

MARIA CECÍLIA FERRAZ DE ARRUDA VEIGA

EFEITOS DAS FRAÇÕES I, II, III E IV DO PAROTIN SOBRE
A INCORPORAÇÃO DE GLICOSE E CONSUMO DE OXIGÊNIO PELO
TECIDO ADIPOSEO DE RATOS NORMAIS E DIABÉTICOS

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do grau de Doutor
em Ciência - Área de Farmacologia.

P I R A C I C A B A

- 1 9 8 7 -

Este exemplar foi
devolvido a te corrigido e assinado
nos dias CC PG / 026/83
Pinheiro, 28 de Junho de 1987

Aos Professores Doutores,
Décio Teixeira,
Carlos Eduardo Pinheiro,
Ernesto José Dottaviano e
Antonio Celso Ramalho,
pela minha formação científica.

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

- Ao Professor Doutor Décio Teixeira, companheiro em todos os momentos, pela amizade com que nos acolheu, pela orientação segura e constante que possibilitou a execução deste trabalho;
- Ao Professor Doutor Carlos Eduardo Pinheiro, mestre e amigo, agradecemos pela dedicação e confiança com que sempre nos distinguiu, pelo fracionamento do Parotin e pelos conhecimentos transmitidos que muito nos auxiliaram durante a realização deste trabalho;
- Ao Professor Doutor Alcides Guimarães, pelo estímulo durante o desenvolvimento deste trabalho, pela lealdade, companheirismo e colaboração;
- Ao Massaaki Yamamoto, Ph.D. Manager, Pharmaceutical and Manufacturing Technology of the Teikoku Hormone MFG. Co., Ltda., pelo fornecimento do Parotin;
- Ao Professor Doutor Jaime Aparecido Cury, pelas sugestões e colaboração na execução das técnicas bioquímicas;
- Ao Professor Doutor Simonides Consani, Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelo apoio recebido durante

o processo de nossa contratação nesta Faculdade;

- Ao Professor Doutor Roberto Simionato de Moraes, pela programação e orientação estatística;
- Ao Professor Doutor Amado Leonízio de Azevedo, Chefe do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela atenção e por gentilmente nos permitir o uso dos aparelhos utilizados nesse trabalho;
- Ao Professor Doutor Thales R. Mattos Filho, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Bases Farmacológicas para Terapêutica Medicamentosa, pelo apoio e amizade;
- Ao Professor Doutor Samir Tufic Arbex, Coordenador Geral dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelo incentivo;
- Aos Professores da Área de Farmacologia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Doutor Jonas Vaz de Arruda; Doutor José Ranali; Doutor João Leonel José; Doutor Eduardo Dias de Andrade e Doutora Maria de Lourdes G. da Gama, pelos seus eficientes ensinamentos;
- Ao meu sogro, Professor Olênio de Arruda Veiga, pela colaboração na revisão deste trabalho;
- Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas da

Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Sr. Ulisses de Oliveira Martins, pela colaboração técnica e Sr. Carlos Alberto Aparecido Feliciano, pela dedicação e presteza nos serviços datilográficos;

- À senhora Ivany do Carmo G. Gerola, Bibliotecária Chefe da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela revisão bibliográfica;
- A todos aqueles que direta ou indiretamente possibilitaram a execução deste trabalho.

C O N T E Ú D O

CAPÍTULO I

	Página
1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Proposição	16

CAPÍTULO II

2. REVISTA DA LITERATURA	17
2.1. Atividades Biológicas do Princípio Ativo das Glândulas Salivares (Parotin)	17
2.2. Participação das Glândulas Salivares e do Parotin no Metabolismo de Carboidratos	22
2.3. Consumo de Oxigênio e Incorporação da Glicose "In Vitro"	28

CAPÍTULO III

3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Grupos Experimentais	34
3.2. Fracionamento do Parotin	36
3.3. Sistemas Experimentais Empregados	36
3.4. Determinação do Consumo de Oxigênio por Manometria	39
3.5. Determinação da Incorporação de Glicose	39
3.6. Tratamento Estatístico	41

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS	43
4.1. Incorporação de Glicose	43
4.2. Consumo de Oxigênio	48

CAPÍTULO V

5. DISCUSSÃO	56
--------------------	----

CAPÍTULO VI

6. CONCLUSÕES	68
---------------------	----

CAPÍTULO VII

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
-------------------------------------	----

CAPÍTULO VIII

8. RESUMO	87
-----------------	----

CAPÍTULO IX

9. APÊNDICE	90
-------------------	----

CAPÍTULO I
INTRODUCÃO
- - - - -

1. INTRODUÇÃO

Numerosos trabalhos têm procurado ressaltar a importância fisiológica das glândulas salivares. A maioria deles refere-se à sua atividade exócrina. Contudo, o interesse em estudar-se as glândulas salivares como órgão de secreção interna tem crescido rapidamente a partir da década de cinquenta.

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 procurava relacionar as glândulas salivares com os órgãos endócrinos; em 1886, HARDIN descreveu casos clínicos que mostravam repercussões do estado gravídico sobre as glândulas salivares.

Em 1927, UTIMURA sugeriu que as glândulas parótidas do cão possuíam ação hipoglicemiante. Contudo, a hipótese de que as glândulas submandibulares e parótidas desempenhassem funções endócrinas, foi proposta somente em 1934, por OGATA, que postulou a teoria endócrina das glândulas salivares quando estudava o possível envolvimento dessas glândulas com o diabetes.

A partir de então, numerosos trabalhos fo

ram desenvolvidos, principalmente pela escola japonesa, na tentativa de isolar um princípio ativo que confirmasse esta hipótese.

Ao injetar, em coelhos, distintas frações obtidas de parótidas bovinas, OGATA et alii (1944 e 1945) observaram que uma delas acelerava o crescimento de tecidos duros e reduzia os níveis séricos de cálcio. Desta fração, foi obtida uma substância proteica que recebeu o nome de "Parotin". Sua cristalização, bem como a descrição de suas características químicas, devem-se a ITO & MYZUTANI (1952) e ITO (1954 e 1960).

Concomitantemente, TAKIZAWA (1954), OGATA (1955) e ITO (1960), demonstraram que as glândulas parótidas eram a principal fonte de secreção de uma substância por eles denominada "Hormônio Salivar Parotin", discretamente auxiliada pelas submandibulares, e que as glândulas sublinguais não participavam desta função.

Essa descoberta marcou época na história das glândulas salivares, chamando a atenção de numerosos estudiosos que procuravam inter-relacionar as funções destas glândulas com as demais do sistema endócrino. Assim, COHEN (1960) isolou, das glândulas submandibulares de camundongos, um fator de crescimento nervoso (NGF), que estimula o crescimento e a diferenciação de células nervosas sensitivas e simpáticas. Esse mesmo autor, em 1962, isolou, das glândulas submandibulares de ratos, um polipeptídeo, fator de crescimento epidermal (EGF), que acelera a erupção dos incisivos de ratos recém-nascidos.

Em poucas décadas, muitos outros fatores foram isolados de glândulas salivares; a maioria deles provenientes de glândulas submandibulares de camundongos machos. Entretanto, muitos desses fatores ocorrem também nas glândulas submandibulares de outras espécies.

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

Estes fatores têm sido agrupados em diferentes categorias: os que atuam sobre o crescimento e a diferenciação, e os relacionados com a homeostase, com a regulação intra-celular e com a digestão.

Os fatores de crescimento nervoso e epidermal podem desempenhar papel importante no processo de maturação mediado pelo hormônio tireoidiano. HAMBURCH et alii (1971) demonstraram que o retardo na abertura dos olhos e na erupção dental causada pelo hipotireoidismo, em ratos recém-nascidos, podem ser corrigidos, tanto pela administração de tiroxina, como de EGF. Essas observações levantaram a possibilidade do EGF ser responsável por muitas das manifestações do hormônio tireoidiano durante o processo de maturação.

O NGF é um dos mais estudados fatores de crescimento de origem da glândula submandibular. Duas formas já foram isoladas: " NGF " (2,55S) e " NGF " (0,75S), e um terceiro tipo parece ser secretado por células normais e neoplásicas em cultura (YONG et alii, 1975).

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

A descoberta do " EGF ", após 24 anos de intensas pesquisas na tentativa de demonstrar a utilização clínica desse fator, levou COHEN & LEVI MONTALCIN ao Prêmio Nobel de 1986.

Essas observações vem mais uma vez evidenciar a importância das glândulas salivares no sistema endócrino.

LEONORA & STERNMAN (1968) demonstraram a existência de um eixo endócrino hipotálamo-glândula parótida que faz parte da regulação hormonal do transporte de fluido dentinal (DFT). Após a liberação de um fator liberador hipotálamico, a glândula parótida secreta um hormônio, isolado e parcialmente caracterizado que estimula o transporte de fluido dentinal pela ativação de células odontoblasticas.

Dentre outros princípios ativos isolados das glândulas salivares, pode-se citar: fator hipertensivo (WERLE; VOGEL; GOLDEL, 1963); renina parcialmente purificada (WERLE; TRAUTSCHOLD; SCHMAL, 1963); fator de crescimento de células do tubo neural (ADLER & NARBAITZ, 1965); fator que estimula a proliferação de células epiteliais (JONES, 1966); fator de estimulação do crescimento de células mesenquimais e que causa diferenciação do tecido muscular e cartilaginoso (ATTARDI & SCHLESINGER, 1967); fator que promove linfopenia e atrofia do tecido linfóide (TAKEDA et alii, 1967); fator letal das glândulas

submandibulares, liberado quando se transplantavam essas glândulas para um hospedeiro (HOSHINO & LIN, 1968 e 1969); fator hemorrágico que promove hematoma local e intensa hemorragia sistêmica (LIN & HOSHINO, 1969); fator hiperglicemiante das glândulas submandibulares denominado "glucagon salivar" (LAWRENCE et alii, 1977) e fator hipoglicemiante designado "Insulin Like" (DOI et alii, 1978).

Em 1979, ARRUDA VEIGA isolou um peptídeo do extrato de glândulas submandibulares de camundongos, que provoca, além de poliúria e albuminúria, uma série de alterações nas estruturas renais.

Nos últimos anos, têm-se tentado isolar e caracterizar esses fatores de glândulas salivares. Assim, em 1980, HATAKEYAMA; HIRAMATSU; MINAMI purificaram um componente tóxico da saliva, indicando que o fator letal da glândula submandibular de camundongo é uma proteína exócrina com atividade semelhante à calicreína e que sua secreção na saliva é estimulada por agentes alfa-adrenérgicos.

Em 1984, GUIMARÃES; TEIXEIRA; CURY verificaram que o "Parotin" atua sobre o epidídimo do rato "in vitro" promovendo inibição da lipólise e redução na concentração de glicerol no meio de incubação, efeito este semelhante ao da insulina.

Em 1985, PINHEIRO isolou, de extrato bruto de glândula submandibular de camundongos machos, quatro frações diferentes de peptídeos ativos, que foram denominadas Sialotoxina I, II, III e IV, cujos efeitos estão sendo testados em diversos trabalhos realizados na disciplina de Fisiologia -

da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

TEIXEIRA; GUIMARÃES; CURY (1985) demonstraram que o Parotin reduz o nível glicêmico de animais diabéticos aloxânicos e aumenta a incorporação de glicose e o consumo de oxigênio pelo tecido adiposo, " in vitro ".

Todas estas descobertas vieram reforçar a hipótese de que as glândulas salivares possuem atividade secretora endócrina.

1.1. Proposição

O Parotin encontrado no comércio é um produto impuro, apresentando quatro bandas proteicas quando separado pela eletroforese em poliacrilamida.

Desse modo, propusemo-nos verificar, " In Vitro ", os efeitos das frações I, II, III e IV do Parotin sobre:

a) A incorporação de glicose pelo tecido adiposo de ratos normais e diabéticos;

b) O consumo de oxigênio pelo tecido adiposo do epidídimo de ratos normais e diabéticos.

C A P Í T L O I I

R E V I S T A D A L I T E R A T U R A

2. REVISTA DA LITERATURA

2.1. Atividades Biológicas do Princípio Ativo das Glândulas Salivares (Parotin)

A partir de 1952, quando ITO & MIZUTAMI descreveram as propriedades físico-químicas do princípio ativo das glândulas salivares, denominado Parotin, muitos pesquisadores passaram a estudar suas possíveis atividades biológicas.

Assim, TAKAOKA (1952) observou que a administração de Parotin, na dose de 10 mg /Kg de peso corporal, em ratos intactos, causava uma ligeira leucopenia, enquanto em ratos adrenalectomizados causava uma marcada leucocitose. O fato do Parotin atuar, diretamente, na função hematopoiética foi confirmado por TASAKA (1953) que também observou uma transitória diminuição, seguida de um acentuado aumento do número de leucócitos, após a injeção endovenosa de 25 mg/Kg de Parotin - em coelhos.

SATO (1953) verificou que, administrando-se 3 mg/Kg de peso de Parotin em ratos, via endovenosa, e 5 mg/Kg de peso, via subcutânea, causavam inibição da calcificação e deterioração da dentina, como, também, diminuição do seu crescimento.

Estudando a ação do Parotin na ossificação, SASAKI (1953), OKUDAIRA (1954) e ITO; TSURUFUKI; KUBOTA (1954), verificaram, em ratos, um aumento da calcificação e um cres-

cimento acelerado dos tecidos cartilagosos das epífises da tibia, articulação, septo nasal e osso alveolar.

Segundo TAKIZAWA (1954), o Parotin estimulava a proliferação das fibras elásticas da aorta, pele e certos tecidos mesenquimais, como: sistema retículo endotelial, tecido conjuntivo e órgãos hematopoiéticos.

ITO & ENDO (1956) demonstraram que o Parotin promovia o crescimento e a deposição de cálcio no osso, sugerindo que esse princípio ativo poderia estimular, diretamente, o desenvolvimento dos tecidos duros " In Vivo ".

FLEMING (1959), estudando a ação do Parotin no crescimento do fêmur, notou uma diminuição de células cartilagosas e uma intensa proliferação de osteóides. Também observou alterações na zona secretora do esmalte dos incisivos de camundongos.

