactos pré-tratados com hCG, a glicemia variou de 160.00 a 210.00 mg%, tendo a média se situado em 192.00 mg% com erro padrão de 9.28. Por outro lado, o grupo Tratado o menor valor glicêmico foi de 200.00 e o maior de 225.00 mg%, ficando a média em 207.00 mg% com erro padrão de 4.63. O percentual médio de variação do grupo Tratado em relação ao grupo Controle foi de  $7.81 \pm 2.41$ , sendo o valor mínimo 4.17 e máximo de 17.19%. A comparação

estatística entre o grupo Controle e Tratado, pelo Teste "t" de Student, teve como resultado:  $t=1.4434$ ; G.L.=8.

A comparação dos percentuais de variação de machos intactos com machos pré-tratados com hCG através do teste de "U" de Mann-Whitney resultou:  $U=6$ ; diferença estatisticamente significativa, a nível de 1% .

No grupo Controle de fêmeas intactas pré-tratadas com hCG, a glicemia variou de 135.00 a 180.00 mg%, tendo a média se situado em 160.00 mg% com erro padrão de 7.92. No grupo Tratado, o menor valor glicêmico foi de 125.00 e o maior de 157.50 mg%, ficando a média em 137.00 mg% com erro padrão de 5.90. O percentual médio de variação do grupo Tratado em relação ao grupo Controle foi de  $-14.37 \pm 3.68$ , sendo o valor mínimo -21.87 e máximo de -1.56% . A comparação estatística entre o grupo Controle e Tratado, pelo Teste "t" de Student, teve como resultado:  $t=2.3338$ ; G.L.=8.

A comparação dos percentuais de variação de fêmeas intactas com fêmeas pré-tratadas com hCG através do teste de "U" de Mann-Whitney resultou:  $U=0$ ; diferença estatisticamente significativa, a nível de 1% .

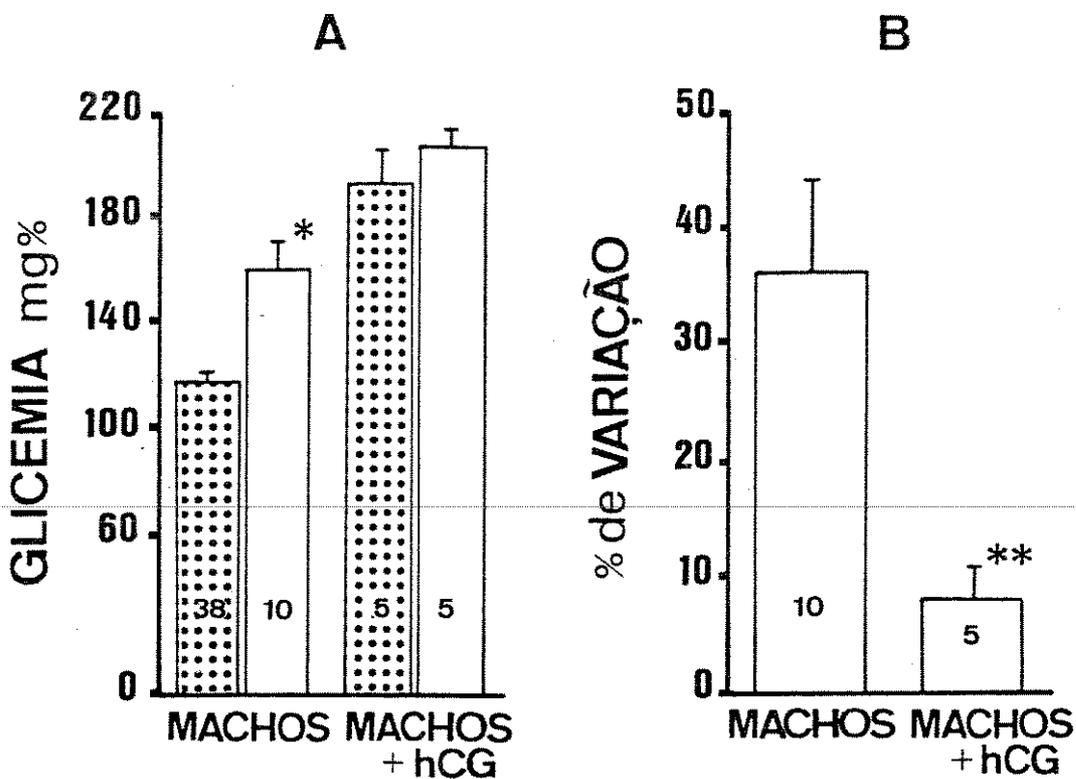


FIGURA 6 - INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM GONADOTROFINA CORIÔNICA SOBRE A HIPERGLICEMIA PRODUZIDA POR CNTX EM MACHOS INTACTOS - A hCG (40UI/kg) foi injetado por via im, a cada 24h, durante 3 dias seguidos; a toxina (50mU) foi administrada por via sc, 6h após o início do tratamento com hCG, no período de três dias, com intervalos de 24h entre as doses; os animais dos grupos CONTROLE receberam ao invés da toxina, volumes equivalentes do seu solvente. A glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por PC, 24h após a última injeção com CNTX ou seu solvente. Na fig.6-A estão representados os valores médios da glicemia em mg% de sangue, dos animais sem pré-tratamento (NENHUM) e dos pré-tratados com hCG (hCG) nos grupos CONTROLE (■) e TRATADO (□). O coeficiente de variação dos mesmos pode ser visto na Fig.6-B; tendo sido considerado como 100%, os valores dos respectivos grupos CONTROLE. Nas colunas as barras verticais correspondem ao SEM e os números, ao total de animais usados nos respectivos grupos.

