

MARIA CECÍLIA FERRAZ DE ARRUDA VEIGA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UM PEPTÍDIO DE GLÂNDULAS SUBMANDIBULARES DE CAMUNDONGOS MACHOS COM ATIVIDADE TÓXICA RENAL.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Mestre em Biologia na área de Fisiologia e Biofísica.

CAMPINAS

São Paulo - Brasil

- 1979 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AOS MEUS PAIS,

por seus esforços, sacrifícios e dedicação

AO MEU ESPOSO

pelo carinho e apoio

dedico este trabalho.

Agradecemos,

- Ao Professor Doutor ANTONIO CELSO RAMALHO, companheiro em todos os momentos, por nos ter dado a oportunidade de ingressar na pós-graduação, pela amizade com que nos acolheu, pela compreensão e estímulo que muito nos auxiliaram durante a realização deste trabalho.
- Ao Professor Doutor ERNESTO JOSÉ DOTTAVIANO, pelo apoio e confiança que nos dedicou, pelos valiosos ensinamentos que muito contribuíram para nossa formação.
- Ao Professor Doutor DÉCIO TEIXEIRA, por ter nos guiado nos primeiros passos de pesquisa.
- Ao Professor Doutor NORAIR SALVIANO DOS REIS, pelas valiosas sugestões e pelas fotografias que ilustram este trabalho.
- Ao Professor Doutor MARIO ROBERTO VIZIOLI pelo gentil atendimento e colaboração na interpretação histológica.

- Ao Professor Doutor CARLOS EDUARDO NEGREIROS DE PAIVA, chefe do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Estadual de Campinas e demais docentes deste Departamento, pelos conhecimentos auferidos.
- À Srta. IVETE DE JESUS ROQUE, pela contribuição na técnica histológica.
- À Srta. MARIA ELIDIA DOS SANTOS, pela dedicação e prestação dos serviços datilográficos.
- Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica, pela dedicação.
- A todos aqueles que por gestos, ações ou palavras nos deram alguma coisa de si.

Agradecemos a bolsa recebida da Coordenação do
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que
possibilitou a realização do presente trabalho.

Í N D I C E

INTRODUÇÃO	02
MATERIAL E MÉTODOS	16
RESULTADOS	21
DISCUSSÃO	36
RESUMO E CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

As glândulas salivares tem sido exaustivamente estudadas sob os mais variados aspectos biológicos. A maior parte destes estudos dizem respeito à própria atividade glandular, ou seja, à secreção salivar. Contudo, outras atividades destas glândulas têm recebido a atenção de inúmeros pesquisadores.

Tem sido proposto que as glândulas salivares interferem na atividade metabólica de diversos órgãos, como também possuem interações endócrinas.

A existência de diversos fatores com atividade biológica, isolados dessas glândulas, está amplamente confirmada e extensamente descrita na literatura.

Desde o século passado já se tentava relacionar as glândulas salivares com os órgãos endócrinos. Assim HARDIM (24) em 1886 descreveu casos clínicos que mostravam repercussão do estado gravídico sobre as glândulas salivares.

Em 1927 UTIMURA (63), aventou a hipótese que

as glândulas parótidas do cão possuem ação hipoglicemiante . No entanto, a hipótese que as glândulas submandibulares e parótidas desempenham funções endócrinas foi proposta, somente em 1934, por OGATA (47) quando estudava o possível envolvimento dessas glândulas com o diabetes.

OGATA et al. (1944, 1945)⁴⁸ e ITO (1954)²⁹ isolaram e cristalizaram do extrato de parótida bovina, uma substância biologicamente ativa, de natureza proteica, que denominaram de "Parotin". Este fato chamou a atenção de muitos pesquisadores que procuraram, a partir dessa época, esclarecer e definir as possíveis funções endócrinas das glândulas salivares.

AONUMA e YOSHIMURA (1954)⁴ verificaram uma diminuição do piruvato sanguíneo, em coelhos, após a administração de "Parotin".

TAKODORO (1955)⁵⁹ observou em cães, que a tolerância à glicose era aumentada pela administração do "Parotin".

ITO (1960)³⁰ confere às parótidas várias funções importantes tais como: estimular a proliferação das cartilagens, promover o desenvolvimento de fibras elásticas e tecido conjuntivo, e estimular o sistema retículo endotelial

e os órgãos hematopoiéticos.

TAKIZAWA (1954)⁵⁸ e OGATA (1955)⁴⁹ demonstraram que a sialoadenectomia produz hipertrofia das células beta do pâncreas.

Analizando uma possível relação entre as glândulas salivares e a tolerância à glicose, GODLOWSKY (1962)²³ verificou que a remoção bilateral das glândulas submandibulares e sublinguais em cães, produz um significativo aumento da sensibilidade à insulina, concluindo que essas glândulas produzem um fator que, se removido, potencializa a ação da insulina. Esse fator foi denominado Inibidor Submaxilar da Insulina, mas não foi isolado.

Mais uma informação no mesmo sentido foi obtida por HOSHINO et al. (1976)²⁸ quando investigaram o efeito da ligação bilateral dos ductos das glândulas parótidas e submandibulares em ratos diabéticos. Esses autores sugeriram que a glândula submandibular produz um fator antagonista da insulina que tem sua ação potencializada por uma substância produzida pela glândula parótida, sendo que esta última, por si só, não tem efeito direto sobre a ação da insulina.

Por outro lado, LAWRENCE et al. (1977)³⁷ isola-

ram um fator hiperglicemiante existente nas glândulas submandibulares de ratos, camundongos e coelhos, que recebeu o nome de Glucagon Salivar, tendo um peso molecular próximo de 70.000. Injeção intravenosa desse fator provoca um efeito comparável ao obtido com administração de glucagon pancreático.

Desde que PLAGGE (1938)⁵¹ demonstrou que a extirpação das glândulas submandibulares e sublinguais em ratos recém-nascidos leva invariavelmente à morte, muito se tem discutido sobre a importância das glândulas salivares na sobrevivência desses animais.

Vários autores têm procurado analisar a "causa mortis" e relacionar a importância vital dessas glândulas em várias idades. Os resultados desses inúmeros trabalhos deram origem a diferentes conceitos: uns acreditam que a morte ou o menor desenvolvimento dos animais sialoadenectomizados se deva fundamentalmente à problemas nutricionais, enquanto que outros relacionam esse fenômeno com alterações de ordem endócrina.

O nítido retardo no crescimento de animais sialoadenectomizados, segundo NARASIMHAN e GANLA (1963)⁴⁶ não se

deve a fatores nutricionais, e sim a algum fator endócrino.

TEIXEIRA et al. (1970a⁶⁰,b)⁶¹ observaram que a extirpação das glândulas submandibulares e sublinguais em ratos, provoca a morte nesses animais quando realizada antes do 13º dia de vida. Entretanto, quando a sialoadenectomia era feita em ratos com mais de 13 dias de idade, a taxa de mortalidade diminuía. Porém, os animais que sobreviviam apresentavam menor crescimento e ganho de peso do que seus controles.

Estudando as alterações verificadas em córtex da adrenal e órgãos reprodutores, em ratas sialoadenectomizadas, MUHLER e SHAFER (1954)⁴⁵ suscitaram a possibilidade dessas modificações decorrerem de uma redução na ingestão alimentar.

BIXLER et al. (1955a)¹¹ também sugeriram que o retardo no ganho de peso dos animais sialoprivos, poderia ser atribuído a uma falha na ingestão alimentar.

Por outro lado, BRECHMAN e BARTELS (1964)¹⁴ sugerem que o ganho de peso significativamente menor, pode ser atribuído à menor utilização dos alimentos pelos animais sialoadenectomizados.

Segundo EPSTEIN et al. (1970)¹⁹ ratos recém-nascidos sialoadenectomizados morrem de inanição porque não conseguem sugar as tetas maternas, devido a total ausência de secreção salivar.