ITO (1960) observou que doses de 0,3 mg/kg de peso, de Parotin, via endovenosa, em ratos e coelhos, provocavam aumento na calcificação dos incisivos e causavam hipertrofia da córtex da adrenal.

Também foram descritas por FLEMING (1960) e confirmadas por LAZARUS & SHEPHERAL (1969), alterações no esmalte, no desenvolvimento ósseo, nos ovários e nos testículos de camundongos, após a administração do Parotin.

Quanto ao metabolismo mineral, ITO (1960) observou, em ratos, que o Parotin diminuía, marcadamente, o nível de cálcio não ionizável, aumentava o nível de magnésio sérico e causava um aumento transitório de sódio e potássio.

Com relação ao metabolismo proteico, ITO & TSURUFUJI (1953) encontraram uma acentuada diminuição das proteínas totais no sôro de coelho, após a administração do Parotin.

Subsequentemente, YAMAGUCHI (1954) observou que a administração de Parotin em ratos causava uma acentuada diminuição das proteínas séricas e da quantidade de nitrogênio.

YUASA et alii (1957) demonstraram um aumento do consumo de oxigênio, pelo fígado de ratos, na presença de Parotin e afirmaram que essa substância acelerava o processo oxidativo do ciclo do ácido tricarboxílico e da fosforilação oxidativa.

Observando a relação entre o consumo de oxigênio e a síntese de ATP do homogeneizado de fígado de rato, YUASA (1957) observou que o Parotin não afetava a atividade da fosfatase alcalina no fígado, mas, diminuía sua atividade no sôro.

Quanto ao metabolismo lipídico, ARAI & YAGI (1958) observaram que o Parotin regulava a relação entre o colesterol livre e o colesterol esterificado, como, também, a relação do colesterol total e dos fosfolipídios do sôro.

ITO (1960), através de uma extensa revisão, confirmou que o Parotin e as substâncias semelhantes (Parotin - Like) encontradas na saliva, nas glândulas submandibulares e na urina, eram fisiologicamente ativas, diminuindo o nível de cálcio sérico em cobaias e, subsequentemente, aumentando o número de leucócitos circulantes, e promovendo a calcificação da den-

tina dos incisivos. Além disso, o Parotin tem sido usado, em humanos, nas enfermidades primárias resultantes das condrodistrofias fetais, doença de Kaschin-Beck's, artrites deformantes, espondilites e periodontites.

CHAUNCEY et alii (1963) verificaram que a dessalivação em ratos, induziu alterações morfológicas da cartilagem epifisária do fêmur e que essas alterações eram prevenidas pela administração do Parotin.

ITO; MORIWAKI; MORIYA (1965) demonstraram que os ratos sialoadenectomizados, apresentaram redução da placa cartilaginosa e atrofia das epífises da tíbia, mas os ratos sialoadenectomizados, que receberam injeções sub-cutâneas de Parotin, não mostraram essas alterações.

Estudando o efeito da administração do Parotin sobre o peso corporal de ratos sialoadenectomizados, OSORIO & KRAEMER (1965) observaram que o aumento de peso, nesses animais, pode ser conseguido por um efeito estimulador do Parotin, e que a ausência das glândulas salivares pode levar a profundas modificações da absorção e utilização dos alimentos.

TEIXEIRA et alii (1976) notaram que a sialoadenectomia retardava o desenvolvimento do tecido de granulação, em ratos. Esse efeito foi parcialmente inibido com uma dose de 0,15 mg/100 g de peso corporal de Parotin, injetado intraperitonealmente, e totalmente eliminado pela administração de 0,30 mg/100 g de peso corporal, o que causou um aumento do número de fibroblastos e da vascularização do tecido de granulação.

Mais recentemente, LUCIANO et alii (1986) investigando o efeito do Parotin no processo de regeneração óssea, observaram que os animais diabéticos apresentavam um retardo na proliferação de fibroblastos e na formação e maturação da matriz cartilaginosa. A administração de Parotin aos animais diabéticos acelerou o processo de regeneração óssea, apresentando resultados semelhantes aos observados nos animais normais.

2.2. Participação das Glândulas Salivares e do Parotín no Metabolismo de Carboidratos

As glândulas salivares, particularmente as glândulas parótidas, tem sido apontadas por diversos pesquisadores como participantes de atividades associadas ao metabolismo dos carboidratos.

UTIMURA (1927) e SEELIG (1928) observaram que a extirpação das parótidas do cão induzia a uma hipertrofia das Ilhotas de Langerhans e a um aumento do glicogênio hepático, sugerindo que estas glândulas tem ação hipoglicemiante.

FLAUM (1932) notou que, de 27 pacientes com hipertrofia da parótida, 21 eram diabéticos e 6 tinham predisposição ao diabetes.

Esses dados foram confirmados por ZIMMERMAN (1932) ao demonstrar, após a determinação da curva de tolerância à glicose, antes e após a ligadura dos ductos das parótidas, em cães, que essas glândulas exerciam alguma influência sobre o controle do metabolismo dos carboidratos, e que a ligadura dos ductos provocava um aumento da tolerância à glicose.

Entretanto, ROSENFELD (1933) sugeriu que a absorção da amilase, subsequente à ligadura dos ductos das parótidas, em cães, causava uma hipoglicemia que não estava relacionada à liberação de uma substância hipoglicemiante.

FERRATI (1936) e DOBREFF (1936) relataram

que a hipertrofia das glândulas parótidas, apresentada por alguns indivíduos, poderia ser um mecanismo de compensação à deficiência pancreática.

Analisando a influência do extrato de parótida na glicemia, BIRNKRANT (1941) e BIRNKRANT & SHAPIRO (1942), observaram que a administração prolongada desse extrato levava a uma degeneração das Ilhotas de Langerhans e a uma significante hiperglicemia.

Por outro lado, segundo GAULT (1954), a extirpação das glândulas parótidas, em ratos e camundongos, não provocava alterações significantes da glicemia, sugerindo que essas glândulas não desempenhavam funções importantes no metabolismo dos carboidratos. Em 1957, PARHOM; BABES; PETREA afirmaram que a administração do extrato de parótida em coelhos provocava uma prolongada hiperglicemia, e a administração desse mesmo extrato em pacientes com hiperinsulinismo, aumentava o nível glicêmico, sugerindo que o extrato de glândulas parótidas poderia possuir uma ação anti-insulínica.

Analisando uma possível relação entre as glândulas salivares e a tolerância à glicose, GODLOWSKY (1962) verificou que a remoção bilateral das glândulas submandibulares e sublinguais, em cães, produzia um significante aumento da sensibilidade à insulina nos testes de tolerância à glicose, e, também, um aumento do efeito hipoglicêmico da insulina circulante, concluindo que essas glândulas produzem um fator que, se removido, potencializa a ação da Insulina. Esse fator foi denominado Inibidor Submandibular da Insulina, mas não foi isolada. Posteriormente, GODLOWSKY (1968) e GODLOWSKY; GAZDA; WITHERS

(1971) verificaram que o extrato dessas glândulas, dialisado, fracionado eletroforéticamente e injetado endovenosamente, causa inibição da ação insulínica. Porém, a administração desse extrato em seres humanos portadores de diabetes, mostrava, em pelo menos três casos, completa remissão das manifestações clínicas do diabetes e o retorno da tolerância à glicose dentro dos padrões normais, o que vem confirmar, também, a existência de um fator com ação análoga à da insulina, produzido pelas glândulas submandibulares.

Mostrando, mais uma vez, a estreita relação entre hipertrofia e hiperplasia das glândulas parótidas e o diabetes, DAVIDSON; LEIBEL; BERRIS (1969) reafirmaram que o aumento das glândulas parótidas precede, em inúmeros casos, o diabetes, sugerindo que o teste de tolerância à glicose deve ser realizado, rotineiramente, em todos os pacientes com aumento assintomático dessas glândulas.

STEINBERG & GWINUP (1972) sugeriram que as alterações decorrentes nas glândulas salivares, poderiam ser uma forma de diagnosticar-se diferentes tipos de diabetes, e concluíram que o papel dessas glândulas, na patogênese e magnitude do diabetes melito, é obscuro.

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

não teria efeito direto sobre a ação da insulina.

Por outro lado, SILVERMAN & DUMBAR (1974) descreveram a existência de glucagon imunoreativo na glândula salivar de rato.

MYATA; YAMAMOTO; YAMAGUCHI (1976), afirmaram que a concentração plasmática de glucagon permaneceu normal em alguns pacientes que se submeteram à pancreatectomia.

LAWRENCE et alii (1975) isolaram 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 provocava um efeito comparável ao obtido com a administração de glucagon pancreático. O glucagon salivar diferiu do pancreático e do gastrointestinal por ser insolúvel em álcool e possuir maior peso molecular. Apresentava um efeito hiperglicêmico mais prolongado, e os estímulos básicos que aumentavam a secreção do glucagon pancreático promoviam também, a liberação do glucagon salivar. O glucagon extrapancreático é mais abundante no homem do que em roedores e cães. A glândula salivar humana, juntamente com a mucosa gastrointestinal, possivelmente, contribuem para manter o nível circulante de glucagon.

DUMBAR; SILVERMAN; KIRMAN (1977) também sugeriram que o glucagon salivar participava da resposta hormonal desencadeada pela ingestão de alimentos.

Foi demonstrado, experimentalmente, por KAKIZAKI et alii (1978), que, após uma pancreatite induzida em

ratos, as glândulas parótidas sofriam atrofia degenerativa e hipofunção, diminuindo o volume, o conteúdo enzimático e a concentração de bicarbonato na saliva da parótida. Essas alterações foram confirmadas em pacientes com pancreatite, os quais também apresentavam uma redução da atividade da parótida, restabelecida, após o tratamento, em associação com a recuperação pancreática. O mesmo autor concluiu que o pâncreas pode liberar uma substância que afeta a parótida por transmissão humoral e que esta substância pode ser liberada pela lesão pancreática.

Em 1979, GUIMARÃES et alii, propondo-se estudar os efeitos da parotidectomia sobre o nível glicêmico e o teor de glicogênio hepático em ratos, verificaram que a ausência dessas glândulas promovia um significativo aumento da glicemia, com conseqüente diminuição do glicogênio hepático.

Posteriormente, GUIMARÃES et alii (1980) demonstraram que a administração, intraperitonal, de uma única dose de Parotin (0,30 mg por 100 g de peso), em ratos diabéticos, normalizava o nível glicêmico, enquanto a concentração de glicogênio hepático tornava-se bastante aumentada.

DOI et alii (1978) detectaram, na saliva humana, um componente semelhante à insulina, denominado de "insulin-like" imunoreativa, cuja concentração era aumentada pela administração oral de glicose.

Pela técnica de filtração em gel imunoreativa, MURAKAMI; TANIGUCHI; BABA (1982) demonstraram a presen

ça de " Insulin-Like " no extrato de parótida, apresentando uma curva de diluição idêntica à apresentada pela Insulina . Além disso, confirmaram, " in vitro ", a biosíntese de " Insulin-Like ", na glândula parótida humana e de rato, utilizando-se de anticorpos anti-insulina. Esses achados sugerem que a glândula parótida pode ser uma fonte adicional extra-pancreática de insulina, mostrando mais uma vez um relacionamento entre as glândulas salivares e o sistema endócrino.

Em 1983, ANDERSON, estudando o crescimento da glândula parótida, em ratos diabéticos, demonstrou que o diabetes causava uma redução de DNA, RNA e proteínas totais como, também, um retardo no desenvolvimento dessa glândula, sendo que essas alterações eram revertidas pelo tratamento com insulina.

TEIXEIRA; GUIMARÃES; CURY (1985), estudando os efeitos do Parotin sobre a hiperglicemia de ratos diabéticos, demonstraram que este princípio ativo apresentou ação ao diminuir a hiperglicemia e que a intensidade e a duração de seu efeito foi diretamente proporcional à sua concentração até 0,60 mg/100 gramas de peso corporal.

2.3. Consumo de Oxigênio e Incorporação da Glicose " In Vitro"

Numerosos pesquisadores tem investigado o papel fisiológico de diversas substâncias e de inúmeros princípios ativos, no metabolismo de carboidratos de diferentes tecidos.

Dentre as diversas técnicas empregadas, a determinação do consumo de oxigênio, pelo sistema manométrico (WARBURG, 1972), e a incorporação de glicose " In Vitro " são frequentemente usadas.

Assim, em 1948, WERTHEIMER & SHAPIRO, estudando a atividade respiratória do tecido adiposo, " In Vitro "; observaram que a insulina estimulava a síntese de glicogênio e que o tecido adiposo de animais diabéticos não foi capaz de sintetizar glicogênio, sendo que esta alteração poderia ser revertida pela administração de insulina.

KRAHL (1951) observou que a glicose era utilizada, " In Vitro ", pelo tecido adiposo de ratos, e que a Insulina potencializava essa utilização. Demonstrou, também, que a insulina estimulava a oxidação da glicose e a deposição de glicogênio, provavelmente, pela ativação da glicoquinase, pois o mesmo efeito não foi observado na oxidação da frutose, nem na transformação do piruvato em glicogênio.

Em estudos comparativos do consumo de oxigênio pelo tecido adiposo e pelo diafragma de ratos normais, HAUGAARD & MARSH (1952) concluíram que a Insulina aumentava o

consumo de oxigênio, agindo, de forma semelhante, no tecido adiposo e no muscular esquelético.

Estudando a utilização de glicose pelo tecido hepático e adiposo, " In Vitro ", HAUSBERGER; MILSTEIN; RUTMAN (1954) verificaram que a insulina foi mais efetiva no tecido adiposo. Observaram, ainda, que o diabetes aloxânico inibia a lipogênese e diminuía a oxidação de carboidratos, e que a administração da insulina restaurava essas funções. Essas observações foram confirmadas por MILSTEIN & HAUSBERGER (1956), que concluíram ser o tecido adiposo um importante local de ação da insulina.