\*  $p < 0.001$

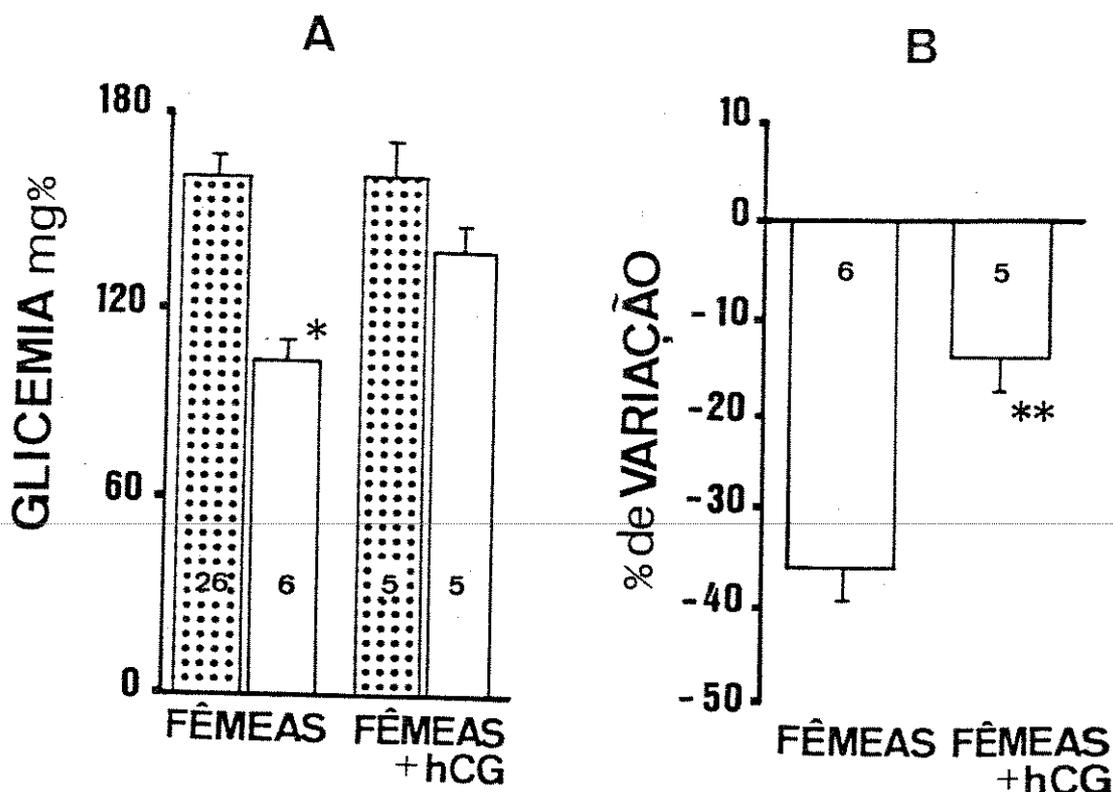


FIGURA 7 - INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM GONADOTROFINA CORIÔNICA SOBRE A HIPOGLICEMIA PRODUZIDA POR CNTX EM FÊMEAS INTACTAS - A hCG (40UI/kg) foi injetado por via im, a cada 24h, durante 3 dias seguidos. A CNTX (50mU) foi administrada por via sc, 6h após o início do tratamento com hCG, no período de três dias, com intervalos de 24h entre as doses; os animais dos grupos CONTROLE receberam ao invés da toxina, volumes equivalentes do seu solvente; a glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por PC, 24h após a última injeção com a toxina ou seu solvente. Na fig.7-A estão representados os valores médios da glicemia em mg% de sangue, dos animais sem pré-tratamento (NENHUM) e dos pré-tratados com hCG (hCG) nos grupos CONTROLE (■) e TRATADO (□). O coeficiente de variação dos mesmos pode ser visto na Fig.7-B; tendo sido considerado como 100%, os valores dos respectivos grupos CONTROLE. Nas colunas as barras verticais correspondem ao SEM e os números, ao total de animais usados nos respectivos grupos.

\*  $p < 0.001$

VII. Estudo do efeito da terapia de reposição com hormônios esteróides sexuais, sobre a inibição por castração das alterações glicêmicas produzidas por CNTX em ratos machos e fêmeas.

As Figuras 8 e 9 mostram o efeito da CNTX em machos e fêmeas castrados e tratados respectivamente, com depo-testosterona e depo-17-beta-Estradiol.

Como pode ser observado, a inibição pela castração das alterações glicêmicas produzidas por CNTX não se alterou, nas nossas condições pelo tratamento dos animais, tanto machos como fêmeas, com Testosterona ou Estradiol, respectivamente

No grupo Controle de machos orquiectomizados tratados com T, a glicemia variou de 135.00 a 172.50 mg%, tendo a média se situado em 156.00 mg% com erro padrão de 6.17. Por outro lado, no grupo Tratado, o menor valor glicêmico foi de 102.50 e o maior de 180.00 mg%, ficando a média em 140.00 mg% com erro padrão de 12.83. O percentual médio de variação do grupo Tratado em relação ao grupo Controle foi de  $-10.25 \pm 8.22$ , sendo o valor mínimo  $-34.29$  e máximo de  $15.38\%$ . A comparação estatística entre o grupo Controle e Tratado, pelo Teste "t" de Student, teve como resultado:  $t=1.0504$ , G.L.=9.

A comparação dos percentuais de variação de machos castrados com machos castrados tratados com T através do teste de "U" de Mann-Whitney resultou:  $U=21$ ; diferença estatisticamente não significativa.

