

EFEITO MITOGÊNICO DA TESTOSTERONA NOS DUCTOS GRANULOSOS DA GLÂNDULA SUBMANDIBULAR DO CAMUNDONGO MACHO CASTRADO

Luiz Carlos Bruschi^a
Flávio Fava de Moraes^b

RESUMO

A hipertrofia celular é o mecanismo aceito para a recuperação dos ductos granuloses de camundongos machos castrados, tratados com testosterona (T). No presente trabalho, foi possível demonstrar, que, similarmente ao descrito para outros órgãos-alvo da T, os ductos granuloses respondem, durante sua recuperação por tratamento com T, através de mecanismos não apenas hipertrófico, mas também por atividade hiperplásica.

PALAVRAS-CHAVE: Glândula submandibular; Testosterona; Mitose.

1-INTRODUÇÃO

A glândula submandibular do camundongo mostra, em animais adultos, dimorfismo sexual¹⁰, sendo um dos componentes do parênquima – o ducto granuloso – mais desenvolvido no macho²⁴, o responsável direto por este dimorfismo.

A literatura subsidia convincentemente que estes ductos são órgãos-alvo de hormônios androgênicos. Realmente, a glândula submandibular do camundongo adulto, quando castrado, torna-se semelhante à da fêmea¹⁶, enquanto que, fêmeas normais injetadas com testosterona, mostram um padrão estrutural equivalente ao de camundongo macho⁷.

A recuperação dos ductos granuloses, atrofiados por castração, após tratamento com testosterona, foi seqüenciada em alguns trabalhos que se basearam mais especificamente na alteração do diâmetro dos ductos granuloses¹⁶ ou nas modificações ultraestruturais destas células⁴, em vários intervalos de tempo após a injeção de testosterona.

Alguns autores descrevem observações de mitoses em ductos granuloses de animais machos castrados^{11, 16} ou de fêmeas⁷, após a administração de testosterona. No entanto, CHRÉTIEN⁵ afirma ser o efeito da testosterona nos ductos granuloses, proeminentemente hipertrófico, ao mesmo tempo em que é desprezível a atividade hiperplásica.

MAINWARING¹⁴, ao estabelecer um mecanismo geral da ação da testosterona em órgãos-alvo, correlaciona o efeito mitogênico à testosterona, e especifica que seria dentre os efeitos, o mais tardio desencadeado pela testosterona.

Em vista de serem os ductos granuloses da glândula submandibular estruturas-alvo de andrógenos, é intuito do presente trabalho analisar de forma mais concludente, se a testosterona promove ou não, nesta estrutura, efeito mitogênico, e quando, após um único pulso de testosterona, este efeito é mais proeminente.

2-MATERIAL E MÉTODOS

Para a análise do possível efeito mitogênico da testoste-

rona nos ductos granuloses da glândula submandibular, 32 camundongos de 70 dias foram utilizados, subdivididos em 4 animais para cada um dos seguintes grupos:

CN - grupo controle normal, constituído de animais intactos, que receberam, 48 horas antes do sacrifício, uma injeção de óleo de amendoim (0,1 ml).

CC - grupo controle castrado, constituído de animais orquiectomizados ao 21º de vida e mantidos por mais 50 dias nesta condição, para se conseguir a máxima atrofia dos ductos¹⁵, 48 horas antes do sacrifício receberam dose única de óleo de amendoim (0,1 ml).

T - grupo castrado-tratado, composto de animais nas mesmas condições do grupo anterior (CC), e que receberam ao 70º dia de vida, uma única dose (5 mg/0,1 ml de óleo de amendoim) de propionato de testosterona (Neo-hombreol^R, organon).

Os animais deste grande grupo foram subdivididos em 6 grupos, cada um sacrificado num tempo diferente após a administração de testosterona. Por isto, à letra T segue-se um número, que indica, em horas, quanto tempo após a

injeção do hormônio foi sacrificado o animal. Desta forma, temos os grupos: T 2, T 24, T 48, T 72, T 120, T 168.

Todas as injeções foram subcutâneas na região cervicollateral. Os animais receberam água e alimento à vontade durante o experimento e, após prévio jejum de 12 horas, foram sacrificados por deslocamento cervical.