BARTHE et al. (1970)⁹ e BARTHE e DAVID (1971)¹⁰ verificaram que, tanto a remoção das glândulas, como a ligação de seus ductos excretorios, levam aos mesmos distúrbios na sobrevivência e desenvolvimento. Entretanto, esses autores mantêm a dúvida se o fato está ligado a razões puramente digestivas ou a problemas endócrinos.

Vêm sendo estudadas também por vários autores as relações entre as glândulas salivares e as gônadas.

Já em 1940, foi demonstrado por LACASSAGNE³⁵ a existência de dimorfismo sexual na estrutura das glândulas submandibulares de camundongos. Esse dimorfismo foi estudado bioquimicamente e histoquimicamente por JUNQUEIRA (1949)³³ e através de microscopia eletrônica por CARAMIA (1966)¹⁵. Entretanto, a evidência desse dimorfismo em outros animais ainda é discutida.

KATAGIRI e HIGASHIJO (1940)³⁴ demonstraram que a remoção das glândulas submandibulares e a ligação dos ductos

da parótida em ratas jovens, leva a uma hipertrofia do útero.

GINN e VOLKER (1942)²² demonstraram que a remoção das glândulas salivares em ratas provoca distúrbios relacionados com hormônios sexuais e vitaminas do complexo B.

Estudando a relação das glândulas salivares com as gônadas, foi observado que a sialoadenectomia, em ratas pré-puberais, provoca atrofia dos folículos ovarianos (BIXLER et al. 1957)¹³.

Em 1958, AFONSKY¹ verificou uma queda na capacidade de fecundação em ratas que tiveram suas glândulas salivares removidas.

SUDDICK (1960)⁵⁵ registrou que as glândulas salivares possuem uma substância que pode aumentar a atividade dos órgãos reprodutores.

LOURIDES et al. (1970)⁴³ demonstraram que a sialoadenectomia, em ratas, provoca um retardo na maturação ovariana e uma atrofia do útero.

Estudando o efeito da sialoadenectomia na fertilidade de ratos, DOTTAIVIANO et al. (1974)¹⁸ observaram que animais normais quando acasalados, apresentam um índice de

75% de reprodução. Em comparação, casais sialoadenectomizados apresentam apenas 40%.

Recentemente, ARCIERI e MARTINELLI (1977)⁵ também verificaram uma progressiva esterilidade em ratas que tiveram suas glândulas extirpadas.

Outros autores tem relacionado a remoção das glândulas salivares com alterações nas funções gonadais masculinas. Assim, BIXLER et al. (1955b)¹² demonstraram que a sialoadenectomia, em ratos, produz um aumento no peso dos testículos.

Por outro lado, PARMON et al. (1957)⁵⁰ observaram inibição da espermatogênese em ratos que tiveram suas glândulas parótidas removidas.

JOHNSON et al. (1970)³² verificaram que a ablação das glândulas submandibulares em camundongos machos provoca regressão dos testículos e diminuição da atividade sexual.

Outros trabalhos, além desses já citados, têm demonstrado também o relacionamento das glândulas salivares com o hipotálamo (SAAD et al., 1976⁵²), com a hipófise (LACASSAGNE e CHAMORRO, 1940³⁶; ALVAREZ-BUYLLA et al., 1970²) e

com a tireóide (ITO et al., 1960³¹).

Muitas investigações tem sido feitas também , no sentido de elucidar os efeitos biológicos provocados por extratos de glândulas submandibulares "in vitro" e "in vivo".

COHEN (1960)¹⁶ isolou um Fator de Crescimento Nervoso (NGF) do extrato de glândulas submandibulares de camundongos, que seletivamente estimula o crescimento e a diferenciação das células nervosas sensoriais e simpáticas.

Posteriormente COHEN (1962)¹⁷ purificou um segundo polipeptídeo, o Fator de Crescimento Epidermal (EGF) , também extraído de glândulas submandibulares de camundongos adultos, que estimula o crescimento epidermal, acelerando a abertura dos olhos e a erupção dos dentes incisivos de animais recém nascidos.

Dos fatores biológicos conhecidos, alguns apresentam atividade tóxica quando injetados, seja de forma inespecífica ou com eletividade de órgão ou tecido.

ANGELETTI et al. (1965)³, verificaram que extrato de glândula submandibular de camundongos machos, quando injetado em animais de laboratório, produzem aumento de

polimorfonucleares, induzindo leucocitose. Estes autores , conseguiram purificar, parcialmente, uma proteína deste extrato a qual apresentou a capacidade de induzir granulocitose em camundongos.

Estudando o efeito da sialoadenectomia e da administração de Parotin, sobre o desenvolvimento do tecido de granulação, (TEIXEIRA et al. 1976)⁶² mostraram que a sialoadenectomia produz uma queda na vascularização do tecido de granulação, na produção de colágeno e um aumento do número de linfócitos. A administração de Parotin, aumenta o desenvolvimento do tecido de granulação, o qual se torna mais fibroso e vascularizado.

ATTARDI et al. (1965⁶ e 1967⁷) identificaram e isolaram uma proteína do extrato de glândulas submandibulares de camundongo que estimula o crescimento de células mesenquimais e causa diferenciação do tecido muscular e cartilaginoso.

TAKEDA et al. (1967)⁵⁷ sugerem que a glândula submandibular de camundongos machos contém uma substância que induz linfopenia e atrofia de tecido linfóide, particularmente do timo. A natureza dessa substância não é conhecida.

da mas, parece ser uma proteína, uma vez que o extrato perde sua atividade quando aquecido durante 10 minutos, e não é dializável, sendo precipitado com 60% de saturação de sulfato de amônio.

Tem sido demonstrado que extratos de glândulas submandibulares de camundongo são extremamente tóxicos, mesmo com baixa concentração proteica. LUIZZI e ANGELETTI (1968)⁴⁴ demonstraram que a diálise desses extratos com tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,2, não diminui o nível de toxidade, sugerindo que o componente tóxico deve estar associado a macromoléculas, possivelmente de natureza proteica, sendo que a propriedade tóxica desse extrato é grandemente destruída por fervura a 100°C, durante 10 minutos. Numa tentativa de localizar o componente tóxico dessas glândulas, estes mesmos autores fracionaram o extrato bruto de glândulas submandibulares de camundongos em colunas de "Sephadex G-100", pH neutro, e verificaram que embora todas as frações apresentassem certo grau de toxicidade, uma das frações proteicas (fração E), era bem mais tóxica que as outras. Doses sub-letais dessa fração induzem retardo do crescimento de ratos recém-nascidos e severa atrofia do timo.

HOSHINO e LIN (1968²⁶, 1969²⁷) descreveram a existência de um fator letal nas glândulas submandibulares de camundongos machos que era liberado quando se transplan^{ta}vam essas glândulas para um animal hospedeiro. O transplante de glândulas parótidas ou submandibulares de fêmeas ou de machos imaturos, não apresenta toxicidade. A manifestação do fator letal está diretamente relacionada com o sexo masculino, e pode ser influenciada por andrógenos.

LIN e HOSHINO (1969)³⁹ também relatam a existência de um fator hemorrágico, evidenciado em transplan^{ta}tes subcutâneos de glândulas submandibulares de camundongos, que provoca hematoma local e severa hemorragia sistêmica.

Além desses fatores tóxicos já descritos , BARKA (1973)⁸ conseguiu purificar parcialmente uma proteína de glândulas salivares de camundongos machos e fêmeas , com atividade supressora da mitose celular.

Tendo em vista a possível relação entre as glândulas salivares e outras glândulas ou órgãos, achamos ser de interesse pesquisar a provável existência de outras substâncias com atividade biológica além das já descritas

na literatura.

Quando injetávamos extratos de glândulas submandibulares de camundongos machos em ratos, a fim de observarmos algumas das reações tóxicas neste animal, verificamos que os ratos injetados apresentavam intensa poliúria. Extrato de glândulas parótidas ou de outros órgãos do camundongo não produziam tal efeito.