No grupo Controle de fêmeas ovariectomizadas tratadas com DE<sub>2</sub>, a glicemia variou de 155.00 a 250.00 mg%, tendo a média se situado em 196.00 mg% com erro padrão de 15.79. Por outro lado, no grupo Tratado, o menor valor glicêmico foi de 150.00 e o maior de 220.00 mg%, ficando a média em 188.75 mg% com erro padrão de 11.06. O percentual médio de variação do grupo Tratado em relação ao grupo Controle foi de 3.97 ± 5.61, sendo o valor mínimo -23.46 e máximo de 11.86%. A comparação estatística entre o grupo Controle e Tratado, pelo Teste "t" de Student, teve como resultado: t=0.4105; G.L.=10.

A comparação dos percentuais de variação de fêmeas gonadectomizadas com fêmeas gonadectomizadas tratadas com DE<sub>2</sub> através do teste de "U" de Mann-Whitney resultou: U=37; diferença estatisticamente não significativa.

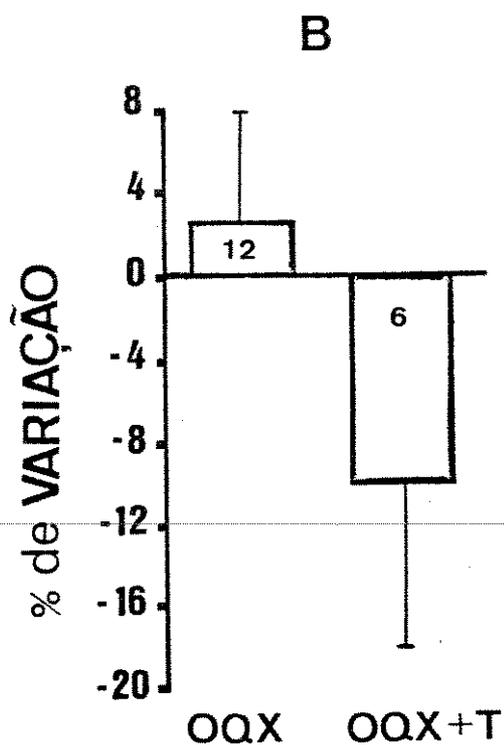


FIGURA 8 - ESTUDO DA TERAPIA DE REPOSIÇÃO COM DEPO-TESTOSTERONA SOBRE O EFEITO GLICÊMICO PRODUZIDO POR CNTX EM RATOS OQX - Os animais castrados foram usados somente 21 dias após a cirurgia; a T (10mg/kg) foi injetado pela via im, a cada 72h, em um período de 10 dias. A CNTX (50mU) foi administrada por via sc, nos últimos três dias do tratamento hormonal, com intervalos de 24h entre as doses; os animais dos grupos CONTROLE receberam ao invés da toxina, volumes equivalentes do seu solvente; a glicose foi dosada em amostras de sangue, obtidas por PC, 24h após a última injeção com toxina ou seu solvente. Nesta figura estão representados as médias das variações glicêmicas obtidas; considerando-se os valores dos respectivos grupos CONTROLE como 100%. As barras verticais, em cada coluna, correspondem ao SEM de cada grupo; dentro das colunas estão representados o número de animais usados.

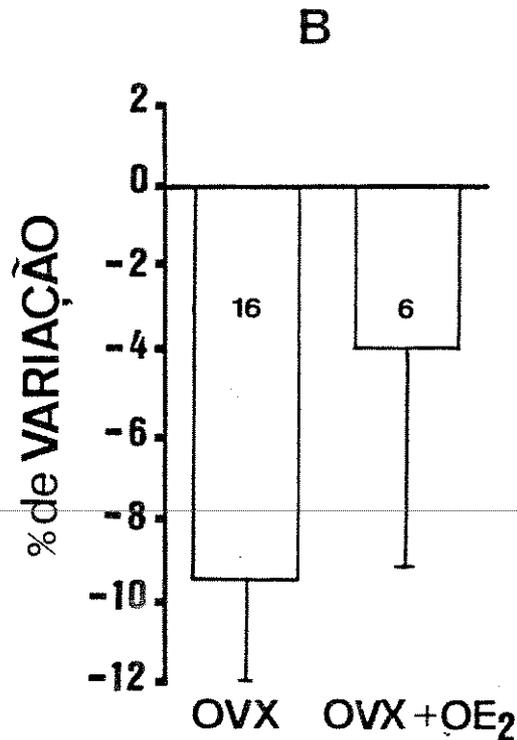


FIGURA 9 - ESTUDO DA TERAPIA DE REPOSIÇÃO COM DEPO-17-BETA-ESTRADIOL SOBRE O EFEITO GLICÊMICO PRODUZIDO POR CNTX EM RATAS OVX - Os animais castrados foram usados somente 21 dias após a cirurgia; o OE<sub>2</sub> (100mcg/kg) foi injetado por via im, a cada 72h, durante 10 dias. A CNTX (50mU) foi administrada por via sc, nos últimos três dias do tratamento hormonal, com intervalos de 24h entre as doses; os animais dos grupos CONTROLE receberam ao invés da toxina, volumes equivalentes do seu solvente; a glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por PC, 24h após a última injeção com a toxina ou seu solvente. Nesta figura estão representados as médias das variações glicêmicas obtidas; considerando-se os valores dos respectivos grupos CONTROLE como 100%. As barras verticais, em cada coluna, correspondem ao SEM de cada grupo; dentro das colunas estão representados o número de animais usados.

#### VIII. Efeito da administração crônica de CNTX à fêmeas intactas pré-tratadas com testosterona.

Como pode ser visto na Figura 10, o pré-tratamento com T bloqueou significativamente a hipoglicemia induzida por CNTX em ratas fêmeas intactas (Fêmeas Intactas=-36.54%, Fêmeas Intactas+T=-15.28%;  $p < 0.05$ ).