ITZHAKI & WERTHEINER (1957), observaram que o estudo nutricional dos animais pode influir na determinação da atividade metabólica e na sensibilidade à insulina em tecido adiposo, pois o consumo de oxigênio era aumentado pelo jejum prolongado, e o efeito da insulina, na incorporação de glicose pelo tecido adiposo, foi significativamente maior em ratos submetidos a 4 dias de jejum.

Isolando células adiposas do epidídimo de ratos, pela técnica da collagenase, ROBBELL (1964) verificou que o efeito da insulina, em aumentar a incorporação de glicose foi sensivelmente maior em células isoladas, as quais mantêm a capacidade de metabolizar a glicose e os triglicérides, além de responder à ação de diversos hormônios que afetam o seu metabolismo.

Estudando o papel da Insulina, no metabolismo da glicose, SALANS & DOUGHERTY (1971) verificaram que a sensibilidade das células adiposas à insulina depende do peso, do

estado nutricional e do crescimento do animal, e que a atividade da insulina, no metabolismo da glicose, era inversamente proporcional ao tamanho das células.

OLEFSKY (1976), observando o efeito da insulina em relação ao volume das células adiposas, verificou que a insulina era mais efetiva na oxidação da glicose nas células adiposas menores, e que o efeito máximo da insulina não deve ser somente relacionado, basicamente, ao processo de oxidação, mas também à variação do número de receptores nas células adiposas.

JEAJEAN; DEHEZ-DELHAYE; GOMMERS (1977), estudando o efeito da insulina sobre o metabolismo da glicose, no tecido adiposo de ratos, em relação à idade, demonstraram que na senescência há diminuição do metabolismo da glicose, porém, a insulina ativa significativamente o processo oxidativo da glicose, em todas as idades. Concluíram que a sensibilidade à insulina, no tecido adiposo de ratos, não é alterada pela idade.

Quanto ao mecanismo de ação da insulina na incorporação de glicose, CZECH (1977) demonstrou que o passo inicial da ação da insulina, nas células adiposas, é a sua ligação ao receptor específico presente na membrana plasmática. A reação subsequente na transmissão do sinal ao sistema efetor localizado na membrana plasmática, ou intracelularmente, não é bem conhecida. Poderiam estar envolvidos nesse mecanismo: movimento do receptor; acoplamento entre receptor-receptor ou receptor e efetor; interiorização da insulina; fosforilação de proteínas celulares; reações de oxiredução; movimentações iônicas.

cas e, ainda, um possível papel de produtos de degradação ou de um 2º mensageiro.

Foi descrito por CIARALDI & OLEFSKY (1979) que a cinética da ação da insulina, no transporte de glicose e no sistema AMPc, exhibe uma fase inicial de latência, de 40 a 50 segundos, e que a velocidade no processo de acoplamento entre a insulina e o receptor, é dependente da temperatura.

Segundo HARING; KEMMLER; HEPP (1979), a velocidade de ligação da insulina ao receptor é reduzida em células adiposas pré-tratadas com substâncias antimicrotubulares, sugerindo que o sistema microtubular estaria envolvido no processo de acoplamento, e que a fosforilação de microtúbulos poderia ser uma etapa na transmissão do sinal, após a ligação da insulina ao receptor.

Estudando o papel da insulina no transporte de glicose, SEALS; MAC DONALD; JARET (1979) concluíram que a associação da insulina, com seu receptor específico, poderia ativar um 2º mensageiro (ainda não identificado) e, desse modo, iniciar o recrutamento de vesículas intra-celulares. Este fato foi confirmado por CUSHMAN & WARDZALA (1980), os quais relatarem que a insulina estimulou o transporte de glicose em células adiposas, induzindo uma translocação dos sistemas de transporte de glicose, de seu " pool " específico intracelular para a membrana plasmática.

Em 1981, KARNIELI et alii, estudando o mecanismo de ação da insulina, confirmaram, mais uma vez, a existência de translocação dos sistemas de transporte de glicose como, também, demonstraram ser o processo de translocação in-

teiramente reversível e diretamente regulado pela concentração de insulina no meio.

Os estudos realizados por HARING; BIERMAN ; KEMMLER (1981), revelaram informações que possibilitam avaliar mais detalhadamente alguns dos modelos propostos para explicar o mecanismo de ação da insulina no transporte de glicose. Segundo esses autores, a insulina, ao ocupar o receptor, produz um sinal que desencadearia a fosforilação do sistema microtubular, o qual levaria à translocação de vesículas, contendo carreador, e à fusão destes com a membrana plasmática.

CAPÍTULO III
MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente trabalho foram utilizados 70 ratos machos (Rattus norvegicus, albinus, Wistar) com, aproximadamente, 3 meses de idade, pesando entre 150 e 200 gramas.

Os animais foram alimentados com ração balanceada padrão*, água "ad libitum" e, casualmente, distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais: Grupo I - Controle (normais) e Grupo II - Diabéticos (aloxânicos).

3.1. Grupos Experimentais

Grupo I - ratos controles (normais) - composto de 35 ratos, dos quais se retirou o tecido adiposo da cabeça do epidídimo para incubação.

Grupo II - ratos diabéticos aloxânicos - também constituído de 35 ratos, nos quais se administrou, via intraperitonal, após 12 horas de jejum (SOLOMON; BULKLEY; MAYER, 1974), aloxana** a 3% em solução salina hipotônica (NaCl 0,45% P/V), na dosagem de 150 mg/kg de peso, num volume máximo de 1,0 ml.

* Ração Balanceada Ceres, Piracicaba

** Monoidrato de aloxana - Carlo Erba

Em seguida à administração da aloxana, o alimento foi restituído aos animais e, com a finalidade de se prevenir eventuais hipoglicemias, foi colocada à sua disposição uma solução de glicose a 15%, a qual foi retirada depois de 24 horas (TOMITA, 1973). Com o objetivo de se evitar choques hiperglicêmicos, foi iniciada a administração de insulina prota^omino zincica (Lilly), via subcutânea, com 2 unidades, a cada 24 horas, durante 6 dias.

Após a suspensão da administração da insulina, a constatação da glicosúria foi feita pela técnica da glico-fita*.

Os animais, pertencentes aos dois grupos, após 24 horas de jejum, foram sacrificados, por decapitação, e o tecido adiposo da cabeça do epidídimo foi removido e mantido em sôro fisiológico a 4°C.

A seguir, os tecidos foram pesados e picotados (cerca de 400 mg) e incubados em frascos de Warburg, onde se analisaram sua capacidade oxidativa e a incorporação de glicose.

* Glico-Fita - Ely Lilly do Brasil Ltda.

3.2. Fracionamento do Parotin

A amostra comercial do Parotin, de procedência japonesa (Teikoku Hormone MFG.CO.Ltda. Japan), foi dissolvida em tampão tris-HCl 0,05 pH 7,6, cromatografada em coluna de Deae-Celulose e equilibrada com o mesmo tampão.

A eluição foi feita com gradientes de concentração de cloreto de sódio 0,1 M, 0,3 M e 0,6 M, respectivamente.

Foram obtidas 4 frações denominadas, respectivamente: Frações I, II, III e IV, cuja pureza foi avaliada pela eletroforese em gel de poliacrilamida (PINHEIRO, 1985).

3.3. Sistemas Experimentais Empregados

O sistema experimental para a determinação do consumo de oxigênio e da incorporação de glicose frente às diferentes frações do Parotin, tanto para animais do Grupo I (Contrôle), quanto para os do Grupo II (Diabéticos Aloxânicos), constou de (Tabela I):

a) Frasco nº 1 - Endógeno (5 ratos)

Meio de reação.	-	2,3 ml
Fragmentos de tecido	-	0,5 ml
H ₂ O q.s.p.	-	3,4 ml

b) Frasco nº 2 - Glicose (5 ratos)

Meio de reação	-	2,3 ml
Glicose	-	0,1 ml
Fragmentos de tecido	-	0,5 ml
H ₂ O q.s.p.	-	3,4 ml

c) Frasco nº 3 - Glicose + Insulina (5 ratos)

Meio de reação	-	2,3 ml
Glicose	-	0,1 ml
Insulina	-	0,1 ml
Fragmentos de tecido	-	0,5 ml
H ₂ O q.s.p.	-	3,4 ml

d) Frasco nº 4 - Glicose + Fração I (Parotin)
(5 ratos)

Meio de reação	-	2,3 ml
Glicose	-	0,1 ml
Fração I	-	0,5 ml
Fragmentos de tecido	-	0,5 ml

e) Frasco nº 5 - Glicose + Fração II (Parotin)
(5 ratos)

Meio de reação	-	2,3 ml
Glicose	-	0,1 ml
Fração II	-	0,5 ml
Fragmentos de tecido	-	0,5 ml

f) Frasco nº 6 - Glicose + Fração III (Parotin)

(5 ratos)

Meio de reação	-	2,3 ml
Glicose	-	0,1 ml
Fração III	-	0,5 ml
Fragments de tecido	-	0,5 ml

g) Frasco nº 7 - Glicose + Fração IV (Parotin)

(5 ratos)

Meio de reação	-	2,3 ml
Glicose	-	0,1 ml
Fração IV	-	0,5 ml
Fragments de tecido	-	0,5 ml

1- Meio de reação utilizado -- Krebs-Ringer
Fosfato pH= 7,4;

2- Glicose dissolvida em solução fisiológica numa concentração de 29 mg/ml;

3- Tecido gorduroso da cabeça do epidídimo, pesando em média 400 mg, correspondendo a um volume de 0,5 ml;

4- Frações do Parotin preparado em solução fisiológica numa concentração de 1,5 mg/ml;

5- Insulina simples (Lilly) 20 unidades - dissolvida em solução fisiológica numa concentração de 0,3 U/ml;

6- Foram adicionados, em todos os frascos, 0,2 ml de KOH (20%) no poço central do cadinho.

3.4. Determinação do Consumo de Oxigênio por Manometria

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

Através deste método clássico, analisou-se a capacidade oxidativa do tecido adiposo da cabeça do epidídimo na presença da glicose, glicose + insulina, glicose + as quatro frações do Parotin, separadamente.

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

Os valores expressos, indicando o consumo de oxigênio (microlitro/g de tecido/hora) dos diferentes ensaios biológicos, serão apresentados nos resultados, já subtraídos os valores obtidos do endógeno.

3.5. Determinação da Incorporação de Glicose

Após 90 minutos de agitação, à temperatura de 37°C, os fragmentos teciduais foram retirados dos frascos de Warburg e pesados. Baseado na diferença de concentração, entre a glicose introduzida inicialmente (1 mg/ml) e a glicose

3.6. Tratamento Estatístico

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

C. variação	GL
Tratamentos	nº de tratamentos - 5
Resíduo	Diferença (GL total - GL tratamentos)
Total	(nº de trat. X nº de Rep.) - 1

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

- onde: Δ = diferença mínima significativa
q = valor da amplitude total estudada
s = estimativa do desvio padrão residual
r = número de repetições

C A P Í T U L O I V

R E S U L T A D O S

4. RESULTADOS

4.1. Incorporação de Glicose ug/mg de tecido/hora

Através da análise de variância, observou-se que existem diferenças significativas, ao nível de 5% de probabilidade, na incorporação de glicose entre os diferentes ensaios biológicos, tanto para os animais normais, quanto para os diabéticos (Tabela I).

TABELA I- Valores calculados para o teste F, através da análise de variância e o coeficiente de variação (C.V.) dos dados obtidos da incorporação da glicose nos animais normais e diabéticos.

RATOS	F	C.V.
Normais	13,98 **	14,19
Diabéticos	56,11 **	7,66

** Significativo ao nível de 5% de probabilidade

Para os animais normais, o teste de Tuckey revelou que os efeitos das Frações II e III, do Parotin, sobre a incorporação de glicose, foram, significativamente, diferentes, ao nível de 5% de probabilidade, quando comparados com aqueles que continham somente glicose. Mostrou também, que a Fração II e a Fração III aumentaram a incorporação de glico-

se, pelo tecido adiposo, em 33,3 e 64,2%, respectivamente, em relação ao meio que continha apenas glicose, e que esse aumento não difere, significativamente, ao nível de 5%, daquele apresentado pela insulina.

Por outro lado, os valores obtidos pelos efeitos das Frações I e IV não diferiram, significativamente, do ensaio contendo apenas glicose, mostrando que essas frações não potencializaram, significativamente, a incorporação de glicose, embora a Fração IV tenha aumentado, em 21,1%, a incorporação em relação ao meio contendo apenas glicose (Tabela II, Tabela III e Tabela XIX do apêndice e Gráfico 1).

Desse modo, notou-se que nos animais do Grupo I, a incorporação de glicose, nos diferentes ensaios foi: meio com glicose, $1,23 \pm 0,21$; com glicose e insulina, $2,12 \pm 0,26$; com glicose, mais Fração I, do Parotin, $1,22 \pm 0,15$; com glicose, mais Fração II, $1,64 \pm 0,27$; com glicose, mais Fração III, $2,02 \pm 0,22$ e com glicose, mais Fração IV, do Parotin, $1,49 \pm 0,25$ microgramas/miligrama de tecido/hora.

Nos animais diabéticos (Grupo II), pela análise dos dados expressos na Tabela II e Tabela III, verificou-se que a incorporação de glicose, nos ensaios biológicos que continham a Fração II, a Fração III e a Fração IV, do Parotin, individualmente, foi, significativamente, maior quando comparada com o meio que continha somente glicose, apresentando, pois, um aumento de 89,4%; 122,1% e 76,9%, respectivamente.

Deve-se ressaltar que os valores obtidos

pela Fração II e Fração III não apresentaram diferenças significativas daqueles apresentados pelos efeitos da insulina, na incorporação de glicose de animais diabéticos.

Por outro lado, a Fração I, do Parotin, estatisticamente, não revelou ser efetiva na incorporação de glicose, pois não apresentou diferenças significativas quando comparado com os valores obtidos do meio que continha apenas a glicose, embora tenha apresentado um aumento de 20,1% (Tabela XIX do apêndice e Gráfico 1).

TABELA II- Incorporação de glicose.