Com base na literatura atual, constatamos não existir nenhum fator extraído de glândulas salivares de camundongo que tenha efeito sobre o rim, propusemo-nos então a realizar o presente trabalho, com os seguintes objetivos:

- 1 - isolar e caracterizar a(s) substância (s) do extrato de glândulas submandibulares de camundongos machos adultos, com possível ação sobre o rim;

- 2 - na eventualidade, comprovar histologicamente o efeito dessa(s) substância(s) sobre o tecido renal.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foram utilizados camundongos machos adultos, entre 2 e 3 meses de idade, pesando em média 30 gramas.

Os animais foram anestesiados por inalação de clorofórmio em uma campânula de vidro e fixados numa prancha cirúrgica em decúbito dorsal. Após tricotomia e incisão da região cervical anterior, as glândulas submandibulares foram extirpadas e colocadas em gelo.

Cada glândula pesava em média 66 miligramas e foram utilizadas aproximadamente 5 gramas de tecido em cada preparação.

Essas glândulas foram homogeneizadas em 16 ml de álcool etílico gelado, em um homogeneizador com pistilo de teflon. O extrato assim obtido, foi centrifugado a 3000 r.p.m. durante 10 minutos. O precipitado foi extraído 3 vezes consecutivas com tampão tris-HCl 0,05 M pH 7,6 e centrifugado novamente.

Os sobrenadantes de cada extração foram cole-

tados, reunidos e precipitados com sulfato de amônio a 75%.

Após centrifugação o precipitado foi dissolvido em 4 ml de H_2O destilada e colocado em banho-maria a $60^{\circ}C$ durante 10 minutos. A seguir foi novamente centrifugado, coletando-se o sobrenadante.

A purificação final foi realizada por filtração em gel "Sephadex G-25". O conteúdo proteico das frações obtidas, foi determinado pela absorção no ultravioleta a 280 nm. As frações contendo peptídios foram injetadas em ratos para a avaliação da atividade biológica.

A fração contendo atividade biológica foi caracterizada quimicamente pelo ponto isoelétrico (PI) de acordo com o método de WRIGLEY (1968)⁶⁵ e pelo peso molecular, determinado pela filtração em gel "Sephadex G-25" utilizando as cadeias A e B da insulina como padrões de referência.

Todas as etapas de purificação, foram acompanhadas pela dosagem do conteúdo proteico, utilizando-se o método do Biureto.

O teste biológico consistiu em injetar

1,5 mg/Kg de peso da fração contendo atividade, em ratos adultos, por via subcutânea.

Os animais injetados foram mantidos por 24 horas em gaiolas metabólicas onde se coletava a urina para análise.

Em seguida os animais foram sacrificados e tiveram seus rins retirados para obtenção de cortes histológicos.

Para avaliação histológica, o rim foi fixado em líquido de Bouin, durante 48 horas à temperatura ambiente. A seguir, foi incluído em parafina de acordo com as técnicas convencionais.

A microtomia foi feita na espessura de 6 micra e os cortes foram corados com hematoxilina e eosina.

Para verificação da permeabilidade glomerular, injetou-se corante "Tinta da China" pela artéria renal em animais tratados e controles, procedendo-se em seguida a mesma técnica histológica já citada, exceto que os cortes foram corados apenas com hematoxilina.

O exame de urina consistiu na avaliação do volume, densidade, pH e presença de albumina pela precipita-

ção da mesma com ácido sulfosalicílico.

RESULTADOS

RESULTADOS

As etapas de purificação do peptídeo de glândulas submandibulares de camundongos com atividade tóxica renal, encontram-se expressas na Tabela 1.

Como podemos observar, a quantidade de proteínas contidas no homogenado de 5 gr. de glândulas submandibulares de camundongos machos, perfazem um total de 1500 mg.

Na primeira etapa de purificação, extraíndo-se o precipitado alcoólico com tampão Tris HCl, obtivemos 500 mg de proteínas.

A seguir, precipitando-se esse extrato com 75% de saturação de sulfato de amônio, conseguimos uma purificação de 6 vezes em relação ao homogenado, ou seja, houve precipitação de 250 mg de proteínas.

Após aquecimento à 60°C, durante a terceira etapa de purificação, restaram 48 mg de peptídeo e proteínas no sobrenadante, que foram filtrados em gel "Sephadex G-25" para separação final. Nessa filtração, obtivemos uma fração contendo aproximadamente 8 mg de peptídeo com atividade biológica.

A caracterização do peptídeo isolado, quanto ao peso molecular, encontra-se expressa no Gráfico I. Como mostra esse gráfico, o volume de eluição da fração contendo peptídeo foi de 34,5 ml, portanto, utilizando-se as cadeias A e B da insulina como padrão de referência, calcula-se que o P.M. desse peptídeo esteja em torno de 2800.

O resultado da focalização isoelétrica revelou que o peptídeo apresenta um componente básico e um componente ácido, de pH isoelétrico em torno de 8,7 e 3,2 respectivamente.

A análise do exame de urina demonstrou que os animais que receberam 1,5 mg/Kg de peso do peptídeo subcutaneamente apresentaram intensa poliúria e albuminúria, quando comparados com animais controles que receberam igual volume de solução fisiológica. (Tabela 2).

A ação tóxica do peptídeo sobre as estruturas renais é evidenciada por: alterações do glomérulo, ocasionando um aumento do espaço dentro da cápsula de Bowman e desorganização do feixe capilar intra-capsular; atrofia do revestimento epitelial de vários segmentos do nefron; ectasia

tubular e vacuolização das células dos túbulos proximais.

(Fotos n^os 1-6)

Como mostra as fotos 7 e 8, os animais tratados com peptídeo apresentam acentuado aumento da permeabilidade capilar glomerular evidenciado pelo extravasamento do corante "Tinta da China".

TABELA 1 - Etapas de purificação de peptídio de glândulas submandibulares de camundongos com atividade tóxica renal.

Etapas de purificação	Proteínas Totais (mg)	Purificação (X)
Homogenado de glândulas (5g)	1500	0
Extrato do precipitado alcoólico com tampão Tris-HCl	500	3
Precipitado com 75% de saturação de sulfato de amônio	250	6
Aquecimento durante 10 min. 60° C	48	31
Filtração em Sephadex G-25	8	187

GRÁFICO 1 - Determinação do peso molecular de peptídio de glându
las submandibulares de camundongo com atividade tóxi
ca renal.

A - Cadeia A da insulina (P.M. 2350).

B - Cadeia B da insulina (P.M. 3400).

P - Peptídio (P.M. 2760).