No grupo Controle, a glicemia de fêmeas intactas pré-tratadas com T variou de 127.50 a 202.00 mg%, tendo a média se situado em 171.17 mg% com erro padrão de 11.66. Por outro lado, no grupo Tratado, o menor valor glicêmico foi de 110.00 e o maior de 170.00 mg%, ficando a média em 145.00 mg% com erro padrão de 9.29. O percentual médio de variação do grupo Tratado em relação ao grupo Controle foi de  $-15.29 \pm 5.42$ , sendo o valor mínimo -35.74 e máximo de -0.68%. A comparação estatística entre o grupo Controle e Tratado, pelo Teste "t" de Student, teve como resultado:  $t=1.7604$ , G.L.=10.

A comparação dos percentuais de variação de fêmeas intactas com fêmeas intactas tratados com T através do teste de "U" de Mann-Whitney resultou:  $U=6$ ; diferença estatisticamente significativa, a nível de 5%.

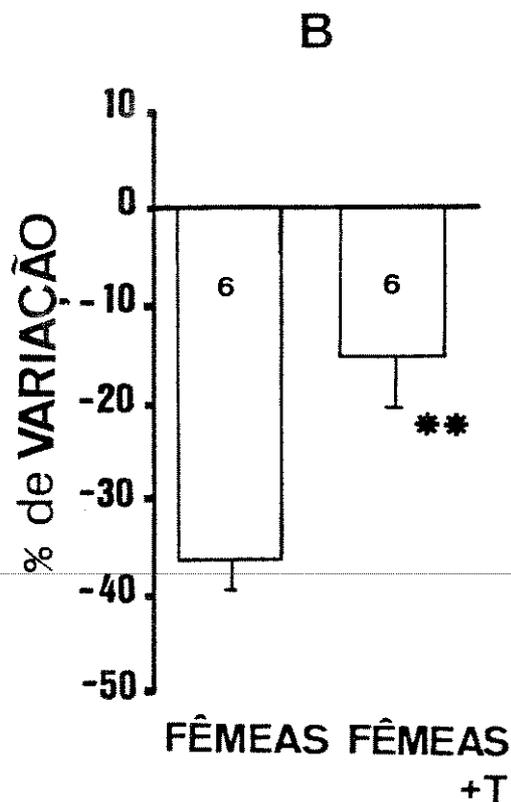


FIGURA 10 - EFEITO DO TRATAMENTO COM DEPO-TESTOSTERONA SOBRE A ALTERAÇÃO GLICÊMICA PRODUZIDA POR CNTX EM RATAS INTACTAS - A T (10mg/kg) foi injetado por via im, a cada 72h, durante 10 dias. A CNTX (50mU) foi administrada por via sc, nos últimos três dias do tratamento hormonal, com intervalos de 24h entre as doses; os animais dos grupos CONTROLE receberam ao invés da toxina, volumes equivalentes do seu solvente; a glicose foi dosada em amostras de sangue obtidas por PC, 24h após a última injeção com a toxina ou seu solvente. Nesta figura estão representados as médias das variações glicêmicas obtidas; considerando-se os valores dos respectivos grupos CONTROLE como 100%. As barras verticais, em cada coluna, correspondem ao SEM de cada grupo; dentro das colunas estão representados o número de animais usados. \* p < 0.05.

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos em nossos experimentos mostraram que, o tratamento crônico de ratos machos e fêmeas com CNTX, acentuou as alterações sexo-dependentes da glicose circulante anteriormente observadas com o tratamento agudo (Ribeiro-DaSilva et al., 1986<sub>R</sub>). Desse modo, houve uma alteração no modelo bifásico de glicemia no rato macho, passando os animais a apresentar somente a fase hiperglicêmica. Entretanto, nas fêmeas não houve modificação na resposta, observando-se a hipoglicemia já descrita no tratamento agudo.

Em trabalho recente Ribeiro-DaSilva et al. (1989) descreveram alterações nos níveis plasmáticos de gonadotrofinas e prolactina em ratos tratados com CNTX e sugeriram que esta toxina promove secreção de beta-endorfina.

A hiperglicemia induzida pela morfina, tem sido atribuída à liberação de catecolaminas da medula adrenal, através do SNC e seu efeito subsequente sobre o fígado (Feldberg & Shaligram, 1972). Entretanto, recentemente, Ipp et al. (1978; 1980) demonstraram que a morfina e a beta-endorfina são fortes estímulos para a secreção de glucagon e insulina, levantando-se a possibilidade da presença de receptores opióides nas ilhotas de Langerhans.

As concentrações de beta-endorfina do plasma e da hipófise anterior, em ratos de ambos os sexos, são significativamente reduzidas três semanas após a gonadectomia (Petraglia et al., 1982; Wardlaw et al., 1982; Sarkar & Yen, 1985). Nossos dados mostraram que as alterações da glicose sanguínea desapareceram completamente nos animais castrados tratados cronicamente com CNTX. Este fato, sugere fortemente que as alterações observadas nos níveis de glicose circulante poderiam ser um fenômeno relacionado com beta-endorfina. Além disso, de acordo com vários autores, os efeitos dos opióides endógenos podem também estar relacionados com a dose, com as fases do ciclo menstrual e com o sexo (Morley, 1981; Frohman, 1983). Por esta razão, isto poderia explicar a disparidade nos níveis de glicose sanguínea que nós obtivemos em ratos machos e fêmeas tratados com CNTX.