ENSAIOS BIOLÓGICOS \ RATOS	NORMAIS	DIABÉTICOS
Glicose	c. 1,23 [±] 0,21	c. 1,04 [±] 0,20
Glicose + Insulina	a.b. 2,12 [±] 0,26	a. 2,52 [±] 0,37
Glicose + Fração I	c. 1,22 [±] 0,15	c. 1,25 [±] 0,26
Glicose + Fração II	b.c. 1,64 [±] 0,27	a.b. 1,98 [±] 0,15
Glicose + Fração III	a.b. 2,02 [±] 0,22	a.b. 2,31 [±] 0,44
Glicose + Fração IV	c. 1,49 [±] 0,25	b. 1,84 [±] 0,21
Diferença Mínima Significativa 5%	0,45	0,56

Valores médios e Diferença Mínima Significativa, da incorporação da glicose, "In Vitro", (ug/mg de tecido/hora), dos animais normais e diabéticos nos diferentes tratamentos.

Os tratamentos seguidos das mesmas letras não diferem, significativamente, ao nível de 5% de probabilidade entre os animais do mesmo grupo.

Os Valores de incorporação de glicose, nos diferentes meios foram: somente glicose, $1,04 \pm 0,20$; glicose e insulina, $2,52 \pm 0,37$; glicose mais Fração I, do Parotin, $1,25 \pm 0,26$; glicose e Fração II $1,98 \pm 0,15$; glicose e Fração III $2,31 \pm 0,44$ e glicose e Fração IV, do Parotin, $1,84 \pm 0,21$, com diferença mínima significativa de 0,56.

A mesma análise demonstrou, ainda, que, tanto para os animais diabéticos, quanto para os normais, não existem diferenças significativas entre os efeitos da insulina, Fração II e Fração III, do Parotin, na incorporação de glicose.

Observou-se, também, que a Fração III foi mais efetiva na incorporação de glicose, tanto para os animais do Grupo I, quanto do Grupo II, situando-se bem próxima dos valores obtidos pela ação da insulina (Tabela III).

TABELA III- Aumento da incorporação de glicose (em porcentagem) promovido pelas diferentes frações do Parotin, em relação ao meio contendo apenas glicose.

	INSULINA	FRAÇÃO I	FRAÇÃO II	FRAÇÃO III	FRAÇÃO IV
RATOS NORMAIS	72,3	-	33,3	64,2	21,1
RATOS DIABÉTICOS	142,3	20,1	89,4	122,1	76,9

RATOS NORMAIS

RATOS DIABÉTICOS

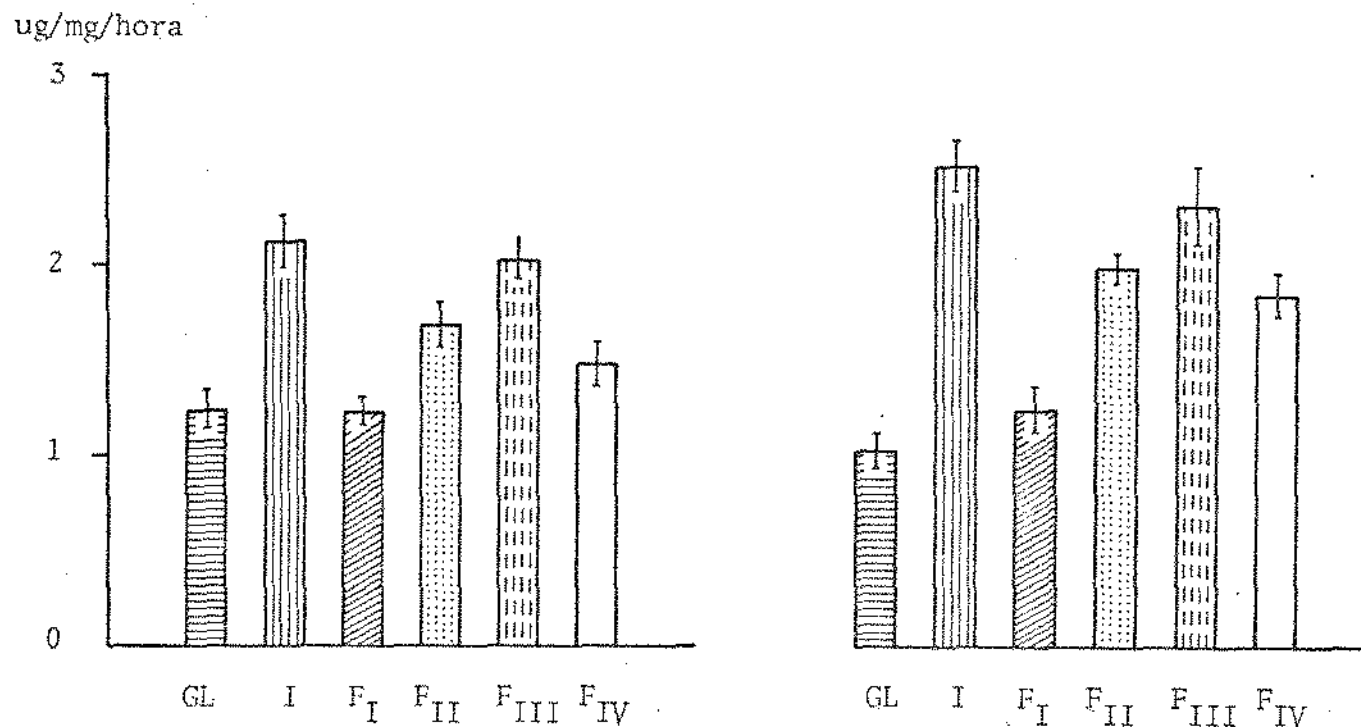


GRÁFICO 1:- Glicose incorporada (ug/mg de tecido/hora dos sistemas experimentais contendo glicose (GL); glicose + Insulina (I); glicose + Fração I (FI); glicose + Fração II (FII); glicose + Fração III (FIII) e glicose + Fração IV (FIV), com seus respectivos desvios padrões.

4.2. Consumo de Oxigênio (ul/g de tecido/hora)

A análise de variância, dos dados obtidos sobre o consumo de oxigênio dos diferentes ensaios biológicos, revelou que existem diferenças significativas, ao nível de 5% de probabilidade, entre os animais normais e os diabéticos (Tabela IV).

TABELA IV- Valores de F e coeficiente de variação (C.V.) dos ensaios analisados sobre o consumo de oxigênio por hora.

RATOS	F	C.V.
Normais	5,64**	14,35
Diabéticos	38,09**	8,72

** Significativo ao nível de 5% de probabilidade

As médias dos valores encontrados sobre o consumo de oxigênio, por hora, dos diferentes sistemas experimentais empregados, podem ser observadas na Tabela V.

Para os animais normais, o teste de Tuckey revelou que os efeitos das Frações (I, II, III e IV), do Parotín, no consumo de oxigênio, não diferem, significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, quando comparados com o meio contendo apenas glicose, pois o aumento no consumo de oxigênio apresentado pela insulina e pelas Frações (II, III e IV), não

atinge os 5% de probabilidade, sendo, respectivamente, de: 29,4%; 18,2%; 26,8% e 30,5% (Tabela VI).

TABELA VI- Aumento de consumo de oxigênio (em porcentagem), promovido pelas diferentes Frações do Parotin, em relação ao meio contendo apenas glicose.

	INSULINA	FRAÇÃO I	FRAÇÃO II	FRAÇÃO III	FRAÇÃO IV
RATOS NORMAIS	29,4	-	18,2	26,8	30,5
RATOS DIABÉTICOS	90,5	20,1	69,5	86,1	46,0

Os valores do consumo de O_2 pelo tecido gorduroso do epidídimo de ratos normais do sistema experimental foram: meio contendo somente glicose, $69,18 \pm 7,4$; com glicose e insulina, $89,60 \pm 7,5$; com glicose e Fração I, $61,00 \pm 7,7$; com glicose e Fração II, $81,80 \pm 10,1$; com glicose e Fração III, $87,84 \pm 14,4$ e com glicose e Fração IV, $90,38 \pm 14,6$. A diferença mínima, significativa, encontrada para este grupo, foi de 22,43 (Tabela V, Tabela XIX, do apêndice e Gráfico 2).

Para os animais diabéticos, utilizando-se o mesmo sistema experimental do Grupo I, encontraram-se os valores para glicose; glicose mais Insulina; glicose mais Fração I; glicose mais Fração II; glicose mais Fração III e glicose mais Fração IV, respectivamente, de: $92,96 \pm 14,8$; $177,00 \pm 11,7$; $111,64 \pm 6,2$; $157,60 \pm 14,7$; $172,80 \pm 11,7$ e $135,74 \pm 12,9$ microlitros, por grama de tecido, por hora.

Dessa forma, podemos notar que os valores a apresentados, através do teste de Tuckey, nos ensaios contendo Fração II, Fração III e Fração IV, diferem, significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, do ensaio contendo apenas glicose e mostram, ainda, que essas Frações aumentam o consumo de oxigênio em: 69,5%; 86,1% e 46,0%, respectivamente (Tabela VI).

TABELA V- Consumo de Oxigênio em ul/g de tecido/hora dos animais normais e diabéticos.

ENSAIOS BIOLÓGICOS \ RATOS	NORMAIS	DIABÉTICOS
Glicose	a.b. 69,18 \pm 7,4	c. 92,96 \pm 14,8
Glicose + Insulina	a. 89,60 \pm 7,5	a.177,00 \pm 11,7
Glicose + Fração I	b. 61,00 \pm 7,7	c.111,64 \pm 6,2
Glicose + Fração II	a.b. 81,80 \pm 10,1	a.b.157,60 \pm 14,7
Glicose + Fração III	a. 87,84 \pm 14,4	a.172,80 \pm 11,7
Glicose + Fração IV	a. 90,38 \pm 14,6	b.135,74 \pm 12,9
Diferença Mínima Significativa 5%	22,43	24,07

Valores médios e Diferença Mínima Significativa do consumo de oxigênio, "In Vitro".

(ul/g de tecido/hora) dos animais normais e diabéticos, cujo sistema experimental era constituído de glicose, glicose + insulina, glicose + Fração I, do Parotin, glicose + Fração II, glicose + Fração III e glicose + Fração IV, do Parotin.

Os tratamentos seguidos das mesmas letras não diferem, significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, entre os animais do mesmo grupo.

Além disso, pôde-se notar que os efeitos da Fração II e Fração III, no consumo de oxigênio, não apresentam diferenças significativas quando comparados ao efeito da Insulina.

Verificou-se, também, que a Fração I não apresentou aumento significativo no consumo de oxigênio, em relação ao meio contendo só glicose (apenas 20,1%) (Tabela V, Tabela VI, Tabela X do apêndice e Gráfico 2).

Os dados do consumo de oxigênio, em função do tempo de incubação, nos diferentes ensaios analisados, podem ser encontrados nas Tabelas XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XIX, XX, XXI, XXII e XXIII (apêndice).

Assim sendo, através dessa análise, observou-se que, para os animais normais (Grupo I), o efeito das Frações III e IV, sobre o consumo de oxigênio, quando comparado com o ensaio que continha somente glicose, foi mais efetivo que o das Frações I e II (embora não sendo significativo ao nível de 5%), enquanto que, no Grupo II (Diabéticos), a Fração III foi bem mais efetiva quando comparada às outras três, mais se aproximando dos valores obtidos com a Insulina.

A mesma análise demonstrou, também, que o consumo de oxigênio, apresentado pelos animais diabéticos, difere, significativamente, dos animais normais em todos os sistemas utilizados (Tabela V, VII e VIII).

Comparando-se os valores do consumo de oxigênio, entre os animais normais e diabéticos, média de 15 minutos, pôde-se notar que até no meio, contendo apenas glicose, o

consumo foi significativamente, maior nos animais diabéticos (Tabela VII e VIII).

TABELA VII- Valores calculados para o teste F, através da análise de variância e do coeficiente de variação (C.V.), dos dados obtidos do consumo de oxigênio entre os animais normais e diabéticos, frente aos diferentes tratamentos.

ENSAIOS BIOLÓGICOS	GLICOSE	GLICOSE+ INSULINA	GLICOSE+ FRAÇÃO I	GLICOSE+ FRAÇÃOII	GLICOSE+ FRAÇÃOIII	GLICOSE+ FRAÇÃOIV
F	8,38 *	69,57 **	56,11 **	102,98 **	76,34 **	35,23 **
C.V.	14,79	12,27	7,66	10,13	11,16	10,41

* - significativo ao nível de 10% de probabilidade

** - significativo ao nível de 5% de probabilidade

TABELA VIII- Valores médios do consumo de oxigênio, ul/g/15',
em média, entre os ratos normais e diabéticos.

ENSAIOS BIOLÓGICOS \ RATOS	NORMAIS	DIABÉTICOS
Glicose	b. 61,66	a. 80,98
Glicose + Insulina	b. 82,48	a. 161,44
Glicose + Fração I	b. 62,44	a. 90,12
Glicose + Fração II	b. 71,18	a. 139,74
Glicose + Fração III	b. 80,16	a. 151,62
Glicose + Fração IV	b. 79,86	a. 118,64

Os tratamentos, seguidos de letras diferentes diferem, significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, entre os animais normais e diabéticos.