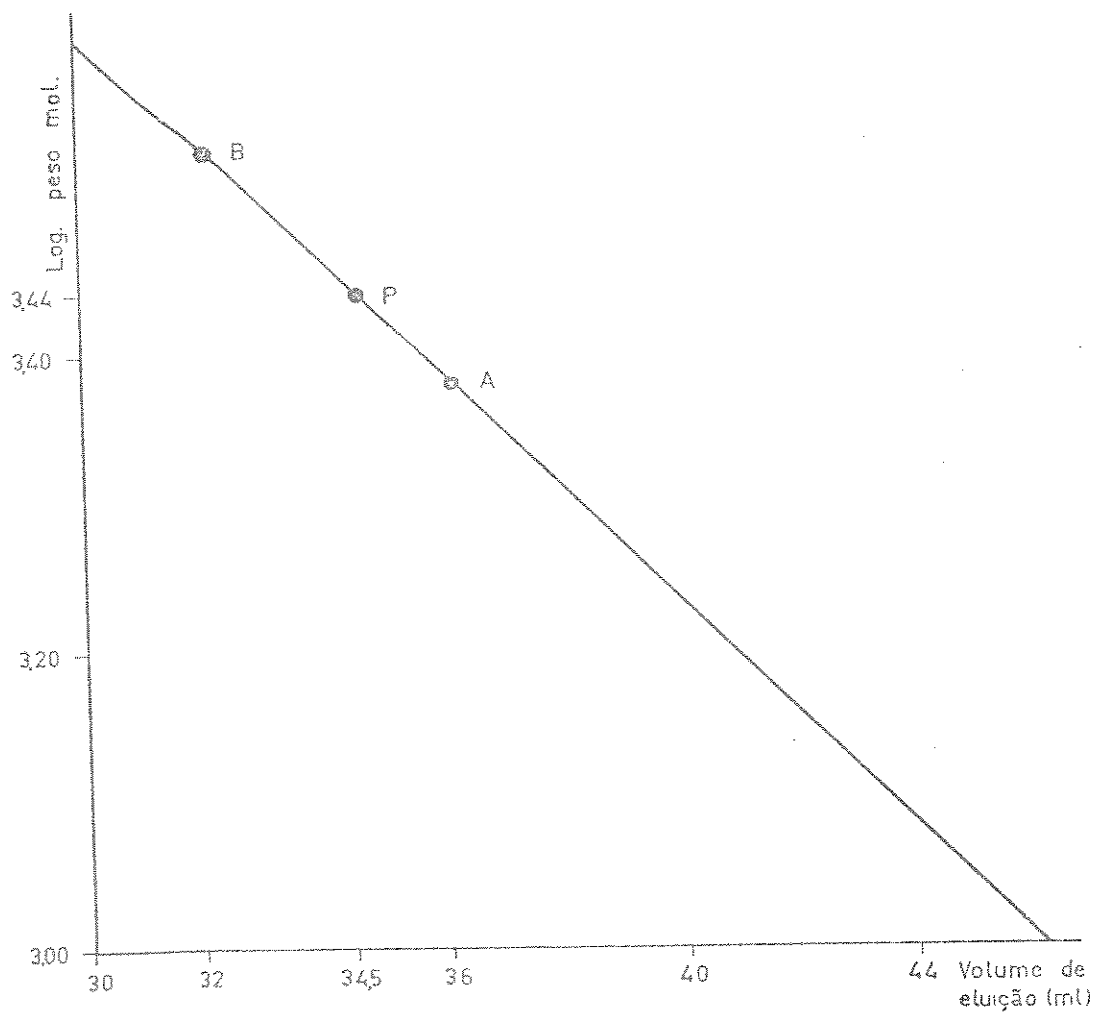


TABELA 2 - Medidas do volume, densidade, pH e albumina da urina de ratos mantidos em gaiolas metabólicas durante 24 horas.

	Vol. urinário de 24 horas	Densid.	pH	Presença de Albumina (qualitat.)
Ratos Injetados com 1,5 mg peptídio Kg peso	35 ml	1,0145	6,5	+
	43 ml	1,0160	6,6	+
	41 ml	1,0125	6,5	+
	38 ml	1,0130	6,7	+
	45 ml	1,0140	6,5	+
Média	40,4 ml	1,0140	6,56	+
Ratos Controles injetados com solu- ção fisio- lógica	8,0 ml	1,0250	6,70	-
	10,0 ml	1,0215	6,6	-
	11,0 ml	1,0180	6,7	-
	10,0 ml	1,0165	6,8	-
	12,0 ml	1,0150	6,6	-
Média	10,2 ml	1,0192	6,68	-

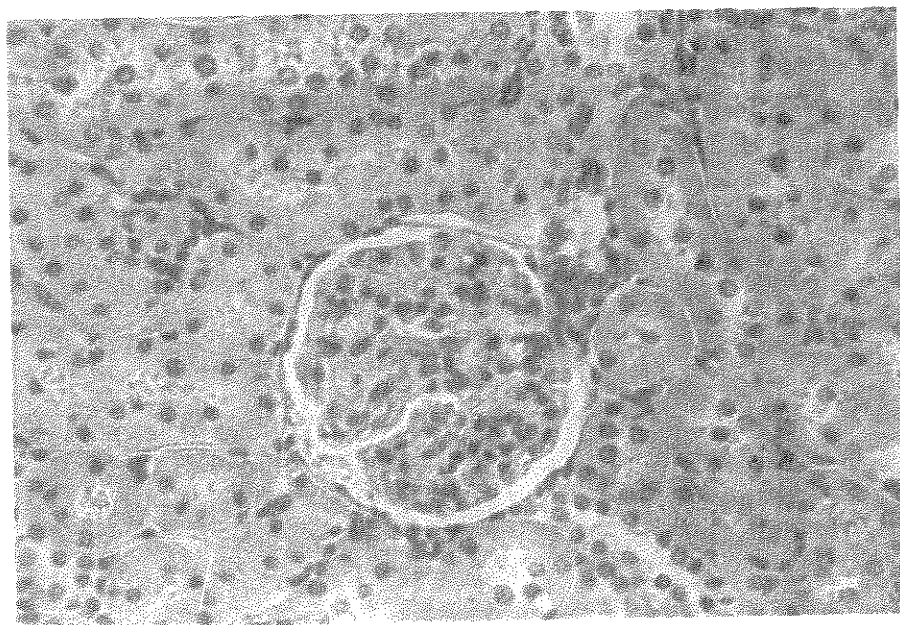


FOTO 1 - Corte histológico do rim de animal controle, mos-
trando região cortical de aspecto normal. (HE)
Aumento de 317x.

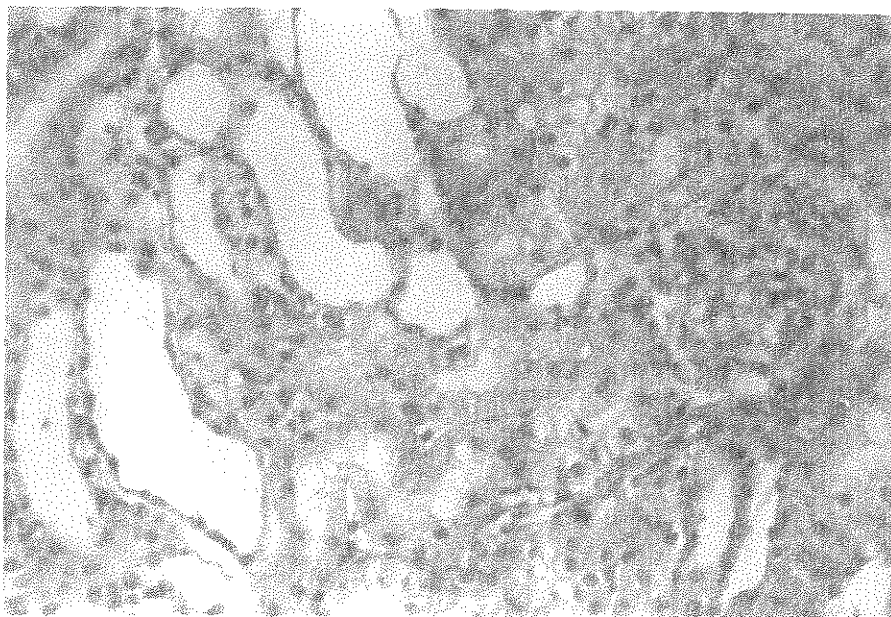


FOTO 2 - Corte histológico do rim de animal tratado, mostrando: desorganização do feixe capilar intracapsular; vacuolização das células dos túbulos proximais; ectasia tubular. (HE) Aumento de 317x.

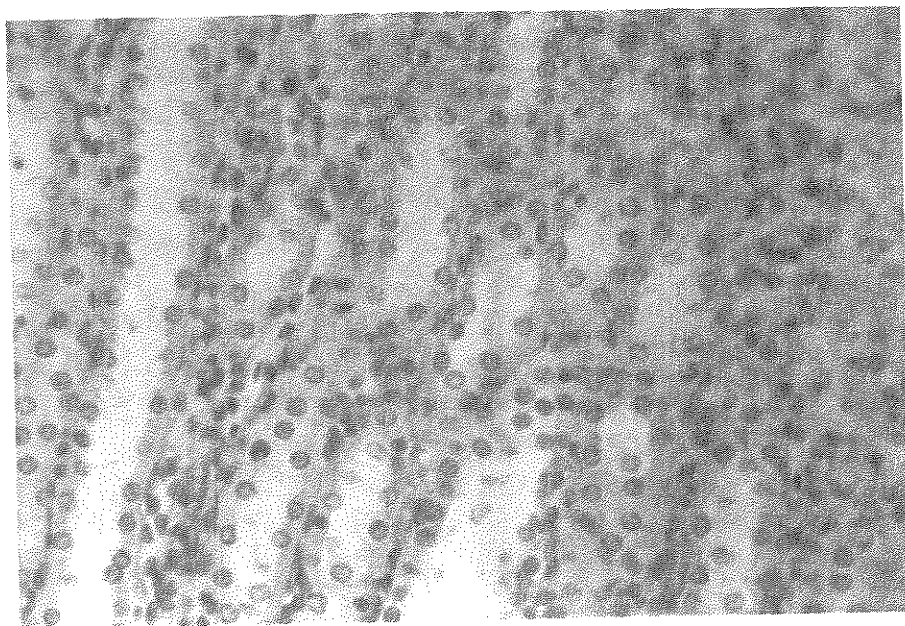


FOTO 3 - Corte histológico do rim de animal controle, mostrando região medular de aspecto normal. (HE)
Aumento de 317x.