Recentemente, têm surgido evidências indicando o papel inibitório dos opióides endógenos na secreção de gonadotrofinas, principalmente do hormônio luteinizante (Meites et al., 1979). Entretanto, existe pouca informação acerca de uma possível função dos esteróides gonadais e das gonadotrofinas sobre estes opióides. Por outro lado, em mulheres com menopausa fisiológica ou cirúrgica tem sido descrito uma diminuição significativa nos níveis de beta-endorfina plasmática (Genazzani et al., 1981). Nossos resultados mostraram que as alterações glicêmicas induzidas pela CNTX foram inibidas, tanto em ratos machos como em

fêmeas tratadas com hCG. Se assumirmos que as alterações glicêmicas produzidas pela CNTX estão relacionadas com a beta-endorfina, poderíamos dizer que, provavelmente, os níveis aumentados de gonadotrofinas levariam também a uma inibição da secreção desses peptídeos endógenos.

Vários autores descreveram que os níveis plasmáticos de beta-endorfina e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) estão aumentados durante a prenhez e o parto (Csontos et al., 1979; Allen et al., 1973). Em ratos, a beta-endorfina e o ACTH são liberados simultaneamente da hipófise anterior para o sangue, em resposta a várias situações de estresse (Guillemin et al., 1977; Rossier et al., 1977; Holtt et al., 1978). Ratos tratados com CNTX são submetidos pelo menos a dois fatores estressantes, a hipoglicemia e a hipóxia. O córtex da adrenal responde ao estresse com uma secreção aumentada de glicocorticóides, o que vai promover gliconeogênese por ações hepáticas e periféricas. Além disso, é classicamente sabido que há uma diferença sexual na secreção de glicocorticóides, sendo a este respeito os machos mais sensíveis do que as fêmeas (Rose, 1985). A prenhez por si só, pode ser vista como um estresse adicional em ratos tratados com CNTX. Assim, um aumento de glicocorticóides poderia explicar a hiperglicemia induzida por CNTX tanto nos machos como nas ratas prenhes. Entretanto, uma secreção aumentada de glicocorticóides não justificaria os resultados que obtivemos, tanto com animais gonadectomizados como com ratos machos e fêmeas intactos

injetados com hCG. Por outro lado, a placenta de ratas produz grande quantidade de testosterona (Warshaw et al., 1986) e nossos resultados mostraram que os ratos machos e as fêmeas prenhes exibiram um modelo similar de alteração glicêmica. Assim, os dados parecem ser melhor explicados se assumirmos uma secreção aumentada de beta-endorfina nos ratos tratados com CNTX, como causa primária dessas alterações glicêmicas.

Numerosos pesquisadores têm mostrado uma clara ação hiperglicêmica das prostaglandinas em muitas espécies animais, incluindo ratos (Sacca et al., 1974; Bergstrom et al., 1966; Berti et al., 1965). Ao lado disso, a atividade da ciclooxigenase é maior em ratos machos do que em fêmeas (Morikawa et al., 1985; Duarte et al., 1986). A hipóxia e a hipoglicemia produzidas pela CNTX são ciclooxigenase e lipoxigenase dependentes (Collares & Ribeiro-DaSilva, 1988; Ribeiro-DaSilva & Prado, 1988). Além disso, a atividade da ciclooxigenase é diminuída pela orquiectomia mas é aumentada pela ovariectomia (Morikawa et al., 1985) enquanto nossos dados mostram que as alterações glicêmicas produzidas pela CNTX em ratos intactos são completamente abolidas após a gonadectomia, em ambos os sexos. Entretanto, a hiperglicemia produzida em ratos pelas prostaglandinas é inibida pelo pré-tratamento com fentolamina (Yatomi et al., 1987; Sacca et al., 1974) enquanto a hiperglicemia produzida pela CNTX não é inibida por bloqueadores adrenérgicos alfa ou beta (Ribeiro-DaSilva, 1986<sub>a</sub>).

Os esteróides gonadais podem influenciar intensamente a secreção das gonadotrofinas, de prolactina e do hormônio do crescimento (McCann, 1974; Reichlin, 1974) mas, até recentemente, pouco era sabido sobre a regulação hormonal de secreção de beta-endorfina. Entretanto, nos últimos anos, vários trabalhos foram publicados a este respeito. Assim, Petraglia et al. (1982), mostraram que ratos machos e fêmeas gonadectomizados, quando submetidos a uma terapia de reposição hormonal por um período de 14 dias, respectivamente com T (65mcg/rato/dia) ou OE<sub>22</sub> (10mcg/rato/dia) têm os níveis de beta-endorfina, que estavam reduzidos pela gonadectomia, restabelecidos. A influência de T e OE<sub>22</sub> sobre a secreção de beta-endorfina tem sido mostrado ultimamente também por outros autores como Wardlaw et al. (1982), Hahn & Fishman (1979), Barden et al. (1981), Sarkar & Yen (1985) e Mueller (1980). Nossos experimentos mostraram que a castração produziu uma acentuada inibição nas alterações glicêmicas produzidas pela CNTX, tanto em ratos machos como em fêmeas, que não foi porém revertida pelo tratamento com T ou OE<sub>22</sub>. Contudo, este fato pode estar relacionado com a dose e com o esquema de reposição hormonal que utilizamos e, não descartaria a nossa hipótese de uma possível ligação entre as alterações glicêmicas induzidas pela toxina e beta-endorfina. Por outro lado, testosterona inibe a hipoglicemia da fêmea intacta indicando que estas alterações glicêmicas dependem das condições hormonais dos animais. Este bloqueio da

hipoglicemia por testosterona na fêmea intacta poderia também explicar a hiperglicemia da fêmea prenhe, desde que a placenta deste animal secrete testosterona.

Concluimos, portanto, que as alterações glicêmicas que descrevemos neste trabalho dependem das condições hormonais do animal e parecem estar relacionadas com uma provável secreção de beta-endorfina.