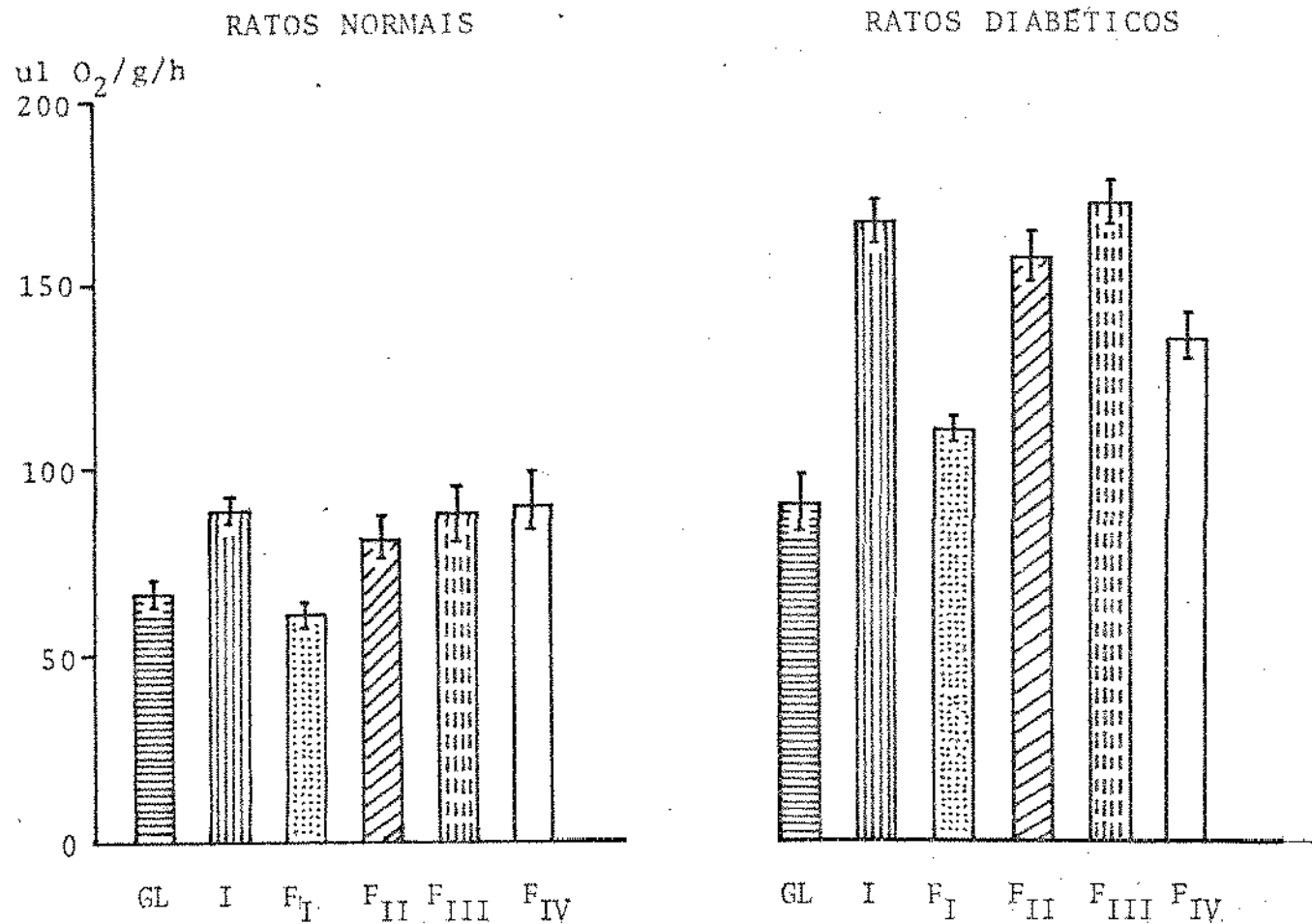


GRÁFICO 2:- Consumo de oxigênio (ul/grama de tecido/hora) dos sistemas experimentais contendo glicose (GL); glicose + Insulina (I); glicose + Fração I (F_I); glicose + Fração II (F_{II}); glicose + Fração III (F_{III}) e glicose + Fração IV (F_{IV}), com seus respectivos desvios padrões.

C A P Í T U L O V
D I S C U S S Ã O

5. DISCUSSÃO

Estudos " In Vitro " foram realizados a fim de se avaliar a influência das diferentes frações do Parotin na incorporação de glicose e no consumo de oxigênio pelo tecido adiposo de epidídimo de ratos, normais e diabéticos.

O sistema experimental utilizado para comparar os efeitos das quatro frações do Parotin, tanto no Grupo I (normais) quanto no Grupo II (diabéticos), constou de diferentes ensaios biológicos constituídos de: a) endógeno; b) glicose; c) glicose + Insulina; d) glicose + Fração I; e) glicose + Fração II; f) glicose + Fração III e g) glicose + Fração IV.

A análise de variância dos resultados referentes à incorporação da glicose (micrograma/mg de tecido/hora) indicou que existem diferenças estatisticamente significantes, ao nível de 5%, entre os diferentes ensaios biológicos, em ambos os grupos (Tabela I).

Pelo teste de Tuckey pode-se observar que os efeitos das Frações II e III do Parotin sobre a incorporação de glicose, no Grupo I foram significativamente diferentes ao nível de 5%, em relação ao meio contendo somente glicose. Por outro lado, as Frações I e IV, não foram tão efetivas, apresentando valores que não diferem significativamente daqueles apresentados apenas pela glicose (Tabela II, III e XIX do apêndice e Gráfico 1).

Nos animais diabéticos (Grupo II) observa-se que as Frações II, III e IV do Parotín mostraram ser efetivas em promover a incorporação de glicose, o mesmo não ocorrendo com a Fração I.

Este teste revelou, também, que os efeitos das Frações II e III do Parotín não diferem significativamente ao nível de 5%, daquele apresentado pela Insulina, tanto nos animais normais quanto nos animais diabéticos, mostrando que essas Frações apresentam efeito semelhantes ao da Insulina, na incorporação de glicose.

Todavia, a Fração III foi a mais efetiva, aumentando em 64,2% a incorporação de glicose em relação ao meio contendo apenas glicose no Grupo I e, em 122,1% nos animais diabéticos. Os valores apresentados pela Insulina foram de 72,3% e 142,3% respectivamente.

Ao observar-se os dados dos Grupos I e II em todos os ensaios apresentados na (Tabela III), nota-se que, tanto as Frações do Parotín quanto a própria insulina foram mais efetivos nos animais diabéticos. Este fato pode ser devido ao maior número de receptores apresentados pelos animais diabéticos em função da deficiência da Insulina.

Essas observações sugerem que, tanto a Insulina quanto as Frações do Parotín, principalmente as Frações II e III que mostraram maior atividade, agem facilitando o processo de difusão de glicose, através da membrana celular, provavelmente ativando o sistema transportador, ao nível de receptores celulares.

No que concerne ao consumo de oxigênio, a análise de variância revelou que existem diferenças significantes, ao nível de 5% de probabilidade, entre os animais normais e diabéticos (Tabela IV) permitindo avaliar através do teste de Tuckey as diferenças existentes entre os diversos ensaios biológicos.

Desse modo, nota-se nas Tabelas V e VI, que nos animais normais, os efeitos das Frações I, II, III e IV do Parotin e da insulina não diferem, significativamente, ao nível de 5% de probabilidade quando comparados com o meio contendo apenas glicose embora as Frações II, III e IV, e a insulina, tenham aumentado o consumo de oxigênio em: 18,24%; 26,8%; 30,5% e 29,4%, respectivamente.

Por outro lado, no Grupo II (diabéticos) as Frações II, III e IV, aumentaram, significativamente, o consumo de oxigênio, em relação ao ensaio contendo apenas glicose. A Fração I mostrou-se menos efetiva não apresentando diferença significativa.

Pela análise dos dados apresentados pode-se depreender, também, que o aumento do consumo de oxigênio apresentado pelas Frações II e III, não diferem significativamente daquele apresentado pela Insulina.

Além disso, outro dado relevante, refere-se ao fato do maior consumo de oxigênio apresentado pelos animais diabéticos, diferirem, significativamente, dos animais normais em todos os ensaios realizados (Tabela V).

Possivelmente, isso seja decorrência de al-

terações metabólicas provocadas pela deficiência de Insulina nos animais diabéticos, que podem aumentar a atividade respiratória a nível celular, ocasionando um aumento do consumo de oxigênio pois, nota-se que, até no meio contendo apenas glicose, o consumo foi, significativamente, maior nos animais diabéticos (Tabelas VII e VIII).

Das frações avaliadas, pertencentes ao Grupo II, a Fração III mostrou ser a mais efetiva no consumo de oxigênio, apresentando um aumento de 86,1% em relação ao meio contendo apenas glicose, aumento este comparável ao da Insulina que foi da ordem de 90,5%.

Desse modo, observa-se que, as Frações II e III do Parotin as quais mostraram-se mais efetivas, além de agir, ativamente, na incorporação de glicose, atuam também nos processo oxidativos aumentando o consumo de oxigênio, efeito este comparável ao da Insulina.

WINEGRAD & RENOLD (1958) comprovaram que a presença da insulina "In Vitro", têm mostrado uma marcante ação em estimular a incorporação da glicose e a conversão da mesma em lipídios, pelo epidídimo de rato, sem um aumento significativo da oxidação.

BALMAIN et alii (1950) e HAUGAARD & MARSH (1952), demonstraram "In Vitro" que a insulina aumenta o consumo de oxigênio em tecido adiposo, e que age de forma similar no tecido muscular esquelético.

OLEFSKY (1976), comparando o efeito da Insulina sobre células maiores, isoladas, de animais velhos

e obesos com células menores isoladas, de animais jovens e normais, observou que o efeito da insulina não deve estar relacionado, basicamente, com o processo de oxidação, mas sim, com a diminuição de receptores apresentada pelas células de animais obesos e idosos.

Os nossos resultados, com relação ao efeito das Frações do Parotin sobre a incorporação da glicose e consumo de oxigênio, são concordantes com aqueles de YUASA et alii (1955) e YUASA (1957) que observaram um aumento do consumo de oxigênio em homogenado de fígado. Além disso, esses autores, concluíram que o Parotin, primeiramente acelera o processo de oxidação do ciclo de ácido tricarboxílico e posteriormente a fosforilação oxidativa.

A confirmação das nossas observações pode ainda ser baseada nos resultados de AONUMA & YOSHIMURA (1954) e GUIMARÃES et alii (1979) onde os primeiros encontraram uma diminuição do piruvato sanguíneo, o que sugere um aumento do processo oxidativo e os outros, um aumento da taxa de glicogênio hepático após administração do Parotin.

Os resultados, referentes a atividade biológica das Frações do Parotin sobre o metabolismo de carboidratos, no que se refere a incorporação de glicose e consumo de oxigênio, embora em menores proporções, estão de acordo com aqueles observados por TEIXEIRA; GUIMARÃES; CURY (1985) com o Parotin bruto.

Por outro lado, HEPP; LANGLEY; FUNCK (1975) verificaram que animais com diabetes melitus, insulino-dependen

tes (Hamster Chinês) e ratos tratados com streptozotocin apresentam maior afinidade de ligação da Insulina a nível de receptor, que tem sido relacionado à hipo-insulinemia apresentada por esses animais.

PEDERSON; BECK-NIELSEN; HEDING (1978), demonstraram que a terapia com Insulina em indivíduos Insulino-dependentes, provocam um decréscimo na afinidade da Insulina a nível de receptor após 10 dias de tratamento, evidenciando que a variação do número de receptores pode ser precedida da mudança de afinidade do receptor.

FANTUS; RYAN; GORDEN (1981) também demonstraram que a ligação da Insulina a nível de receptor em monócitos circulantes, é maior em indivíduos diabéticos dependentes de Insulina, e que, após o tratamento com insulina, a ligação da Insulina a monócitos circulantes diminui significativamente. Esse decréscimo deve-se à diminuição da afinidade e ao número de receptores.

Esses dados podem justificar os resultados apresentados pelas frações do Parotin e pela própria Insulina em potencializar, efetivamente, a incorporação de glicose e o consumo de oxigênio nos animais diabéticos que nos normais.

Dessa forma, o número de receptores da Insulina, tem sido demonstrado, "In Vitro" e "In Vivo" ser inversamente proporcional à concentração de Insulina, de modo, que a Insulina é um dos fatores de regulação da concentração de seu próprio receptor.

Segundo GOMORI & GOLDNER (1943) e SOLOMON

et alii (1974) a aloxana produz necrose irreversível das células beta das Ilhotas de Langerhans do pâncreas, que se completa nas 48 horas seguintes à sua administração, persistindo por um período de 180 dias. Pode-se sugerir a hipótese de que a deficiência de Insulina possa ter induzido a um aumento do número e da afinidade dos receptores, nas células adiposas dos animais diabéticos.

As Frações II e III que foram as mais efetivas na incorporação da glicose talvez, apresentem semelhança estrutural à Insulina podendo dessa forma, agir no mesmo tipo de receptor celular, ativando o sistema transportador de glicose.

Estudos recentes revelam informações que possibilitam avaliar, mais detalhadamente, o mecanismo de ação da insulina no transporte de glicose. Assim, SEALS; MAC DONALD; JARETT (1979) sugeriram que a ligação da insulina com seu receptor específico, poderia ativar um 2º mensageiro e, desse modo, iniciar o recrutamento de vesículas intra-celulares contendo o sistema transportador de glicose. Essas vesículas poderiam migrar e se fundir com a membrana plasmática expondo o sistema transportador de glicose ao extracelular. A dissociação da insulina do seu receptor poderia reverter esse processo através de uma invaginação desses locais específicos da membrana plasmática, onde o transportador de glicose estaria ligado. Dessa forma, os sistemas de transporte seriam novamente movimentados no sentido inverso, em direção ao intra-celular.

Portanto, poder-se-ia fazer uma analogia entre o processo de exocitose envolvido na secreção de insulina e o processo de ativação do transporte de glicose sob a a-

ção da insulina, pois os efeitos da glicose induzindo secreção de insulina pelas células beta apresentam fatos análogos aos da insulina, ativando o transporte de glicose tais como: apresentar fase de latência; ser cálcio dependente; ATP dependente e envolver a ativação de microtúbulos.

KARNIELI et alii (1981) confirmaram mais uma vez a existência de translocação dos sistemas de transporte de glicose na célula adiposa isolada. Verificaram, também, que pequenas vesículas contendo o sistema de transporte de glicose podem reciclar, rápida e continuamente, entre o citoplasma e a membrana plasmática. No estado de repouso, a distribuição do sistema de transporte favoreceria a movimentação em direção ao compartimento citoplasmático e a insulina poderia influenciar essa distribuição, alterando as fases do processo de reciclagem, favorecendo o transporte em direção a membrana plasmática.