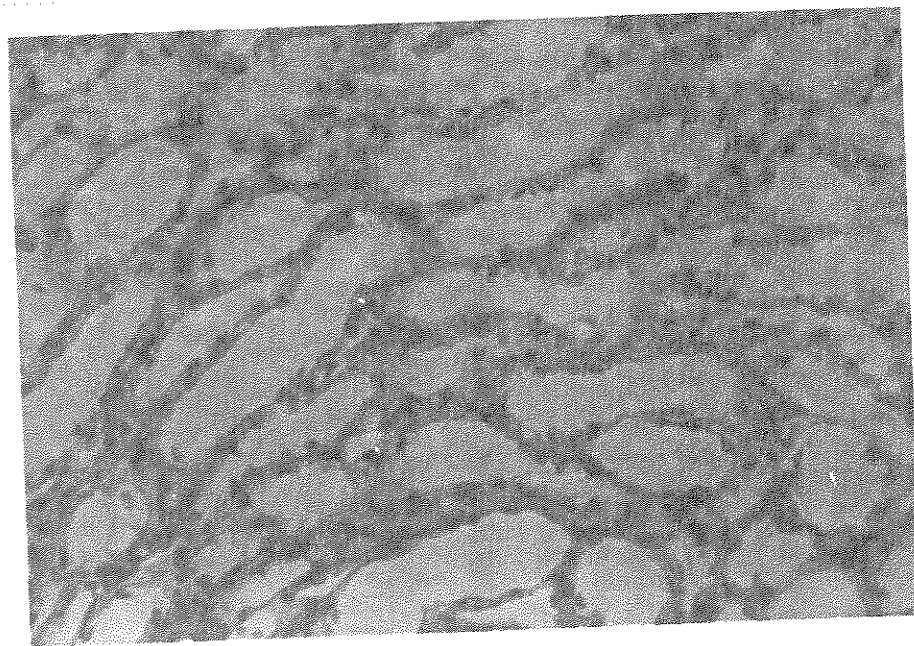


FOTO 4 - Corte histológico do rim de animal tratado, mostrando região medular com atrofia do epitélio tubular e ectasia acentuada. (HE)
Aumento de 317x.

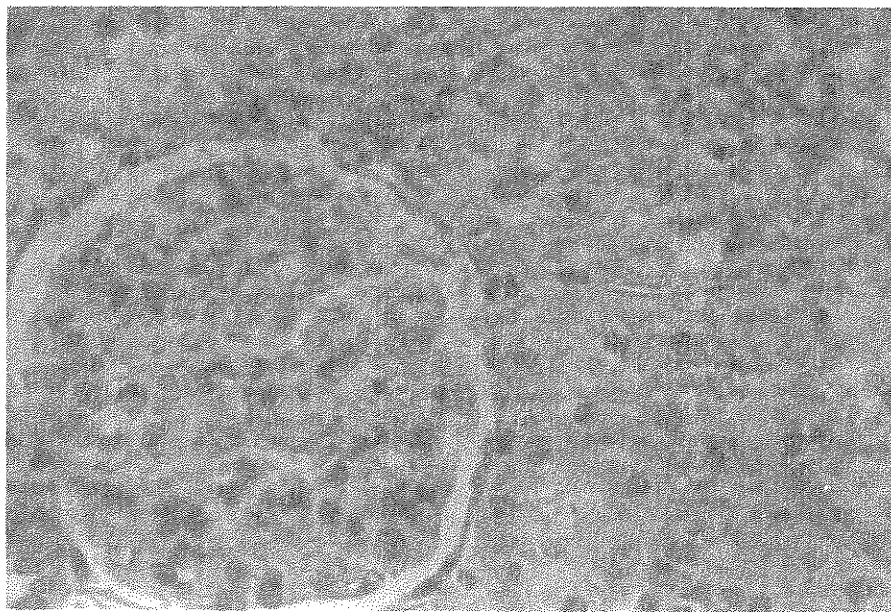


FOTO 5 - Corte histológico do rim de animal controle, mo
strando região cortical de aspecto normal. (HE)
Aumento de 512x.

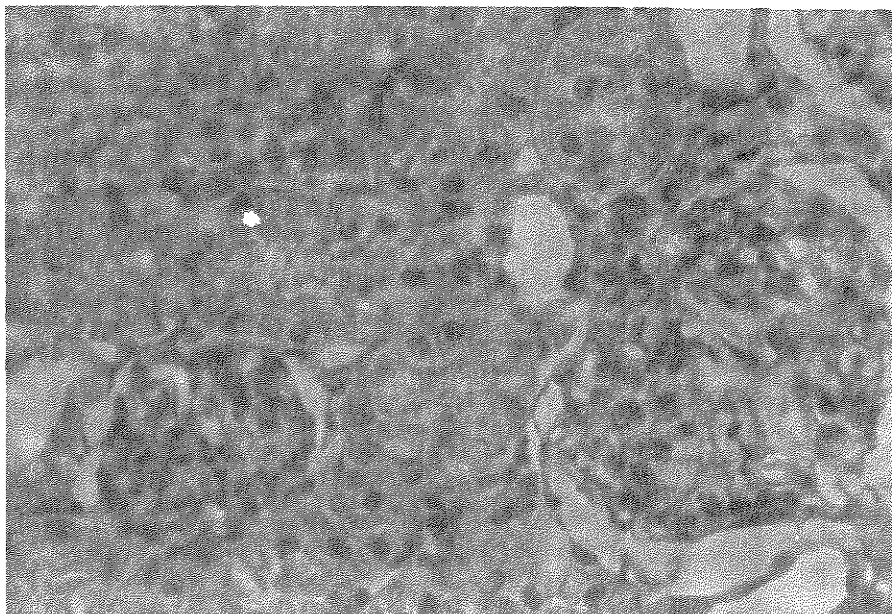


FOTO 6 - Corte histológico do rim de animal tratado, mostrando: desaparecimento dos limites dos lóbulos glomerulares; atrofia do revestimento epitelial de vários segmentos do nefron; ectasia tubular acentuada. (HE)

Aumento de 512x.

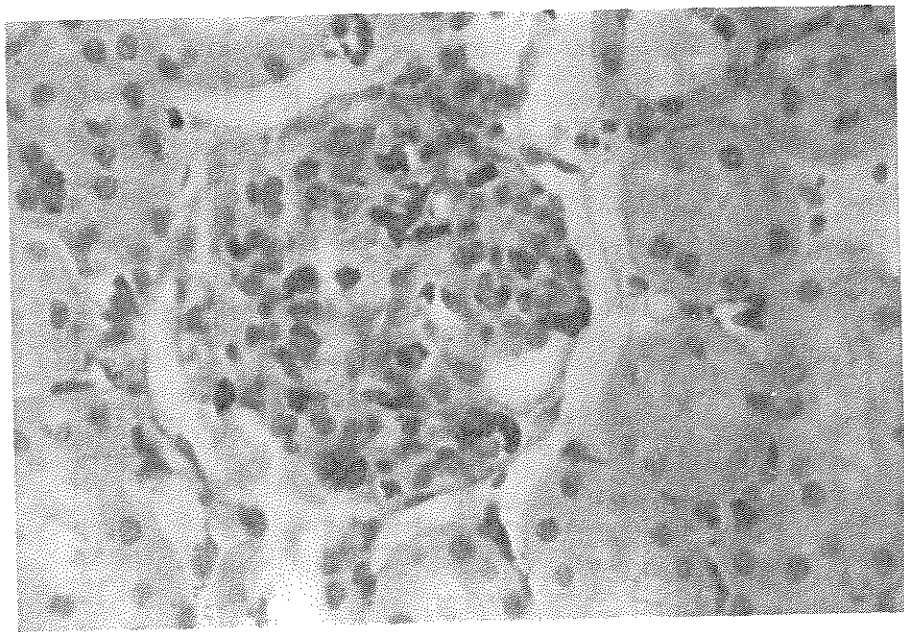


FOTO 7 - Corte histológico do rim de animal controle - pre
sença de pequena quantidade do "corante" nos capi
lares glomerulares e nos espaços intersticiais.
(H + Tinta da China) Aumento de 512x .