## RESUMO

1. A administração crônica de CNTX (0.1mg/kg de proteína ativa) em ratos machos e fêmeas intactos induziu uma acentuada alteração, sexo-dependente, sobre os níveis de glicose sanguínea destes animais. Assim, enquanto os machos apresentavam hiperglicemia, as fêmeas mostravam hipoglicemia.
2. Ratas prenhes tratadas com CNTX apresentaram um aumento nos níveis circulantes de glicose comparável àquele observado em ratos machos.
3. As alterações nos níveis glicêmicos produzida pela CNTX foram bloqueadas tanto em machos como em fêmeas pela castração.
4. O pré-tratamento de ratos machos e fêmeas com gonadotrofina coriônica humana produziu uma acentuada inibição das alterações glicêmicas induzidas pela CNTX.
5. Em animais gonadectomizados, a reposição dos esteróides gonadais não reverteu a inibição das alterações glicêmicas produzidas pela CNTX, mas o pré-tratamento de ratas intactas com Testosterona bloqueou significativamente a hipoglicemia observada nestes animais.
6. É levantada a hipótese de um possível envolvimento de beta-endorfina nas alterações glicêmicas, sexo-dependentes, que observamos com a CNTX.

## SUMMARY

1. The chronic administration of canatoxin (0.1mg/kg of active protein) to intact male and female rats induced a pronounced sex-related dependent alteration upon the blood glucose levels of the animals. Thus, while the males exhibited hyperglycemia the females showed hypoglycemia.
2. A rise in the circulating glucose levels comparable to that seen in male rats was detected in canatoxin-treated pregnant rats.
3. The changes in blood glucose levels produced by canatoxin were blocked when male or female rats were castrated.
4. The pretreatment of intact male or female rats with human chorionic gonadotropin produced a marked inhibition of the previously observed canatoxin-induced blood glucose alterations.
5. Gonadal steroid replacement did not reverse the inhibition of canatoxin-induced blood glucose alterations produced by gonadectomy but the pretreatment of intact female rats with testosterone significantly blunted the canatoxin-induced hypoglycemia.
6. A possible involvement of beta-endorphin in the canatoxin-induced sex-related blood glucose alterations was discussed.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, J.P., Cook, D.M., Kendall, J.W., McGilvra, R. (1973). Maternal-fetal ACTH relationship in man. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 37: 230-234.
- Assmann, F. (1911). Beitrage zur kenntnis pflanzlicher agglutinine. Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere, 137: 489-510.
- Barden, N., Mérand, Y., Rouleau, D., Garon, M., Dupont, A. (1981). Changes in the beta-endorphin content of discrete hypothalamic nuclei during the estrous cycle of the rat. Brain Research, 204: 441-445.
- Barja-Fidalgo, C., Guimarães, J.A., Carlini C.R. (1988). The secretory effect of canatoxin on rat brain synaptosomes involves a lipoxigenase-mediated pathway. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 21: 549-552.
- Bergstrom, S., Carlson, L.A., Oro, L. (1966). Effect of different doses of prostaglandin E<sub>1</sub> on free fatty acids of plasma, blood glucose and heart rate in the nonanesthetized dog. Acta Physiologica Scandinavica, 67: 185-193.

Berti, F., Lentati, R., Usardi, M.M. (1965). La prostaglandina E<sub>1</sub> spiega attività iperglicemizzante. Bollettino della Società Italiana di Biologia Sperimentale, 41: 1327-1329.

Britton, S.W., Kline, R.F. (1945). Age, sex, carbohydrate adrenal cortex and other factors in anoxia. American Journal of Physiology, 145: 190-202.

Carlini, C.R., Gomes, C., Guimarães, J.A., Markus, R.P., Sato, H., Trolin, G. (1984). Central nervous effects of the convulsant protein Canatoxin. Acta Pharmacologica et Toxicologica, 54: 161-166.

Carlini, C.R., Guimarães, J.A. (1981). Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (Jack bean) seeds, distinct from Concanavalin A. Toxicon, 19: 667-675.

Carlini, C.R., Guimarães, J.A. (1985). Canatoxin induces cellular secretion: through activation of lipoxygenase pathway. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 57: 388-389.

Carlini, C.R., Guimarães, J.A., Ribeiro, J.M.C. (1985). Platelet release reaction and aggregation induced by Canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of the platelet lipoxygenase pathway. British Journal of Pharmacology, 84: 551-560.

Carlini, C.R., Ribeiro, J.M.C., Guimarães, J.A. (1982). Structure-activity relationships of canatoxin effects on platelet aggregation. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 54: 762-763.

~~Collares, C.B., Ribeiro-DaSilva, G. (1988). Involvement of lipoxygenase and cyclo-oxygenase pathways in hypoxia and metabolic alkalosis produced by canatoxin in rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 21: 107-110.~~

Csontos, K., Rust, M., Holtt, V., Mahr, W., Kromer, W., Teschemacher, H.J. (1979). Elevated plasma beta-endorphin levels in pregnant women and their neonates. Life Sciences, 25: 835-844.

Cuatrecasas, P. (1973). Interaction of the concanavalin A and wheat germ agglutinin with the insulin receptor of fat cells and liver. The Journal of Biological Chemistry, 248: 3528-3534.

Cuatrecasas, P., Tell, G.P.E. (1973) Insulin-like activity of concanavalin A and wheat germ agglutinin - Direct interactions with insulin receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 70: 485-489.

Daughaday, W.H. (1985). The anterior pituitary. In: Wilson, J.D. and Foster, D.W. (Editors), Williams Textbook of Endocrinology. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 568-613.

Duarte, A.P.T., Ramwell, P., Myers, A. (1986). Sex differences in mouse platelet aggregation. Thrombosis Research, 43: 33-39.