Segundo HARING; BIERMAN; KEMMLER (1981) a ativação do transporte de glicose ocorre antes da insulina penetrar na célula adiposa, não estando, portanto, relacionada à internalização da Insulina e que os eventos de ligação ao receptor e ativação do sistema transportador apresentam sensibilidades diferentes às mudanças de temperatura. O efeito da insulina no transporte de glicose a 37°C inicia-se em 40-50s, entretanto a interiorização da insulina só ocorre após 3 minutos e é dependente de ATP.

Esses autores, concluíram que a insulina ao ocupar o receptor desencadearia a fosforilação do sistema microtubular, que induz à translocação de vesículas contendo carrea

dor e a fusão destes com a membrana plasmática. Entretanto, se a ativação ocorrer de maneira análoga ao processo de exocitose, poder-se-ia esperar, que a desativação ocorresse de maneira inversa, por endocitose, e que a atividade basal de transporte poderia ser mantida por um equilíbrio entre endocitose e exocitose. Entretanto, estudos complementares sobre a ativação e desativação do processo de transporte de glicose, serão necessários para dar validade a esta hipótese.

Com intuito de melhor fortalecer o interrelacionamento das glândulas salivares com o metabolismo de carboidratos, outras considerações podem ser acrescentadas.

Assim sendo, estudos mais recentes tem demonstrado a existência de outros fatores nas glândulas salivares como por exemplo o Insulin-Like presente no extrato de parótida, que apresenta uma curva de diluição idêntica à apresentada pela Insulina e confirmaram "In Vitro", a biosíntese dessa substância na glândula parótida humana (MURAKAMI; TANIGUCHI; BABA, 1982). Esses mesmos autores, verificaram que esse polipeptídeo " Insulin-Like " das glândulas parótidas de ratos e de seres humanos é similar a insulina pancreática e que apresenta funções específicas na regulação da glicemia.

Em análises imunoquímicas, PHILLIP; SMITH; PATEL, (1984) verificaram que a população de células que produzem a " Insulin-Like " nas glândulas parótidas são encontradas principalmente, ao longo dos ductos intercalares e em menor quantidade nos acinos, não havendo participação dos ductos estriados e secretores. Observaram, também, que o Streptozotocin que promove acentuada destruição da célula beta pancreática-

ca, não atinge as células produtoras de " Insulin-Like " das glândulas parótidas.

Por outro lado, RINDERKNECHT & HUMBEL (1978) demonstraram a existência no plasma humano de fatores de crescimento semelhante à Insulina (IGF). Dois tipos de IGF já foram isolados do plasma humano o IGF-I e o IGF-II, que são polipeptídeos estrutural e funcionalmente semelhantes à insulina. O IGF-I e o IGF-II apresentam 50% da sequência de amino ácidos idêntica à da Insulina humana.

Segundo RECHLER et alii (1981) esses fatores apresentam " In Vivo " atividade biológica similar à da Insulina, incluindo a estimulação do metabolismo de glicose, síntese de DNA em cultura e transporte de amino ácidos.

Desse modo, pode-se observar que existem alguns pontos comuns entre o parotin, o " Insulin-Like " e os fatores de crescimento semelhante à Insulina (IGF), os dois primeiros possuem a mesma fonte de origem, sendo ambos produzidos em maior proporção pelas parótidas; e os três apresentam ações similares à Insulina. De sorte, que poder-se-ia levantar a hipótese de tratar-se das mesmas substâncias ou de substâncias semelhantes.

Para a confirmação dessas observações, seria necessário determinar-se a sequência de amino ácidos das Frações do Parotin para que pudessem ser melhor relacionados aos fatores já mencionados.

Restaria saber ainda, se o Parotin ou suas Frações seriam secretadas pelas glândulas parótidas em concen-

trações suficientes para que pudessem desempenhar, fisiologicamente, suas atividades biológicas.

De forma que, muitas das propostas e hipóteses levantadas neste trabalho, deverão ser esclarecidas com a realização de futuros estudos, mais profundos e complexos, no sentido de se obter novos conhecimentos, para subsequente aplicação prática.

C A P Í T U L O VI

C O N C L U S Õ E S

6. CONCLUSÕES

A análise e a discussão dos resultados obtidos permitem afirmar que:

1- As Frações do Parotin tendem a aumentar a incorporação de glicose e o consumo de oxigênio pelo epidídimo de ratos normais e diabéticos;

2- As Frações II e III revelam uma ação mais eficaz em aumentar a incorporação de glicose e o consumo de oxigênio, que as Frações I e IV;

3- A Fração III, foi a mais efetiva de todas, promovendo um aumento na incorporação de glicose e no consumo de oxigênio similar ao obtido com a Insulina;

4- As Frações do Parotin como também a Insulina, foram mais efetivas nos animais diabéticos do que nos normais, tanto na incorporação de glicose quanto no consumo de oxigênio.

C A P Í T U L O V I I

R E F E R Ê N C I A S B I B L I O G R Á F I C A S

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADLER, R. & NARBARTZ, R. Action of rat submaxillary gland extracts on neural tube growth in orgão culture. J.Embryol.exp.Morph., 14: 281-6, 1965.
2. ANDERSON, L.C. Effects of alloxan diabetes and insulin in vivo on rat parotid gland. Am.J.Physiol., 245: 431-7, 1983.
3. AONUMA, S. & YOSHIMURA, K. The studies on the salivary gland hormones. XXXI. Effect of Parotin on serum phosphate and bloode pyruvate. Jap.J.Pharm.Chem., 26: 743-58, 1954.
4. ARAI, Y. & YAGI, T. Protein and cholesterol metabolism. Clin.Endocr., 6: 108-16, 1958
5. ARRUDA VEIGA, M.C. Purificação e caracterização de um peptídeo de glândulas submandibulares de camundongos machos com atividade tóxica renal. Campinas, 1979. [Tese (Mestrado) - Instituto de Biologia - UNICAMP].
6. ATTARDI, D.C.; SCHLESINGER, M.J.; SCHLESINGER, S. Submaxillary gland of mouse: Properties of a purified protein affecting muscle tissue in vitro. Science, 156:

1253-5, 1967.

7. BALMAIN, J.H.; FRENCH, T.H.; FOLLEY, S.J. 1950. Apud HAUGAARD, N. & MARSH, J.P., op.cit.ref. 41.
8. BAST, E.M. & MILLS, K.S. Mouse submaxillary gland extract as a growth stimulator and orientor of chick cardiac cells in vitro. Growth, 72: 295-301, 1963.
9. BIRNKRANT, W.B. The influence of the parotid gland on blood sugar. J.Lab.clin.Med., 26: 1009, 1941.
10. _____ & SHAPIRO, R. The influence of a parotid, extract on the blood sugar and structure of the pancreas of the rat. J.Lab.clin.Med., 27: 510, 1942.
11. CARPENTER, G. & COHEN, S. Epidermal growth factor. A. Rev.Biochem., 48: 193, 1979.
12. CHAUNCEY, H.H.; KRANMAN, J.H.; SPINALE, J.J.; SHKLAR, C. Effect of partial desalivation and parotin administration on Hamster epiphyseal plate. J.dent.Res., 42: 894, 1963.
13. CIARALDI, T.P. & OLEFSKY, J.M. Coupling of insulin receptors to glucose transport: a temperature - dependent time lag in activation of glucose transport. Archs Biochem.Biophys., 193: 221-31, 1979.

14. COHEN, S. Purification of a nerve growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocitotoxic antiserum. Proc.natn.Acad.Sci.U.S.A., 46: 306-11 , 1960.
15. _____. Isolation of a mouse submaxillary gland protein incisor eruption and eyelid opening in newborn animal. J.biol.Chem., 237(5): 1552-62, 1962.
16. CUSHMAN, S.W. & WARDZALA, L.J. Potencial mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cells. J.biol.Chem., 255: 4758-62, 1980.
17. CZECH, M.P. Molecular basis of insulin action. A. Rev. Biochem., 46: 359-84, 1977.
18. DAVIDSON, D.; LEIBEL, B.S.; BERRIS, B. A symptomatic-parotid gland enlargement in diabetes mellitus. Ann.intern Med., 70: 31-8, 1969.
19. DOBREFF, M. Compensatory hypertrophy of the parotid gland in presence of hipofunction of pancreatic islands. Dt. med.Wschr., 62: 67-70, 1936.
20. DOI, K.; KAWARA, A.; FUJII, S.; MATSUURA, M.; YOSHIDA, Y.; KISAIA, Y.; YOSHIDA, M.; KANEKO, S.; BABA, S. Insulin-like substance in saliva. Iga Kunoayumi. 106: 477- 8, 1978.

21. DUMBAR, J.C.; SILVERMAN, H.; KIRMAN, E. Role of the submaxillary gland and of the kidney in the hyperglucagonaemia of eviscerated rats. In: FOA, P.P.; BAYAY, J. S.; FOA, N.L., eds. Glucagon: its role in physiology and clinical medicine. Berlin, Springer, 1977. p. 157-66.
22. FANTUS, G.I.; RYAN, J.; GORDEN, P. The Insulin Receptor in Insulin - Dependent Diabetes Mellitus: An In Vivo and In Vitro study. Metabolism, 30(5): 510-7, 1981.
23. FERRETI, G. Su due casi di ipertrofia, delle parotidi in diabetici. G.Clin.med., 17: 1149, 1936.
24. FLAUM, E. Parotishypertrophie ein symptom des Diabetes Mellitus. Klin.Wschr., 11: 1704, 1932.
25. FLEMING, H.S. Parotin and growth centers of femurs and incisors in mice. J.dent.Res., 38: 374-85, 1959.
26. _____. The effects of parotin in mice. Ann.N.Y. Acad. Sci., 85: 313-23, 1960.
27. GAULT, S.D. The effect of parotidectomy on blood sugar levels in the rat and mouse. J.Lab.clin.Med., 43: 119-22, 1954.
28. GLASMAN, F. Actividad endocrina de las glandulas salivares. Semana med., 10: 1287-90, 1964.

29. GODLOWSKY, Z.Z. Endocrine function of submaxillary glands
Archs Otolar., 75: 346-63, 1962.
30. _____. The role of submaxillary glands in homeostasis of
insulin. Diabetes, 17: 325-6, 1968.
31. _____; GAZDA, M.; WITHERS, B.T. Ablation of salivary
glands as initial step in the management of selected
forms of diabetes mellitus. Laryngoscope, 81(8): 1337-
58, 1971.
32. GOMORI, G. & GOLDNER, M.G. Production of diabetes melli-
tus in rats with alloxan. Proc.Soc.exp.Biol.Med., 54:
287-90, 1943.
33. GUIMARÃES, A.; TEIXEIRA, D.; CURY, J.A. Efeitos do Princí-
pio Ativo das Glândulas Salivares (Parotin) e de Insuli-
na sobre o metabolismo lipídico de ratos diabéticos.
Cienc.Cult., 36(7): 1194-8, 1984.
34. _____; _____; VIZIOLI, M.R.; VIEIRA, S. Efeitos da
parotidectomia sobre o nível glicêmico e o teor de gli-
cogênio hepático. Revta bras.Pesq.méd.Biol., 12(1): 53-
61, 1979.
35. _____; _____; _____; EL-GUINDY, M.M.; CURY, J.A.
Effects of salivary gland active principle (Parotin) on
glicaeamic level and hepatic glycogen content in aloxan-
diabetic rats. Archs oral Biol., 25: 11-3, 1980.

36. HAMBURG, M.; MENDOZA, L.A.; BURKART, J.F.; WEIL, F. Thyroid-dependent process in the developing nervous system. In: HAMBURG, M. & GARRINTON, E.J.W., eds. Hormones in development. New York, Appleton-Century, 1971. p. 100.
37. HARDIN, A. Connection between the parotid glands and the generative organs. Lancet, 1: 334, 1886.
38. HARING, H.V.; KEMMLER, R.R.; HEEP, K.D. Initial lag-phase in the action of insulin on glucose transport and cAMP levels in fat cells. FEBS Lett., 95: 177-80, 1979.
39. _____; BIERMANN, E.; KEMMLER, W. Coupling of insulin binding and insulin action on glucose transport in fat cells. Am.Physiol.Soc., : 556-65, 1981.
40. HATAKEYAMA, K.; HIRAMATSU, M.; MINAMI, N. Lethal factor in the male mouse submandibular gland. Can.J.Physiol. Pharmac., 59: 1134-38, 1980.
41. HAUGAARD, N. & MARSH, J.B. Effect of insulin on the metabolism of adipose tissue from normal rats. J. biol. Chem., 194: 33-40, 1952.
42. HAUSBERGER, F.X.; MILSTEIN, S.W.; RUTMAN, R.J. The influence of glucose utilization in adipose and hepatic tissue in vitro. J.biol.Chem., 208: 431-8, 1954.

43. HEPP, K.O.; LANGLEY, J.; VON FUNCKE, H.J. Increased insulin binding capacity of liver membranes from diabetic Chinese hamsters. Nature, 258: 154, 1975.
44. HOSHINO, K. & LIN, C.D. Transplantability of salivary glands of mice and its lethal effects on the host. Anat.Rec., 160: 474-5, 1968.
45. _____ & _____. Lethal factor released from submandibular grafts in mice. Can.J.Physiol.Pharmac., 46: 329-34, 1969.
46. _____; DECKER, R.F.; MOLNAR, F.; KIM, Y.T. Hypoglycaemic effects of salivary duct ligation upon diabetes mellitus in mice. Archs oral Biol., 21: 105-11, 1976.
47. ITO, Y. Biochemical studies on salivary gland hormone. Endocr.jap., 1: 1-50, 1954
48. _____. Parotin: a salivary gland hormone. Ann.N.Y. Acad.Sci., 85: 228-310, 1960.
49. _____ & ENDO, H. Studies on the salivary gland hormones in tissue culture. I-the effects of Parotin on the longitudinal growth and calcium deposition of chick embryo femora in vivo. Endocr.jap., 3: 106- 15, 1956.