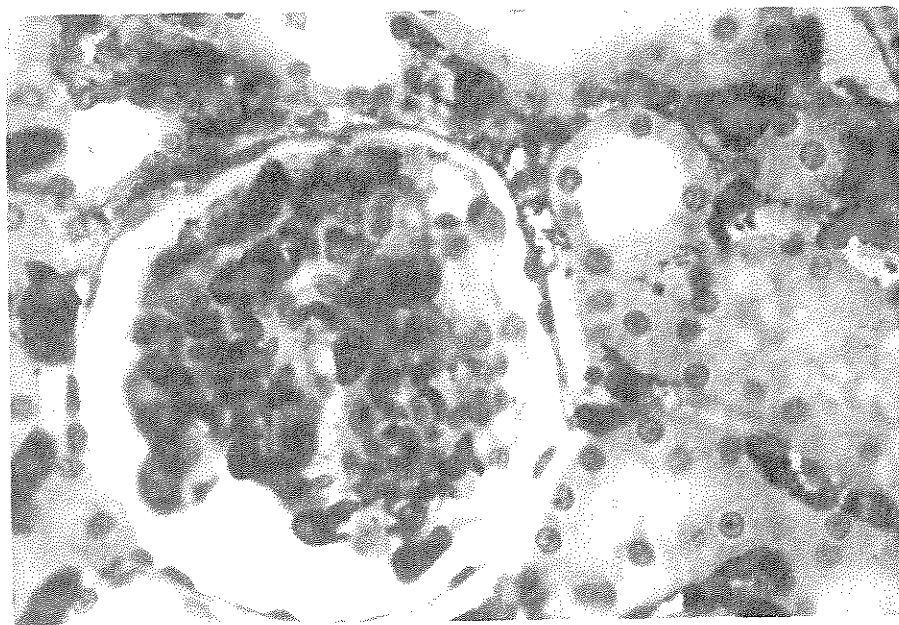


FOTO 8 - Corte histológico do rim de animal tratado - gran
de quantidade de Tinta da China nos capilares glo
merulares e espaços intersticiais.

(H + Tinta da China)

Aumento de 512x .

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Muitos fatores biológicos que apresentam atividade tóxica têm sido evidenciados em extratos de glândulas submandibulares de camundongos. Entretanto, nada ainda se sabe a respeito da função, mecanismo de ação e especificidade dessas substâncias.

ANGELETTI et al. (1965)³ conseguiram purificar parcialmente uma proteína do extrato de glândulas submandibulares de camundongos machos que têm a capacidade de induzir a granulocitose em camundongos. Mas, não se sabe se esta proteína atua diretamente promovendo a granulocitose ou indiretamente estimulando a produção de outras substâncias, como por exemplo, o fator que promove a leucocitose.

TAKEDA et al. (1967)⁵⁷, sugerem a existência de um fator que causa atrofia do tecido linfático. Segundo LUIZZI e ANGELETTI (1968)⁴⁴, o componente tóxico do extrato de glândulas submandibulares, que produz atrofia do timo, deve estar associado à macromoléculas de natureza proteica.

ATTARDI et al. (1965)⁶, isolaram uma proteína

desse extrato que afeta tecidos de origem mesodérmica. Como esta proteína apresenta atividade proteolítica, os autores concluem que provavelmente as substâncias biologicamente ativas observadas, devem ter sua origem na degradação de proteínas tissulares pela ação da referida enzima.

Os fatores proteicos contidos no extrato de glândulas submandibulares de camundongos machos, com as atividades biológicas descritas acima, aparentemente não apresentam efeito letal. No entanto, em 1962, COHEN¹⁷ demonstrou que extratos de glândulas submandibulares de camundongos machos, possuem um efeito letal tanto para camundongos recém-nascidos quanto para adultos.

A existência do fator letal foi efetivamente comprovada a partir dos experimentos de HOSHINO e LIN (1968²⁶ 1969)²⁷ quando transplantavam glândulas submandibulares de camundongos machos adultos para a cavidade abdominal de animais hospedeiros. Tanto o iso como o autotransplante levavam ao mesmo efeito, ou seja, liberavam o fator letal, que provocava a morte dos animais hospedeiros. A autópsia destes animais revelou a existência de congestão periférica e hemorragia, mas a real "causa mortis" não foi esclarecida, co-

mo também não é conhecida a natureza química do fator letal nem seu sítio de produção.

Foi descoberto também por LIN e HOSHINO (1969) ³⁹ a existência de um fator hemorrágico quando efetuavam transplantes subcutâneos de glândulas submandibulares. Os sintomas observados nos animais hospedeiros que recebiam o transplante intra-peritoneal eram marcadamente diferentes daqueles que recebiam o enxerto subcutâneo, particularmente quanto ao fenômeno hemorrágico. No transplante intra-peritoneal, a hemorragia era evidenciada particularmente pelas vísceras do hospedeiro que se incorporavam ao tecido implantado. Já, no enxerto subcutâneo, além de severa hemorragia sistêmica, observa-se também a formação de hematoma nas áreas subjacentes ao enxerto. Até o momento, não se conhece as características desse fator hemorrágico.

Podemos notar que a maioria dos fatores biológicos descritos acima, ainda não foram totalmente isolados e caracterizados. Entretanto, no presente trabalho, apesar de grandes dificuldades na escolha de técnicas apropriadas, conseguimos isolar e caracterizar um peptídeo de glândulas submandibulares de camundongos machos adultos, de Peso Molecu-

lar próximo de 2800, que apresenta uma atividade tóxica seletiva sobre o rim, produzindo intensa poliúria e albuminúria.

Sob o ponto de vista fisiológico, é difícil explicar a razão da existência de substâncias tóxicas nas glândulas salivares de camundongos. Para maiores esclarecimentos, seria necessário comprovar a existência dos fatores tóxicos descritos acima, nas glândulas salivares de outros animais.

Sabe-se que as glândulas salivares de cefalopodes também apresentam toxicidade.

LO BIANCO (1888)⁴¹ foi o primeiro a indicar que octopodes possuem uma secreção tóxica na glândula salivar. Estudos subsequentes sobre a farmacologia e bioquímica das toxinas de glândulas salivares posteriores de octopodes levaram a uma diversidade de informações.

LIVON e BRIOT (1906)⁴⁰ reportaram que a toxina é uma proteína especificamente ativa contra o Sistema Nervoso Central de crustáceos. HENZE (1913)²⁵ isolou tirami na dessas glândulas e afirmou que é um agente paralisante. Em 1959 GHIRETTI, isolou uma proteína tóxica de glândula sa

livar posterior de Sepia officinalis, a qual tem sido chamada de cefalotoxina. SUTHERLAND et al. (1970)⁵⁶ isolaram uma potente neurotoxina de glândula salivar de Hepalochlaena maculosa, de P.M. inferior a 540. Entretanto, as informações sobre as toxinas de glândulas salivares de cefalopodes são ainda muito limitadas, necessitando de estudos complementares.