Feldberg, W., Shaligram, S.V. (1972). The hyperglycaemic effect of morphine. British Journal of Pharmacology, 46: 602-618.

Frohman, L.A. (1983). Glucoregulation. In: Krieger, D.T., Brownstein, M.J., Martin, J.B. (Editors), Brain Peptides. John Wiley & Sons, New York, 281-299.

Genazzani, A.R., Facchinetti, F., Ricci-Danero, M.G., Parrini, D., Petraglia, F., LaRosa, R., D'Antona, N. (1981). Beta-lipotropin and beta-endorphin in physiological and surgical menopause. Journal of Endocrinology and Investigation, 4: 375-340.

- Gibori, G., Chatterton Jr., R.T., Chien, J.L. (1979). Ovarian and serum concentrations of androgen throughout pregnancy in the rat. Biology of Reproduction, 21: 53-56.
- Grassi, D.M., Ribeiro-DaSilva, G. (1988). Estudo da secreção de histamina produzida no rato por canatoxina. Anais do VI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, São Paulo, 29 de junho - 3 de julho, pp 214.
- Guillemin, R., Vargo, T., Rossier, J., Minick, S., Ling, N., Rivier, C., Vale, W., Bloom, F. (1977). Beta-endorphin and adrenocorticotropin are secreted concomitantly by the pituitary gland. Science, 197: 1367-1369.
- Hafez, E.S.E. (1970). Sexual cycles. In: Hafez, E.S.E. (Editor), Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. Lea and Febiger, Philadelphia, 107-122.
- Hahn, E.F., Fishman, J. (1979). Changes in rat brain opiate receptor content upon castration and testosterone replacement. Biochemical and Biophysical Research Communications, 90: 819-823.

Hamaguchi, Y., Yagi, N., Nishino, A., Mochizuki, T., Mizukami, T., Miyoshi, M. (1977). The isolation and characterization of a lethal protein from kintoki beans (*Phaseolus vulgaris*). Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 23: 525-534.

Hedqvist, P., Dahlén, S.E., Bjork, J. (1982). Pulmonary and vascular actions of leukotrienes. In: Samuelsson, B., Paoletti, R. (Editors), Leukotrienes and other lipoxygenase products. Raven Press, New York, pp. 187-200.

Hollt, V., Przewlocki, R., Herz, A. (1978). Radioimmunoassay of beta-endorphin basal and stimulated levels in extrated rat plasma. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 303: 171-174.

Ipp, E., Dobbs, R., Unger, R.H. (1978). Morphine and beta-endorphin influence the secretion of the endocrine pancreas. Nature, 276: 190-191.

Ipp, E., Schusdziarra, V., Harris, V., Unger, R.H. (1980). Morphine-induced hyperglycemia: Role of insulin and glucagon. Endocrinology, 107: 461-463.

Jaffé, W.G. (1960) Ueber Phytotoxine aus Bohnen (*Phaseolus vulgaris*). Arzneimittel-Forschung, 12: 1012-1017.

- Liener, I.E., Pallansch, M.J. (1952). Purification of a toxic substance from defatted soy bean flour. The Journal of Biological Chemistry, 197: 29-36.
- Lin, J.Y., Hou, M.J., Chen, Y.C. (1978). Isolation of toxic and non-toxic lectins from the bitter pear melon *Momordica charantia* linn. Toxicon, 16: 653-660.
- Matt, D.W., Macdonald, G.J. (1984). In vitro progesterone and testosterone production by the rat placenta during pregnancy. Endocrinology, 115: 741-747.
- McCann, S.M. (1974). Endocrinology. In: Greep, R.O. and Astwood, E.B. (Editors), Handbook of Physiology. Williams and Wilkins, Baltimore, pp 711-731.
- Meites, J., Bruni, J.F., Vugt, D.A.V., Smith, A.F. (1979). Relation of endogenous opioid peptides and morphine to neuroendocrine functions. Life Sciences, 24: 1325-1336.
- Morikawa, M., Kojima, T., Inoue, M., Tsuboi, M. (1985). Sex difference in the effect of aspirin on rat platelet aggregation and arachidonic acid metabolism. Japanese Journal of Pharmacology, 37: 317- 323.

Morley, J.E. (1981). The endocrinology of the opiates and opioid peptides. Metabolism, 30: 195-209.

Mueller, G.P. (1980). Attenuated pituitary beta-endorphin release in estrogen-treated rats. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 165: 75-81.

Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. Journal of Biological Chemistry, 153: 375-380.

Olsnes, S., Pihl, A. (1973). Isolation and properties of abrin: a toxic protein inhibiting protein synthesis. European Journal of Biochemistry, 35: 179-185.

Olsnes, S., Refsnes, K., Pihl, A. (1974). Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. Nature, 249: 627-631.

Olson, M.O.J., Liener, I.E. (1967). Some physical and chemical properties of concanavalin A, the phytohemagglutinin of the jack bean. Biochemistry, 6: 105-111.

- Petraglia, F., Penalva, A., Locatelli, V., Cocchi, D., Panerai, A.E., Genezzani, A.R., Müller, E.E. (1982). Effect of gonadectomy and gonadal steroid replacement on pituitary and plasma beta-endorphin levels in the rat. Endocrinology, 111: 1224-1229.
- Pio-Correia, M. (1952). In: Dicionário das plantas úteis do Brasil. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, 98.
- Pletscher, A., Laubscher, A. (1980). Use and limitations of platelets as models for neurones: amino release and shape change reaction. In: Rotman, A., Meyer, F.A., Gilter, C., Silberberg, A. (Editors), Platelets: Cellular response mechanisms and their biological significance. John Wiley and Sons, New York, 267-276.
- Pomerantz, K., Maddox, Y., Maggi, F., Ramey, E., Ramwell, P. (1980). Sex and hormonal modification of 6-keto-PGF<sub>1- $\alpha$</sub>  release by rat aorta. Life Sciences, 27: 1233-1236.
- Reich, R., Kohen, F., Slager, R., Tsafriri, A. (1985). Ovarian lipoxygenase activity and its regulation by gonadotropin in the rat. Prostaglandins, 30: 581-590.
- Reichlin, S. (1974). Endocrinology. In: Greep, R.O. and Astwood, E.B. (Editors), Handbook of Physiology. Williams and Wilkins, Baltimore, pp 405-432.