50. ITO, Y. & MYZUTANI, A. Studies on the salivary gland hormone. J.pharm.Soc.Japan, 72: 239-44, 1952.
51. _____ & TSURUFUJI, S. Studies on the salivary gland hormone. XXIII. Effect of parotin on serum protein level. J.pharm.Soc.Japan, 73: 151-5, 1953.
52. _____; MORIWAKI, C.; MORIYA, H. Studies on the oral administration of saliva-parotin-A. II. Effect on the epiphyseal growth of tibia in rats. Endocr. jap., 12: 305-11, 1965.
53. _____; TSURUFUJI, S.; KUBOTA, Y. Studies on the salivary gland hormone. XXV. Effect of parotin on the distribution of radioactive ^{32}P in vivo. J.pharm.Soc. Japan, 74: 350-7, 1954.
54. ITZHAKI, S. & WERTHEIMER, E. Metabolism of adipose tissue in vitro: nutritional factors and effect of insulin. J.Physiol., 61: 72-8, 1957.
55. JEANJEAN, M.; DEHEZ-DELHAYE, M.; GOMMERS, A. Effet de l'age sur la réponse à l'insuline in vitro chez le rat. II. Metabolisme glucidique du tissu adipeux épидидymaire. Gerontology, 23: 127-33, 1977.
56. JONES, R.O. The in vitro effect of epithelial growth factor on rat organ cultures. Expl.Cell Res., 43: 645, 1966.

57. KAKIZAKI, G.; SASAHARA, M.; SOENO, T.; SHOJI, S.; ISHIDA-TE, T.; SENOO, A. Mechanism of the Pancreas - parotid gland Interaction. An Experimental Study In Parabiotic Rats. Am.Gastroenterol., 70: 635-44, 1978.
58. KARNIELI, T.E.; ZARNOWSKI, M.J.; HISSIN, P.J.; SIMPSON, I. A.; SALANS, L.B.; CUSHMAN, S.M. Insulin - stimulated. Translocation of Glucose Transport Systems in the Isolated Rat Adipose Cell. J.Biol.Chem., 256: 4772-7, 1981.
59. KRAHL, M.E. The effect of insulina and piteritary hormones on glucose, uptake in muscle. An.N.Y.Acad. Sci., 54: 649-70, 1951.
60. LAWRENCE, A.M.; KIRSTEIN, L.; HOJVAT, S.; RUBIN, L.; POLO YAN, V. Salivary gland glucagon; a potent extrapancreatic hyperglycemic factor. Clin.Res., 23: 563A, 1975.
61. _____; TAN, S.; HOJVAT, S.; KIRSTEIN, L.; MITTON, J. Salivary gland hyperglycaemic factor: an extrapancreatic source of glucagon-like material. Science, 195: 70-2, 1977.
62. LAZARUS, J.H. & SHEPHERD, J.B. The influence of parotin on serum calcium in rabbits. Archs oral Biol., 14: 87-90, 1969.
63. LEONORA, J. & STEINMAN, R.R. Evidence suggesting the

- existence of a hypothalamic-parotid gland endocrine axis. Endocrinology, 83: 807, 1968.
64. LIN, & HOSHINO, K. Hemorrhagic phenomena caused in the host mice by submandibular gland isografts from males. Proc.Can.Fed.Biol.Soc., 12: 8-21, 1969.
65. LUCIANO, E.; GUIMARÃES, A.; VIZIOLI, M.R.; TEIXEIRA, D. Effects of the salivary glands active principle (Parotin) on the Bone healing of alloxan diabetic rats. Cell.Molec., 32(1): 1-7, 1986.
66. MILSTEIN, S.W. & HAUSBERGER, F.X. Effects of glucose concentration and insulin in rat liver and adipose tissue. Diabetes, 5(2): 89-92, 1956.
67. MIYATA, M.; YAMAMOTO, Y.; YAMAGUCHI, M. Plasma glucagon after total resection of the pancreas in man. Proc. Soc.exp.Biol.Med., 152: 540-3, 1976.
68. MURAKAMI, K.; TANIGUCHI, H.; BABA, S. Presence of Insulin Like Immunoreactivity and its Biosynthesis in Rat and Human Parotid Gland. Diabetologia, 22: 358-61, 1982.
69. OGATA, T. Veber du innere sekretion der mundspeschel drusen. Transaction of the 9th. Congr.Far.East.Ass.trop. Med.Nanking, 2: 709-12, 1934. Apud OGATA, T., op.cit. ref. 70.

70. OGATA, T. The internal secretion of salivary glands. Endocr.jap., 2: 247-61, 1955.
71. _____; ITO, Y.; NAZAKI, Y.; OKABE, S. Studies on the salivary gland hormones. Reports I-XII. J.pharm. Soc. Japan , 64: 79-88, 114-26, 146-53, 325-40, 1944; ibid 65: 9-13, 1945. Apud OGATA, T., op.cit.ref. 70.
72. OKUDAIRA, S. Experimental studies on the effect of the salivary gland hormone (Parotin) upon the ossification of nasal septum of rat. Jap.J.Otol.Tokio, 58: 216-30, 1954.
73. OLEFSKY, J.M. The effects of spontaneous obesity on insulin binding, glucose transport and glucose oxidation of isolated rat adipocytes. J.clin.Invest., 57: 842-51, 1976.
74. OSORIO, J.A. & KRAEMER, A. Stimulative effect of parotin on the body weight of sialoadenectomized rats. Revta bras.Biol., 25(3): 233-6, 1965.
75. PARHOM, C.I.; BABES, A.E.; PETREA, I. Endocrinologie des glands salivaires. 1957. Apud GLASMAN, F., 1964, op. cit.ref. 28.
76. PEDERSON, O.; BECK-NIELSEN, H.; HEDING, L. Insulin receptors on monocytes from patients with ketosis-prone diabetes mellitus. Diabetes, 27: 1098-104, 1978.

77. PHILLIP, H.; SMITH, D.; PATEL, G. Immunochemical studies of the Insulin-Like material in the Parotid Gland of Rats. Diabetes, 33, 1984.
78. PINHEIRO, C.E. Caracterização química e Biológica das Si alotoxinas. Simpósio Anual da Academia de Ciência do Estado de São Paulo, X, 1985. Resumos. p. 17.
79. RECHLER, M.M.; NISSLEY, S.P.; KING, G.L.; MOSES, A.C.; VAN OBBERGHENSCHILLING, E.E.; ROMANUS, J.A.; KNIGHT, A.B.; SHORT, P.A.; WHITE, R.M. Multiplication stimulating activity (MSA) from the BRL 3A rat liver cell line: relation to human somatomedins and linsulin. J.Supramolec. Struct.Cell Biochem., 15: 253, 1981.
80. RINDERKNECHT, E. & HUMBEL, R.E. The amino and sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with pro insulin. J.biol.Chem., 253: 2769, 1978.
81. RODBELL, M. Metabolism of isolated fat Cells. I- Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. J. biol.Chem., 239(2): 375-80, 1964.
82. ROSENFELD, G. Speicheldrusen kohlehydrat sofff wechsel. Klin.Wschr., 12: 711, 1933. Apud BIRNKRANT, W.B. & SHAPIRO, R., op.cit.ref. 10.

83. SALANS, L.B. & DOUGHERTY, J.W. The effect of insulin by adipose cells of different size. Influence of cell lipid and protein content, age and nutritional state. J. clin. Invest., 50: 1399-410, 1971.
84. SASAKI, T. Chondrodystrophia foetalis. Acta paediat. jap., 57: 584, 1953. Apud ITO, Y., op.cit.ref. 48.
85. SATO, T. Effects of parotid gland extract upon calcification of dentine of rabbit. Gunma J. med. Sci., 2: 183-8, 1953.
86. SEALS, J.R.; McDONALD, J.M.; JARET, L. J. biol. Chem., 254: 6991-6, 1979.
87. SEELIG, S. Apud GLASMAN, F., op.cit.ref. 28.
88. SILVERMAN, H. & DUMBAR, J.C. The submaxillary gland as a possible source of glucagon. Bull. Sinai Hosp. Detroit, 22: 192-3, 1974.
89. SOLOMON, J.; BULKLEY, R.J.; MAYER, J. Effect of a low dose of alloxan on blood glucose, islet beta cell granulation, body weight, and insulin resistance of ob/ob mice. Diabetologia, 10: 709-15, 1974.
90. STEINBERG, T. & GWINUP, C. Effect of submaxillary gland extirpation on glucose and insulin tolerance in dogs.

Diabetes, 21(6): 722-32, 1972.

91. TAKAOKA, Y. Relation of the parotid gland to serum protein and malnutrition. Tohoku J.exp.med., 57: 11-6, 1952.
92. TAKEDA, T.; YAMASAKI, Y.; YAMABE, H.; SUZUKI, Y.; HAEBARA, H.; I RINO, T.; GROLIMAN, A. Atrophy of the lymphoid tissues of mice induced by extracts of the submaxillary gland. Proc.Soc.exp.Biol.Med., 126: 212-6, 1967.
93. TAKIZAWA, N. A pathological research of the internal secretion on the salivary glands. Acta path.jap., 4: 129-66, 1954.
94. TASAKA, S. Studies on the clinical uses of Parotin. Nipponrinsho, 11: 22-9, 1953. Apud ITO, Y., op.cit. ref. 48.
95. TEIXEIRA, D.; VIZIOLI, M.R.; GUIMARÃES, A. Effects of sialoadenectomy and parotin hormone on the development of rat sponge-induced granulation tissue. Acta anat., 94: 22-9, 1976.
96. _____; GUIMARÃES, A.; CURY, J.A. Effects of the Active Principle From Salivary Glands-Parotin - On the Glycaemia of Diabetic Rats. Arqs.Biol.Tecnol., 28(3): 363-9, 1985.

97. UTIMURA, S. 1927. Apud GLASMAN, F., op.cit.ref. 28.
98. WALKER, P.; WEICHSEL, M.E.JR.; HOATH, S.B.; POLAND, R.E.; FISHER, D.A. Effects of thyroxine, testosterone and corticosterone on nerve growth factor (NGF) and epidermal growth factor (EGF) concentrations in female mouse submaxillary gland. Dissociation of NGF and EGF response. Endocrinology, 109: 582, 1981.
99. WARBURG, O. In: Umbreit, W.W.; Burris, R.M.; Stauffer, J. F. Monometric and biochemical techniques. Minneapolis, Burgen Publ., 1972.
100. WERLE, E.; VOGEL, R.; GOLDEL, L.F. Veber ein blurdruchs- teigerndes Prinzip in Extrakten aus der Glandula subma- cillaris der Weissen Maus. Arch.exp.Patho. Pharmak., 230: 236, 1957.
101. _____; TRAUTSCHOLD, I.; SCHMAL, I. Veber ein Iso-en- zym des Renins una ueber die Isolierung eines biolo- gisch aktiven spalproduktes seines. Substrates. Hoppe- Seyler's z. physiol.Chem., 332: 79, 1963.
102. WERTHEIMER, E. & SHAPIRO, B. The physiology of adipose tissue. Physiol.Rev., 28: 451-63, 1948.
103. WINEGRAD, A.I. & RENOLD, A.E. Studies on rat adipose tis- sue in vitro. J.biol.Chem., 233(2): 267-76, 1958.

104. YAMAGUCHI, T. On the relation of the endocrine functions and the protein metabolism. Clin.Endocr., 2: 1022-6 1954.
105. YOUNG, M.; OGER, J.; ASDOURIAN, H.; AMOS, H.; AMASON, B. G.W. Secretion of nerve growth factor by primary chick fibroblast cultures. Science, 187: 361, 1975.
106. YUASA, H. Experimental studies on the absorptive function of the striated tubules of the salivary gland. Trans.Jap.path.Soc., 30: 244-56, 1940; ibid 31: 728-30, 1941.
107. YUASA, K. Experimental studies on the influence of parotin on metabolism. Folia endocr.jap., 33: 315-21, 1957.
108. _____; USHIKAWA, T.; YAMADA, N.; NINOMIYA, H.; TAKAOKA, Y. Effect of parotin on TCA-cycle. Naibumpi, 2: 10, 1955. Apud ITO, Y., op.cit.ref. 48.
109. ZIMMERMAN, L.M. Effect of ligation of the parotid ducts on the carbohydrate tolerance of normal dogs. Archs intern.Med., 49: 409, 1932.

De acôrdo com: ABNT - (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

C A P Í T U L O V I I I

R E S U M O

8. RESUMO

O presente trabalho foi realizado com a finalidade de se verificar, "In Vitro," os eventuais efeitos das diferentes Frações do princípio ativo Parotin, sobre a incorporação de glicose e o consumo de oxigênio pelo tecido adiposo do epidídimo de ratos normais e diabéticos.

Foram utilizados 70 ratos machos (Rattus, norvegicus, albinus, Wistar) com, aproximadamente 3 meses de idade, pesando entre 150 e 200 gramas, que foram aleatoriamente, distribuídos em dois grupos experimentais: Grupo I - Controle (normais) e Grupo II - Diabéticos (aloxânicos).

Os animais pertencentes aos dois grupos, após jejum de 24 horas, foram sacrificados, por decapitação, e o tecido adiposo da cabeça do epidídimo foi removido e mantido em soro fisiológico a 4°C. A seguir, os tecidos foram incubados em frascos de Warburg, afim de se determinar "In Vitro", o consumo de oxigênio, e a incorporação de glicose frente às diferentes Frações do Parotin.

O sistema experimental para a determinação do consumo de oxigênio e da incorporação de glicose para ambos os grupos, constou de:

- a) Endógeno (5 ratos)
- b) Glicose (5 ratos)

- c) Glicose + Insulina (5 ratos)
- d) Glicose + Fração I do Parotin (5 ratos)
- e) Glicose + Fração II do Parotin (5 ratos)
- f) Glicose + Fração III do Parotin (5 ratos)
- g) Glicose + Fração IV do Parotin (5 ratos)

Nas condições experimentais utilizadas verificou-se que as Frações do Parotin, principalmente a Fração II e a Fração III que mostraram maior atividade, aumentaram significativamente a incorporação de glicose e o consumo de oxigênio pelo epidídimo de ratos normais e diabéticos, enquanto que as frações I e IV foram menos efetivas.

Foi observado também que as Frações do Parotin e a Insulina foram mais efetivas em aumentar a incorporação de glicose e o consumo de oxigênio nos animais diabéticos.