Tem sido reportado, que veneno de cobras da família Crotalidae e Viperidae também apresentam uma ação nefrotóxica. SCHMIDT et al. (1976)⁵³, num estudo de microscopia eletrônica, demonstraram que veneno de Crotalus atrox, quando injetado em camundongos, produz lesão renal caracterizada por modificações ultraestruturais nos glomérulos e túbulos contornados proximais. As alterações do epitélio visceral e parietal incluem: edema intracelular, hemorragia, vesiculação e dilatação de retículo endoplasmático e mitocôndria. A complexidade desse tipo de veneno tem dificultado a compreensão de sua ação, uma vez que apresenta uma série de componentes tóxicos que atuam de forma combinada.

A ação tóxica do peptídeo isolado neste trabalho sobre as estruturas renais é evidenciada particularmen-

te por alterações do glomérulo, ocasionando um aumento do espaço dentro da cápsula de Bowman e desorganização do feixe capilar intra capsular, como também ectasia tubular e vacuolização das células dos túbulos proximais, alterações essas que podem explicar em parte o aparecimento de poliúria e albuminúria nos animais injetados com peptídio. Contudo, é provável que este peptídio com atividade tóxica renal tenha sua ação limitada à atividade glandular, ou que em quantidades ínfimas possa exercer alguma atividade fisiológica.

Temos observado que ratos sialoadenectomizados apresentam um fluxo urinário cerca de 20% menor do que ratos normais (resultados não publicados). Este fato pode ser evidência de uma possível ação do referido peptídio sobre o rim. Entretanto, para que o papel fisiológico deste peptídio glandular venha a ser esclarecido, serão necessários experimentos complementares que possam elucidar seu mecanismo de ação sobre a atividade renal, particularmente, medidas da taxa de filtração glomerular e da reabsorção e secreção de eletrólitos a nível tubular.

De qualquer forma, o estudo do mecanismo de ação deste peptídio poderá trazer novas informações a respeito do transporte de água e eletrólitos pelos túbulos renais, como também, esclarecimentos sobre transporte de eletrólitos em outros órgãos como o pâncreas e as próprias glândulas salivares.

RESUMO e CONCLUSÕES

RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho teve a finalidade de isolar e caracterizar um peptídeo do extrato de glândulas submandibulares de camundongos machos adultos, com ação sobre o rim.

A purificação deste peptídeo compreende as seguintes etapas:

- a - Homogeneização de glândulas submandibulares de camundongos em álcool etílico;
- b - Extração do precipitado alcoólico com tampão Tris-HCl;
- c - Precipitação com sulfato de amônio a 75%;
- d - Aquecimento durante 10 min. a 60°C;
- e - Filtração em gel "Sephadex G-25".

Pela análise dos resultados obtidos podemos concluir que:

- 1 - As glândulas submandibulares de camundongos machos, possuem um peptídeo de P.M. em torno de 2800.
- 2 - Este peptídeo apresenta um componente bási

co e um componente ácido, de pH isoelétrico em torno de 8,7 e 3,2 respectivamente.

3 - Quando injetado subcutaneamente na dose de 1,5 mg/Kg de peso em ratos, este peptídeo provoca poliúria e albuminúria.

4 - A ação tóxica deste peptídeo sobre as estruturas renais é evidenciada por:

- a - desorganização do feixe capilar intra-capsular.
- b - aumento da permeabilidade capilar glomerular.
- c - ectasia tubular acentuada.
- d - vacuolização das células dos túbulos proximais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. AFONSKY, D. Effects of desalivation in reproduction. J. Dent. Res., 37(5): 965, 1958. (Abstract).
02. ALVAREZ-BUYLLA, R.; MANDOKI, J. and ALVAREZ-BUYLLA, E. R. Survival comparison between totally hypophysectomized dogs and dogs with a transplant of salivary gland in the place of the extirpated hypophysis. Acta Physiol. Lat. Amer., 20(1): 24-27, 1970.
03. ANGELETTI, P.V.; SALVI, M.L.; CAPANI, F. and FRATO, L. Granulocytosis-inducing factor from the mouse sub-maxillary gland. Biochem. Biophys. Acta, III: 344-346, 1965.
04. AONUMA, S. and YOSHIMURA, K. The studies on the salivary gland hormones. XXXI. Effect of Parotin on serum phosphate and blood pyruvate. Jap. J. Pharm. Chem., 26: 743, 1954.
05. ARCIERI, R.M. and MARTINELLI, C. Influence of salivary glands extirpation on procreation in rats. Tohoku J.

Exp. Med., 121: 105-110, 1977.

06. ATTARDI, D.G.; LEVI-MONTALCINI, R.; WENGER, B.S. and ANGELETTI, B.S. Submaxillary gland of mouse. Effects of a fraction on tissues of mesodermal origin in vitro. Science, 150: 1307-1309, 1965.
07. ATTARDI, D.G. and SCHESINGER, R. Submaxillary gland of mouse: Properties of a purified protein affecting muscle tissue in vitro. Science, 157: 1253-1255, 1967.
08. BARKA, T. Partial purification of a mitotic supressor from the salivary gland. Exp. Mol. Path., 18: 225 - 233, 1973.
09. BARTHE, D.; CHATELUT, J.; DARNAULT, J.; DUBOSCQ, Y. and DAVID, J.F. Effects de l'ablation des glandes sous-maxillaires et de l'administration de "Parotine" sur la croissance du jeune rat. C. R. Soc. Biol., 164: 1680-1684, 1970.
10. BARTHE, D. and DAVID, J.F. Effects de l'ablation des glandes sous-maxillaires et de la destruction de leurs canaux excréteurs sur la survie et la crois -

sance du rat nouveau-né. C. R. Soc. Biol., 165: 570
574, 1971.

11. BIXLER, D.; MUHLER, J.C. and SHAFER, W.G. The effects of castration, sex hormones and desalivation on dental caries in the rat. J. Dent. Res., 34(6): 889-894, 1955a.
12. BIXLER, D.; MUHLER, J.C. and SHAFER, W.G. Effect of desalivation on adrenals, uterus, and testes in the rat. J. Dent. Res., 34(6): 910-914, 1955b.
13. BIXLER, D.; WEBSTER, R.C. and MULLER, J.C. The effects of salivariadenectomy on the reproductive organs of the female rat. J. Dent. Res., 36(4): 559-565, 1957.
14. BRECHMAN, H. and BARTELS, H.A. Food and water intake and organ and body weight in the sialoadenectomized rat. J. Dent. Med., 19: 111-117, 1964.
15. CARAMIA, F. Ultrastructure of mouse submaxillary gland. I. Sexual differences. J. Ultrastruct. Res., 16: 505-523, 1966.
16. COHEN, S. Purification of a Nerve Growth Factor promo-

21. GHIRETTI, F. Cephalotoxin: the crab-paralyzing agent of the posterior salivary glands of cephalopods. Nature, Lond. 183: 1192-1193, 1959.
22. GINN, J.T.; VOLKER, J.F. Rustings in desalivated albino rats. Endocrinology, 31: 282-283, 1942.
23. GODLOWSKY, Z.Z. Endocrine function of submaxillary glands. Archs. Otolar., 75: 346-363, 1962.
24. HARDIN, A. Connection between the parotid glands and the generative organs. Lancet, 1: 334, 1886. Apud Wagner, E.M. et al., 1960. op. cit. ref. 64.
25. HENZE, M. p-Oxyphenylaethylamin, das Speicheldrüsengift der Aphasopoden Hoppe-Seyle's Z. Physiol. Chem. 87: 51, 1913.
26. HOSHINO, K. and LIN, C.D. Transplantability of salivary glands of mice and its lethal effects on the hosts. Anat. Rec., 160: 474-475, 1968.
27. HOSHINO, K. and LIN, C.D. Lethal factor released from submandibular grafts in mice. Canad. J. Physiol. Pharmacol., 47: 329-334, 1969.

28. HOSHINO, K.; DECKER, R.F.; MOLNAR, F. and KIM, Y. T.

Hypoglycaemic effects of salivary duct ligation upon diabetes mellitus in mice. Archs oral Biol., 21: 105 111, 1976.