Todos os animais receberam por 1 hora e 30 minutos antes do sacrifício, uma dose de colchicina (1,5 µg/g de peso corporal), com o intuito de bloquear as mitoses em metáfase. O controle da ação da colchicina foi feito pela observação do segmento de duodeno de cada animal.

As glândulas submandibulares foram fixadas em formol-salina 0,1M e incluídas em parafina. Cortes de 7 µm de espessura foram submetidos à reação de Feulgen para DNA, segundo LILLIE & FULMER¹³, fazendo-se uma coloração de fundo com "fast-green" 0,1% durante 30 segundos, com a finalidade de facilitar a evidênciação dos ductos granuloses.

Recebido em 06/10/87

^a Departamento de Histologia - CCB/UUEL

^b Departamento de Histologia e Embriologia - Universidade de São Paulo.

O índice mitótico dos ductos granulosos foi determinado pela contagem de 4.000 células para cada grupo de animais (1.000 células por animal) sendo anotadas as que se encontravam em mitose. A contagem procedeu-se num aumento final de 800X em campos escolhidos aleatoriamente.

Um segmento da glândula direita de cada animal foi retirado para o estudo morfológico de melhor resolução. Este material foi processado para inclusão em araldite, segundo SIMIONESCU & SIMIONESCU²¹ (Cortes de 0,5 µm foram obtidos deste material, e foram corados por uma mistura de azul II e azul de metileno à quente, segundo RICHARDSON et alii¹⁸).

3 - RESULTADOS

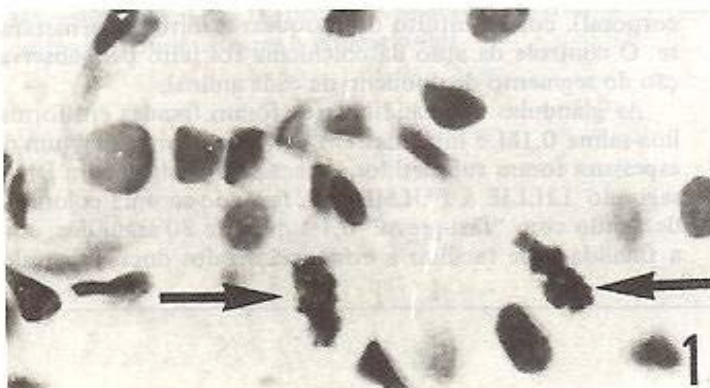
3.1 - Morfológico

A observação dos cortes de 0,5 µm de glândulas submandibulares incluídos em araldite nos possibilitou observar que as células dos ductos granulosos mantêm grânulos de secreção durante o processo de divisão celular (Figs. 2, 3, 4, 5 e 6).



3.2 - Índice Mitótico

Os valores dos índices mitóticos dos ductos granulosos nos vários grupos de animais estão indicados na tabela 1, e foram obtidos de material incluído em parafina e submetidos à reação de Feulgen para DNA (Fig. 1) :



4 - DISCUSSÃO

Embora na literatura, a descrição dos efeitos da testosterona em ductos granulosos esteja restrita à hipertrofia destes segmentos e esparsas visualizações de mitoses^{11, 16}, em nosso trabalho demonstramos que já após 12 horas da administração da testosterona, os ductos apresentam um índice mitótico aumentado (15 vezes), quando comparado com animais normais, e que, nova onda mitótica se repete com maior intensidade (50 vezes) 48 horas após a injeção. Nos tempos subseqüentes analisados, a atividade proliferativa nestes ductos retorna ao índice de animais controle-normais.

A ação mitogênica da testosterona em próstata e vesícula seminal, se manifesta em dois picos distintos, só que, nestes órgãos, o primeiro pico, de grande amplitude, ocorre ao segundo dia e outro, de pequena intensidade, ocorre ao quarto dia após o estímulo hormonal²⁵. Nas glândulas submandibulares, nosso experimento mostra que a atividade mitogênica da testosterona é precoce e inversa, aparecendo um pico mitótico, de pequena amplitude, às 12 horas e, um segundo pico, de grande amplitude, ao segundo dia. No entanto, similarmente ao descrito para outros órgãos-alvo da testosterona^{8, 12, 19, 25}, o maior pico mitótico ocorre no 2º dia após o estímulo hormonal.