C A P Í T U L O I X

A P Ê N D I C E

TABELA IX- Incorporação de Glicose em animais normais e diabéticos.

	TRATAMENTO RATOS	GLICOSE	GLICOSE + INSULINA	GLICOSE + FRAÇÃO I	GLICOSE + FRAÇÃO II	GLICOSE + FRAÇÃO III	GLICOSE + FRAÇÃO IV
NORMAIS	1	1,00	2,2	1,2	1,55	1,9	1,45
	2	1,30	1,8	1,0	1,56	1,8	1,70
	3	1,10	1,9	1,4	1,80	2,2	1,20
	4	1,2	2,3	1,3	1,30	2,3	1,30
	5	1,55	2,4	1,2	2,00	1,9	1,80
	Médias \pm s	\pm 1,23 \pm 0,21	\pm 2,12 \pm 0,26	\pm 1,22 \pm 0,15	\pm 1,64 \pm 0,27	\pm 2,02 \pm 0,22	\pm 1,49 \pm 0,25
DIABÉTICOS	1	1,35	2,80	1,20	1,98	2,40	1,80
	2	0,90	2,52	1,60	1,90	2,10	2,00
	3	0,85	2,74	0,90	1,80	2,60	1,70
	4	1,10	1,89	1,40	2,20	2,80	2,10
	5	1,00	2,65	1,15	2,00	1,68	1,60
	Médias \pm s	\pm 1,04 \pm 0,20	\pm 2,52 \pm 0,37	\pm 1,25 \pm 0,26	\pm 1,97 \pm 0,15	\pm 2,31 \pm 0,44	\pm 1,84 \pm 0,21

Valores obtidos da incorporação da glicose, "In Vitro", (ug/mg de tecido/hora), em presença de glicose, glicose + Insulina, glicose + Fração I, glicose + Fração II, glicose + Fração III e glicose + Fração IV, suas médias e respectivos desvios padrões.

TABELA X- Consumo de Oxigênio dos animais normais.

N O R M A I S	ENSAIOS BIOLÓGICOS \ TEMPO	15'	30'	45'	60'	75'	90'
	Glicose	bc 18,42	b 35,98	ab 57,68	ab 69,18	ab 92,38	b 100,28
Fração I	c 17,08	ab 44,20	b 52,00	b 61,00	b 87,00	ab 113,46	
Fração II	abc 22,38	ab 44,40	ab 60,32	ab 81,80	ab100,46	ab 116,52	
Fração III	ab 26,10	a 50,24	a 78,92	a 87,84	ab100,84	a 127,68	
Fração IV	a 27,24	a 49,72	a 75,30	a 90,38	ab109,94	a 126,72	
Insulina	abc 24,00	a 52,00	a 78,60	a 89,60	a 114,16	a 137,10	
Diferença Mínima Significativa	8,81	13,32	22,52	22,43	23,86	24,93	

Valores médios, Diferença Mínima Significativa, do consumo de oxigênio, "In Vitro", (ul/g de tecido), aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos, dos animais normais nos diferentes ensaios biológicos.

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

TABELA XI- Consumo de Oxigênio dos animais diabéticos.

D I A B E T I C O S	ENSAIOS BIOLÓGICOS \ TEMPO	15'	30'	45'	60'	75'	90'
	Glicose	b 22,1	c 48,10	d 72,32	c 92,96	c115,50	d 135,00
	Glicose + Fração I	b 23,90	c 51,74	cd 85,40	c111,64	c111,64	c 122,10
	Glicose + Fração II	a 42,04	a 92,60	ab118,34	ab157,60	ab194,62	b 233,26
	Glicose + Fração III	a 40,00	ab 87,20	ab133,48	a172,80	a211,86	ab264,28
	Glicose + Fração IV	ab 34,04	bc 65,66	bc106,16	b135,74	b169,36	c200,80
	Glicose + Insulina	a 42,04	ab 87,20	a136,00	a177,00	a215,00	a272,80
	Diferença Mínima Significativa	14,19	25,79	28,35	24,07	27,86	31,15

Valores médios, Diferença Mínima Significativa, do consumo de oxigênio, "In Vitro", (ul/g de tecido), aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos, dos animais diabéticos nos diferentes ensaios biológicos.

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

TABELA XII- Consumo de Oxigênio, em função do tempo de incubação em presença de glicose, em ratos normais.

T R A T A M E N T O						NORMAIS + GLICOSE	
R A T O S		1	2	3	4	5	MÉDIA \pm s_x^-
TEMPO EM MINUTO							
15		16,3	18,2	23,8	18,4	15,4	18,4 \pm 3,3
30		30,7	39,2	42,4	36,8	30,8	35,9 \pm 5,2
45		55,9	57,3	58,4	55,2	42,3	53,8 \pm 6,5
60		72,2	60,3	79,5	69,6	64,3	69,2 \pm 7,4
75		86,7	97,8	103,5	86,9	87,0	92,4 \pm 7,8
90		93,9	104,8	110,0	95,2	97,5	100,3 \pm 6,9

TABELA XIII- Efeito da Insulina sobre o consumo de Oxigênio (ul/g), em função do tempo de incubação em ratos normais.

T R A T A M E N T O						NORMAIS + GLICOSE + INSULINA	
R A T O S		1	2	3	4	5	MÉDIA \pm s_x^-
TEMPO EM MINUTO							
15		21,0	27,6	26,4	29,8	15,2	24,0 \pm 5,9
30		48,2	53,5	55,9	56,4	46,0	52,0 \pm 4,7
45		69,2	77,5	82,4	85,0	76,9	78,2 \pm 6,1
60		83,5	89,7	101,2	91,2	82,4	89,6 \pm 7,5
75		108,2	121,4	119,0	122,4	99,8	114,0 \pm 9,8
90		125,4	139,3	145,2	151,0	124,6	137,1 \pm 11,8

TABELA XIV- Efeito da Fração I sobre o consumo de Oxigênio, em função do tempo de incubação em ratos normais.

T R A T A M E N T O		NORMAIS + GLICOSE + FRAÇÃO I					
R A T O S		1	2	3	4	5	MÉDIA \pm s_x
TEMPO EM MINUTO							
15		17,6	23,1	14,7	14,2	15,8	17,1 \pm 3,6
30		46,4	52,2	40,8	37,9	43,7	44,2 \pm 5,5
45		54,9	56,6	51,0	44,7	52,8	52,0 \pm 4,6
60		65,6	69,3	56,9	49,9	63,3	61,0 \pm 7,7
75		91,4	94,7	85,2	73,4	90,3	87,0 \pm 8,3
90		123,2	128,0	106,0	103,8	106,3	113,4 \pm 11,2

TABELA XV- Efeito da Fração II sobre o consumo de Oxigênio, em função do tempo de incubação em ratos normais.

T R A T A M E N T O		NORMAIS + GLICOSE + FRAÇÃO II					
R A T O S		1	2	3	4	5	MÉDIA \pm s_x
TEMPO EM MINUTO							
15		23,8	26,2	24,8	21,3	15,8	22,4 \pm 4,0
30		46,2	52,4	42,7	45,1	35,6	44,4 \pm 6,1
45		56,8	70,6	56,5	55,8	61,9	60,3 \pm 6,2
60		91,5	90,0	78,6	66,3	82,6	81,8 \pm 10,1
75		113,9	109,4	96,5	91,5	91,0	100,5 \pm 10,5
90		120,8	126,5	113,0	104,8	117,5	116,5 \pm 8,2

TABELA XVI- Efeito da Fração III sobre o consumo de Oxigênio, em função do tempo de incubação em ratos normais.

T R A T A M E N T O NORMAIS + GLICOSE + FRAÇÃO III						
R A T O S	1	2	3	4	5	MÉDIA \pm s_x^-
TEMPO EM MINUTO						
15	17,0	27,5	23,6	30,3	32,1	26,1 \pm 6,0
30	38,3	52,4	48,4	46,6	65,5	50,2 \pm 9,9
45	58,2	73,3	65,5	114,1	83,5	78,9 \pm 21,8
60	78,0	82,5	74,6	86,1	118,0	87,8 \pm 14,4
75	93,6	107,3	103,4	106,2	141,0	110,3 \pm 18,0
90	113,5	123,1	119,2	122,5	160,1	127,7 \pm 18,5

TABELA XVII- Efeito da Fração IV sobre o consumo de Oxigênio, em função do tempo de incubação em ratos normais.

T R A T A M E N T O NORMAIS + GLICOSE + FRAÇÃO IV						
R A T O S	1	2	3	4	5	MÉDIA \pm s_x^-
TEMPO EM MINUTO						
15	26,8	30,0	31,1	24,7	23,6	27,2 \pm 3,2
30	52,3	58,7	54,0	45,3	38,3	49,7 \pm 8,0
45	75,0	83,0	84,9	72,0	61,6	75,2 \pm 9,3
60	109,9	94,5	91,6	86,5	69,4	90,4 \pm 14,6
75	125,9	110,0	111,3	117,4	85,1	109,9 \pm 15,2
90	143,4	125,0	132,6	131,8	100,8	126,7 \pm 15,9

TABELA XVIII- Consumo de Oxigênio, em função do tempo de incubação em presença de glicose, em ratos diabéticos.

T R A T A M E N T O							DIABÉTICOS + GLICOSE
R A T O S		1	2	3	4	5	MÉDIA \pm s_x^-
TEMPO EM MINUTO							
15		21,6	25,7	18,3	28,6	16,3	22,1 \pm 5,1
30		39,1	56,3	48,2	60,6	36,3	48,1 \pm 10,5
45		56,7	83,2	82,0	85,6	54,1	72,3 \pm 15,5
60		74,7	96,1	105,5	107,9	80,6	92,9 \pm 14,8
75		85,6	133,1	120,6	134,1	104,1	115,5 \pm 20,6
90		104,1	150,7	141,2	157,7	121,3	135,0 \pm 22,0

TABELA XIX- Efeito da Insulina sobre o consumo de Oxigênio (ul/g), em função do tempo de incubação em ratos diabéticos.

T R A T A M E N T O							DIABÉTICOS + GLICOSE + INSULINA
R A T O S		1	2	3	4	5	MÉDIA \pm s_x^-
TEMPO EM MINUTO							
15		32,2	40,4	39,8	52,0	45,6	42,0 \pm 7,3
30		79,3	85,4	81,0	98,0	92,3	87,2 \pm 7,8
45		115,7	138,0	126,5	150,0	149,8	136,0 \pm 14,9
60		166,9	178,0	164,2	192,4	183,5	177,0 \pm 11,7
75		200,6	218,4	209,2	224,8	222,0	215,0 \pm 9,9
90		256,5	278,0	268,3	291,8	269,4	272,8 \pm 13,1

TABELA XX- Efeito da Fração I sobre o consumo de Oxigênio, em função do tempo de incubação em ratos diabéticos.

T R A T A M E N T O		DIABÉTICOS + GLICOSE + FRAÇÃO I					
R A T O S		1	2	3	4	5	MÉDIA \pm s_x
TEMPO EM MINUTO							
15		19,7	21,9	25,8	24,3	27,8	23,9 \pm 3,2
30		44,1	47,6	53,6	54,1	59,3	51,7 \pm 5,9
45		79,6	84,3	87,7	80,8	94,6	85,4 \pm 6,0
60		106,2	111,7	115,3	105,1	119,9	111,6 \pm 6,2
75		111,6	122,3	129,1	121,3	126,2	122,1 \pm 6,6
90		135,6	150,7	146,1	145,2	152,6	146,0 \pm 6,6

TABELA XXI- Efeito da Fração II sobre o consumo de Oxigênio (ul/g), em função do tempo de incubação em ratos diabéticos.

T R A T A M E N T O		DIABÉTICOS + GLICOSE + FRAÇÃO II					
R A T O S		1	2	3	4	5	MÉDIA \pm s_x
TEMPO EM MINUTO							
15		48,3	32,3	53,9	40,3	35,4	42,0 \pm 8,9
30		109,1	112,0	101,9	79,1	60,9	92,6 \pm 21,9
45		135,1	104,9	132,9	116,7	102,1	118,3 \pm 15,5
60		169,5	148,1	176,5	151,7	142,2	157,6 \pm 14,7
75		214,0	178,9	215,5	189,8	174,9	194,6 \pm 19,2
90		242,4	216,1	254,1	221,2	232,5	233,3 \pm 15,5

TABELA XXII- Efeito da Fração III sobre o consumo de Oxigênio (ul/g), em função do tempo de incubação em ratos diabéticos.

T R A T A M E N T O		DIABÉTICOS + GLICOSE + FRAÇÃO III					
R A T O S		1	2	3	4	5	MÉDIA \pm $s_{\bar{x}}$
TEMPO EM MINUTO							
15		39,0	52,5	34,4	48,6	25,5	40,0 \pm 10,8
30		75,1	98,1	100,6	92,3	69,9	87,2 \pm 13,8
45		117,9	152,8	149,2	131,7	115,8	135,5 \pm 17,16
60		160,6	185,8	181,6	175,6	160,7	172,9 \pm 11,72
75		199,5	222,6	225,7	208,4	203,1	211,86 \pm 10,93
90		244,7	281,9	283,4	263,2	248,2	264,3 \pm 18,16

TABELA XXIII- Efeito da Fração IV sobre o consumo de Oxigênio (ul/g), em função do tempo de incubação em ratos diabéticos.

T R A T A M E N T O		DIABÉTICOS + GLICOSE + FRAÇÃO IV					
R A T O S		1	2	3	4	5	MÉDIA \pm $s_{\bar{x}}$
TEMPO EM MINUTO							
15		27,3	41,3	35,3	31,1	35,2	34,0 \pm 5,2
30		49,8	76,6	60,6	60,4	80,9	65,6 \pm 12,8
45		83,8	117,0	106,6	100,5	122,9	106,2 \pm 15,2
60		118,6	146,5	135,2	128,5	149,9	135,7 \pm 12,9
75		150,1	174,0	180,1	176,9	165,7	169,4 \pm 12,0
90		178,3	208,3	221,4	195,4	200,6	200,8 \pm 15,9