29. ITO, Y. Biochemical studies on salivary gland hormone.

Endocr. Jap., 1: 1, 1954.

30. ITO, Y. Parotin: A salivary gland hormone. Ann. N. Y.

Acad. Sci., 85: 228-310, 1960.

31. ITO, Y.; KAWADA, J. and KURATA, M. Studies on the physiological chemistry of the salivary glands XLVI. On the functional correlation between salivary glands and other endocrine organs. II. The effects of some antithyroid drugs on the salivary glands of rats.

Endocrinol. Japon., 7(2): 157-166, 1960.

32. JOHNSON, G.; KEKEH, J. and M. YAPI. Sur l'activité endocrine des glandes salivares sous-maxillaires sensu stricto de la souris. Ann. Endocr. (Paris), 31: 573 577, 1970.

33. JUNQUEIRA, L.C.; FAJER, A.; RABINOVITCH, M. and FRANKEN

- THAL, L. Biochemical and histochemical observations on the sexual dimorphism of mice submaxillary glands. J. Cell Comp. Physiol., 34: 129-158, 1949.
34. KATAGIRI, S. and HIGASHIJO, T. Histologische Studien uber die Einflusse der Speicheldresenexstirpation auf die wirkung des Geschlechtshormons. Trans. Soc. Pathol. Jap., 30: 252-260, 1940.
35. LACASSAGNE, A. Dimorphisme sexual de la glande sous-maxillaire chez la souris. Comp. Rend. Soc. Biol., 133: 180-181, 1940.
36. LACASSAGNE, A. and CHAMORRO, A. Réaction à la testostérone de la glande sous-maxillaire, atrophiée consécutivement à l'hipophysectomie chez las souris. C. R. Soc. Biol., 134: 223-225, 1940.
37. LAWRENCE, A.M.; TAN, S.; HOJVAT, S. and KIRSTEINS, L. Salivary gland hiperglicemic factor: An Extrapancreatic source of glucagon - like Material. Science, 195: 70-72, 1977.
38. LEVI-MONTALCINI, R. and ANGELETTI, P.V. Nerve growth

Factor, Physiol. Rev. 48(3): 534-569, 1968.

39. LIN, C.D. and HOSHINO, K. Hemorrhagic phenomena caused in the host mice by submandibular gland isografts from males. Proc. Canad. Fed. Biol. Soc., 12: 8, 1969.
40. LIVON, C. and BRIOT, A. Sur le sex salivary des cephalopodes. J. Physiol. Path. gén, 3: 1, 1906. Apud Songdahl, J.H. and Shapiro, B.I., 1974, op. cit. ref. 54.
41. LO BIANCO, S. Notizie biologiche riguardanti special -
ment il periodo di maturita sessuale degli animali
del Golfo di Napoli. Mitt. Stat. Neapel., 8: 385 ,
1888. Apud Songdahl, J.H. and Shapiro, B.I., 1975 ,
op. cit. ref. 54.
42. LÓPEZ ARRÁNZ, I. Correlacion endocrina glandulas salivales - Testiculos. An. Esp. Odonto Estomatol., 34:
215-226, 1975.
43. LOURIDES, O.; THEODOSSIOU, A. BAZOPOULOU KYR KANIDAE ,
E. and DEMETRIOU, N. Total sialoadenectomy effect

on the uterus and ovaries of the albino rat.

Odontotriakis, 5: 258-260, 1970.

44. LUIZZI, A. and ANGELETTI, P.V. Studies on the toxic effects of mouse submaxillary gland extracts. Experientia, 24: 1034-1035, 1968.
45. MUHLER, J.C. and SHAFER, W.S. Experimental dental caries: II - Effect of disalivation on dental caries and castration and desalivation on fluorine storage in the rat. J. Dent. Res., 33(3): 346-356, 1954.
46. NARASIMHAN, M.J.; GANLA, V.G. The regulatory influence of the submandibular salivary gland on growth. An. Endocrinol., 29(5): 513-522, 1968.
47. OGATA, T. Veber der inneren Sekretion der Mundspeicheldrüsen. Transaction of the 9th Congr. Far. Eastern Ass. of Trop. Med. Nanking, 2: 709-712, 1934. Apud Ogata, T., 1955, op. cit. ref. 49.
48. OGATA, A.; ITO, Y.; NAZAKI, Y.; OKABE, S. Studies on the salivary gland hormones. Reports I-XII. J. Pharm. Soc. Japon., 64: 79-88, 114-126, 146-153, 325-340, 1944; *ibid*, 65: 9-13, 1945. Apud Ogata, T.

1955, op. cit. ref. 49.

49. OGATA, T. The internal secretion of salivary glands.

Endocr. Jap., 2: 247-261, 1955.

50. PARMON, C.I.; BABES, A.E. and PETREA, J. Endocrinologie des glandes salivares. Biblothèque Médicale Editoria Academei Republiciis popule Romine, 1957 . Apud López Arranz, I. op. cit. ref. 42.

51. PLAGGE, J.C. The vital importance of salivary glands to newborn rats. Amer. J. Physiol., 124: 612-619, 1938.

52. SAAD, W.A.; UTRILLA, L.S.; SABBAG, Y. and CAMARGO, L. A.A. Efeitos de lesões hipotalâmicas sobre as glândulas salivares: Estudo histoquímico. Ciência e Cultura, (Suplemento) 28(7): 387, 1976.

53. SCHMIDT, M.E.; ABDELBAKI, Y.Z. and TU, A.T. Nephro - toxic action of rattlesnake and sea snake venoms : An electron - microscopic study. J. Path. 118: 75-90, 1976.

54. SONGDAHL, J.H. and SHAPIRO, B.I. Purification and

composition of a toxin from the posterior salivary gland of octopus dofleini. Toxicon, 12: 109-115 , 1974.

55. SUDDICK, R.P. Effect of salivariadenectomy and administration of salivary gland homogenates upon the reproductive organs of the female rats. J. Dent. Res., 30(3): 554-571, 1960.

56. SUTHERLAND, S.K.; BROAD, A.J. and LANE, W.R. Octopus neurotoxins: low molecular weight non-immunogenic toxins present in the saliva of the blue-ringed octopus. Toxicon, 8: 249, 1970.

57. TAKEDA, T.; YAMASAKI, Y.; YAMABE, H.; SUZUKI, Y. HAEBARA, H.; IRINO, T. and GROLLMAN, A. Atrophy of the lymphoid tissues of mice induced by extracts of the submaxillary gland. Proc. Soc. Exp. Biol. J. Med., 126: 212-216, 1967.

58. TAKIZAWA, N. A pathological research of the internal secretion on the salivary glands. Acta path. Jap., 4: 129-166, 1954.

59. TAKODORO, S. Salivary glands and carbohydrate metabolism. Naibunpi, 2: 129, 1955.
60. TEIXEIRA, D.; NEGREIROS DE PAIVA, C.E. and ALMEIDA COSTA, D.A. Glândulas salivares: sua necessidade à sobrevivência de ratos jovens. Ciência e Cultura, (Suplemento), 22: 344, 1970a.
61. TEIXEIRA, D.; NEGREIROS DE PAIVA, C.E. and ALMEIDA COSTA, D.A. Efeito do seccionamento dos ductos das glândulas submandibulares e sublinguais em ratos jovens. Ciência e Cultura, (Suplemento), 22: 344, 1970b.
62. TEIXEIRA, D.; VIZIOLI, M.R. and GUIMARÃES, A. Effects of sialoadenectomy and parotin hormone on the development of rat sponge-induced granulation tissue. Acta Anat., 94: 22-29, 1976.
63. UTIMURA, S. Apud Glasman, F., 1964, op. cit. ref. 20.
64. WAGNER, E.M.; BIXLER, D.; MUHLER, J.C. and SHAFER, W. G. Nutritional studies on desalivated rats. J. Dent. Res., 39(4): 689-690, 1960.

65. WRIGLEY, C.N. Analytical fractionation of plant and animal proteins by gel electrophocusing. J. Chrom., 36 = 362-365, 1968.