O aparecimento de mitoses já em 12 horas após o estímulo androgênico, em parte pode ser explicado pela capacidade da testosterona de encurtar todas as fases do ciclo celular, principalmente regulando G1²⁵.

Realmente, quando comparada a outros órgãos-alvo de andrógenos, a glândula submandibular do rato mostra, quando estimulada pela testosterona, um rápido incremento na síntese de DNA^{2,22}.

Fato importante a ser verificado é se ocorre, após estímulo androgênico, no ducto granuloso, síntese *de novo* de mRNA, para enzimas envolvidas na replicação, visto que a testosterona induz DNA polimerase e uma isoenzima da timidina-quinase¹⁷. Ressalte-se que a síntese *de novo* de mRNA pode não ser um requisito obrigatório para a indução de mitoses pela testosterona⁶.

De qualquer forma, o efeito mitogênico da testosterona, considerado tardio por MAINWARING¹⁴, mostra-se precoce nos ductos granulosos, embora com um índice discreto. Porém, mesmo em outros órgãos-alvo, o índice mitótico andrógeno-induzido é bastante variável, atingindo alto valor na vesícula seminal, valores médios na próstata e índices muito baixos no epidídimo².

Contudo, não há dúvida que a testosterona e, especificamente a 5- α -dihidrotestosterona possuem efeito mitogênico^{3, 9, 20}, pois a utilização de antiandrogênio, como o acetato de ciproterona previne este fenômeno²³.

Aliando observações das mitoses com a recuperação hipertrofica que observamos no material incluído em araldite, podemos dizer que a recuperação do ducto granuloso atrofiado por castração, após estímulo androgênico, se inicia 12 horas após a administração de testosterona, com uma resposta hiperplásica. 48 horas após a injeção são importantes tanto as respostas de hiperplasia quanto as de hipertrofia. A recuperação dos ductos completa-se 120 horas após o estímulo hormonal, quando não há nenhuma atividade mitótica excepcional, mas as células mostram o máximo de hipertrofia.

Resultado importante obtido na fase hiperplásica-hiper-

trófica (48 horas) de recuperação dos ductos granulados, está no fato de que as células em divisão apresentam, simultaneamente, considerável quantidade de grânulos no citoplasma (ver Figs. 5 e 6). Este fato demonstra que as células não necessariamente se desdiferenciam para se dividir, à semelhança do que foi descrito para outros órgãos, como por exemplo, o pâncreas exócrino¹.

5 - CONCLUSÕES

- 1 - A recuperação dos ductos granulados da glândula sub-

mandibular de camundongos castrados, por ação da testosterona se manifesta por reações hipertróficas e hiperplásicas.

2 - Esta recuperação mostra distintas fases após o estímulo androgênico: uma fase inicial hiperplásica; uma fase intermediária hiperplásica-hipertrófica; e uma fase tardia hipertrófica.

3 - Na divisão celular, especialmente na fase hiperplásica-hipertrófica, as células não se desdiferenciam para se dividir, mantendo, durante a mitose, considerável quantidade de grânulos de secreção em seu citoplasma.

ABSTRACT

Cell hypertrophy is the accepted mechanism for the recovery of the atrophied granulated ducts of the castrated male mice subject to testosterone (T) treatment. In this paper, it was possible to demonstrate a mitogenic effect of T on the atrophied granulated ducts of the submandibular gland of castrated mice, similar to other target organs.