Ribeiro-DaSilva, G., Carlini, C.R., Pires-Barbosa, R.,  
Guimarães, J.A., (1986<sub>A</sub>). Blood glucose alterations  
induced in rats by Canatoxin, a protein isolated from  
Jack bean (*Canavalia ensiformis*) seeds. Toxicon, 24: 775-  
782.

Ribeiro-DaSilva, G., Pires-Barbosa, R., Carlini, C.R.  
(1989). Changes produced by canatoxin in the circulating  
levels of gonadotropins and prolactin in rats - A  
preliminary study. Brazilian Journal of Medical and  
Biological Research, 21 in press.

Ribeiro-DaSilva, G., Prado, J.F. (1988). Hypoglycemia and  
lipoxygenase-dependent insulin secretion produced by  
canatoxin in rats. Annales XVI Congreso de la Asociacion  
Latinoamericana de Ciências Fisiologicas, Buenos Aires,  
May 16<sup>th</sup>. - 20<sup>th</sup>, pp 81.

Ribeiro-DaSilva, G., Prado, J.F., Pires-Barbosa, R.,  
Collares, C.B., Zappellini, A., Grassi, D.M. (1986<sub>B</sub>).  
Some evidences suggesting that canatoxin induces hypoxia  
in rats with involvement of the lipoxygenase pathway.  
Resumos do XI Congreso de la Asociacion Latinoamericana  
de Farmacologia, Buenos Aires, November 24<sup>th</sup> - 29<sup>th</sup>, pp  
34.

- Rose, R.M. (1985). Psychoendocrinology. In: Wilson, J.D. and Foster, D.W. (Editors), Williams Textbook of Endocrinology. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 653-681.
- Rossier, J., French, E.D., Rivier, C., Ling, N., Guillemin, R., Bloom, F.E. (1977). Foot-shock induced stress increases beta-endorphin levels in blood but not brain. Nature, 270: 618-620.
- Sacca, L., Perez, G., Rengo, F., Condorelli, M. (1974). Effects of different prostaglandins on glucose kinetics in the rat. Diabetes, 23: 532-535.
- Sambeth, W., Nesheim, M.C., Serafin, J.A. (1967). Separation of soybean whey into fractions with different biological activities for chicks and rats. Journal Nutrition, 92: 479-490.
- Samuelsson, B. (1982). The leukotrienes, an introduction. In: Samuelsson, B. and Paoletti, R. (Editors), Leukotrienes and other lipoxygenase products. Raven Press, New York, pp 1-17.
- Sarkar, D.K., Yen, S.S.C. (1985). Changes in beta-endorphin-like immunoreactivity in pituitary portal blood during the estrous cycle and after ovariectomy in rats. Endocrinology, 116: 2075-2079.

- Sharon, N., Lis, H. (1972). Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. Science, 177: 949-959.
- Smith, T.C., Gross, J.B., Wollman, H. (1985). The therapeutic gases, oxygen, carbon dioxide, helium and water vapor. In: Gilman, A.G., Goodman, L.S., Murad, F. (Editors), The Pharmacological Basis of Therapeutics. Macmillan Publishing Co., New York, 322-338.
- Sneddon, J.M. (1973). Blood platelets as a model for monoamine-containing neurons. In: Kerkut, G.A. & Phillis, J.W. (Editors), Progress in Neurobiology. Pergamon Press, Oxford, 151-198.
- Stead, R.H., Muelenaere, H.J.H., Quicke, G.V. (1966). Trypsin inhibition, hemagglutination, and intraperitoneal toxicity in extracts of *Phaseolus vulgaris* and *Glycine max*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 113: 703-708.
- Sumner, J.B., Howell, S.F. (1936). Identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. Journal of Bacteriology, 32: 227-237.
- Sybulski, S. (1969). Testosterone metabolism by rat placenta. Steroids, 14: 427-440.

Takahashi, T., Funatsu, G., Funatsu, M. (1962). Biochemical studies on castor bean hemagglutinin. II - Hemagglutinin separated from crystalline ricin and its molecular weight. The Journal of Biochemistry, 52: 50-53.

Townsend, L., Ryan, K.J. (1970). In vitro metabolism of pregnenolone-7  $\alpha$ - $^3$ H, progesterone-4- $^{14}$ C and androstenedione-4- $^{14}$ C by rat placental tissue. Endocrinology, 87: 151-155.

Wardlaw, S.L., Wehrenberg, W.B., Ferin, M., Antunes, J.L., Frantz, A.G. (1982). Effect of sex steroids on beta-endorphin in hypophyseal portal blood. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 55: 877-881.

Warshaw, M.L., Johnson, D.C., Khan, I., Eckstein, B., Gibori, G. (1986). Placental secretion of androgens in the rat. Endocrinology, 119: 2642-2648.

Yatomi, A., Iguchi, A., Yanagisawa, S., Matsunaga, H., Niki, I., Sakamoto, N. (1987). Prostaglandins affect the central nervous system to produce hyperglycemia in rats. Endocrinology, 121: 36-41.