KEY WORDS: Submandibular gland; Testosterone; Mitosis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHAMSOHN, P.A. *Incorporação de Leucina-³H e teor de ácido ribonucléico citoplasmático detectável citoquimicamente durante o processo mitótico da célula acinosa do pâncreas de rato*. São Paulo, 1971. 70 p. Tese (Doutoramento), Instituto de Ciências Biomédicas, USP.
2. ALISON, M.R.; TAYLOR, W.; WRIGHT, N.A.; APPLETON, D.R. Metabolism and proliferative activity of testosterone. *J. Endocrinol.*, 62:8-9, 1975.
3. BAULIEU, E.E.; LASNITZKI, I.; ROBEL, P. Metabolism of testosterone and action of metabolites on prostate glands growth in organ culture. *Nature*, 219:1155-6, 1968 ;
4. CHRÉTIEN, M. Action de la testostérone sur la structure fine d'un effecteur: la glande sous-maxillaire de la Souris mâle. II. Réaction des tubes sécréteurs à l'injection de testostérone chez le castrat. *J. Microsc. (Paris)*, 14:55-74, 1972.
5. CHRÉTIEN, M. Action of testosterone on the differentiation and secretory activity of a target organ: the submaxillary gland of the mouse. *Int. Rev. Cytol.*, 50:333-96, 1977.
6. CHUNG, L. & COFFEY, D.S. Biochemical characterization of prostatic nuclei. I. Androgen-induced changes in nuclear proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 247:570-83, 1971.
7. DESCLIN Jr., J. Action de la testostérone au cours du temps sur la structure des glandes sous-maxillaires de la Souris. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 264:639-40, 1967.
8. DOEG, K.A.; POLOMSKY, L.L.; DOEG, L.H. Synthesis in male accessory tissue of castrated rats. *Endocrinology*, 90:1633-8, 1972.
9. GITTINGER, J.W. & LASNITZKI, I. The effect of testosterone and testosterone metabolites on the fine structure of the rat prostate gland in organ culture. *J. Endocrinol.*, 52:459-64, 1972.
10. LACASSAGNE, A. Dimorphisme sexuel de la glande sous-maxillaire chez la Souris. *C.R. Seances Soc. Biol. Fil.*, 133:180-1, 1940.
11. LACASSAGNE, A. Réactions de la glande sous-maxillaire a
12. LESSER, B. & BRUCHOVSKY, N. The effects of testosterone 5-dihydrotestosterone and adenosine 3',5' monophosphate on cell proliferation and differentiation in rat prostate. *Biochim. Biophys. Acta*, 308:426-37, 1973.
13. LILLIE, R.D. & FULMER, H.M. *Histopathologic and practical histochemistry*. 4 ed. New York, McGraw-Hill, 1976. p. 171-2.
14. MAINWARING, W.I.P. *The mechanism of action of androgen*. New York, Springer, 1977. 178 p.
15. OOTA, Y. apud DESCLIN, Jr., J. 1967.

16. RAYNAUD, J. controle hormonal de la glande sous-maxillaire de la Souris. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 94:399-523, 1960.
17. RENNIE, P.S.; SYMES, E.K.; MAINWARING, W.J. The androgenic regulation of the activities of enzymes engaged in the synthesis of deoxyribonucleic acid in rat ventral prostate gland. *Biochem. J.*, 152:1-16, 1975.
18. RICHARDSON, K.C.; JARETT, L.; FIMKE, E.H. Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol.*, 35:313-9, 1960.
19. RITTER, C. Androgen-stimulated restoration in rat seminal vesicle and prostate epithelial cell. *Endocrinology*, 84:844-54, 1969.
20. ROY, A.K.; BAULIEU, E.E.; FEYEL-CABANES, T.; LE GOASCONE, C.; ROBÉL, P. Hormone metabolism and action: II. Androstenedione in prostate organ culture. *Endocrinology*, 91:396-403, 1972.
21. SIMIONESCU, N. & SIMIONESCU, M. Galloyglucoses of low molecular weight as mordant in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 70:608-21, 1976.
22. STOKA, A.; BOTTO, E.; BALDI, E.H.; CHARREAU, H. Metabolisme de la testostérone au niveau des sous-maxillaires chez les Rongeurs. Explication possible de leur dimorphisme sexuel. *C.R. Acad. Sci. (Arg.)*, 168: 1130-3, 1974.
23. SUPRIN, G.E. & COFFEY, D.S. A new model for studying the effect of drugs on prostatic growth. I. Antiandrogens and DNA synthesis. *Invest. Urol.*, 11:45-54, 1973.
24. TRAVILL, A. The effect of pregnancy on the submandibular glands of mice. *Anat. Rec.*, 155:217-9, 1966.
25. TUOHIMAA, P. & NIEMI, M. The effect of testostérone on cell renewal and mitotic cycles in sex accessory glands of castrated mice. *Acta Endocrinol.*, 58:696-704, 1968.