

EFEITO DE DOSE ÚNICA DE TESTOSTERONA NA SÍNTESE DE PROTEÍNAS PELAS CÉLULAS DOS DUCTOS GRANULOSOS DA GLÂNDULA SUBMANDIBULAR DO CAMUNDONGO MACHO CASTRADO

Luiz Carlos Bruschi^a
Flávio Fava de Moraes^b

RESUMO

As glândulas submandibulares de camundongos machos castrados mostram uma atrofia do compartimento de ductos granuloses, com redução da síntese protéica por estas células. Neste trabalho, estudamos o efeito de uma única dose de testosterona no estímulo da síntese protéica por estas células. Determinamos passos e cronologia desta recuperação, pelo acompanhamento intermitente e a curtos intervalos de tempo. Demonstramos, que após o estímulo hormonal, a glândula mostra uma queda na concentração de proteínas nas primeiras 12 horas, a partir do que, aumenta a síntese de proteínas exportáveis, chegando a um máximo no 5º dia após a injeção de testosterona. A análise de protease andrógeno-dependente, mostra similar cinética à síntese proteica geral.

PALAVRAS-CHAVE: Glândula salivar; Submandibular; Síntese protéica; Testosterona; Ducto granuloso.

1- INTRODUÇÃO

As glândulas submandibulares de camundongos mostram, em animais adultos, dimorfismo sexual¹⁵, sendo este dimorfismo principalmente caracterizado pela maior abundância de ductos granuloses nos animais machos do que nas fêmeas²⁶. Este dimorfismo não é apenas morfológico, mas também funcional, visto que, uma série de fatores presentes neste segmento glandular, são mais abundantes nos animais machos, como proteases¹⁴, amilase^{12, 21}, fator de crescimento epidermal⁹ e uma série de outras substâncias.

Este dimorfismo está vinculado a uma dependência androgênica, visto que a castração de machos adultos atrofia este segmento tubular^{5, 20}, enquanto a reposição de testosterona a estes mesmos animais recupera os ductos granuloses atrofiados^{6, 20}. Também a injeção de testosterona em fêmeas dá um padrão masculino à sua glândula submandibular¹⁰.

Apesar da caracterização do dimorfismo sexual histofuncional deste compartimento glandular, poucos são os estudos que procuraram, sequenciar esta recuperação.

Chrétien⁴ com estudo radioautográfico procurou demonstrar como ocorre o incremento da síntese protéica por estímulo androgênico. Neste estudo, a autora mostra que nas primeiras 12 horas, não há incorporação de leucina, mas

que, em 24 horas aumenta a reação radioautográfica nas células dos ductos granuloses. Às 48 horas, grande parte dos grãos de prata concentra-se no ergastoplasma, e esta reação cresce até o 7º dia após a injeção. Comparando estes resultados com trabalho anterior³, a autora mostrou que a incorporação de uridina precede a incorporação de leucina, resultado congruente com as respostas promovidas pela testosterona em órgãos-alvo, que são primariamente de síntese de RNA e, secundariamente de síntese de proteínas¹⁸.

SALVI & ANGELETTI²² também demonstraram, que a ação do hormônio masculino na síntese protéica da glândula submandibular de fêmeas é posterior à estimulação de síntese de RNA, ao mesmo tempo que demonstraram, utilizando intervalos de dois dias, que a síntese de proteases e do fator de crescimento nervoso é máxima ao 6º dia após o estímulo androgênico.

Buscando contribuir para o estudo da recuperação protéica de células de ductos granuloses atrofiadas por castração, pela testosterona, executamos o presente trabalho, utilizando dose única de testosterona e observações intermitentes, mas a curtos intervalos, para determinar os eventos desencadeados pela testosterona na síntese protéica geral, e na síntese de proteínas específicas, sabidamente andrógeno-dependentes, como as proteases.

Recebido em 06/10/87

^a - Departamento de Histologia - CCB/UEL

^b - Departamento de Histologia e Embriologia - Instituto de Ciências Biomédicas/Universidade de São Paulo.

2-MATERIAL E MÉTODOS

Neste experimento foram utilizados 68 camundongos machos, que foram sacrificados com 70 dias de idade. Estes 68 animais foram distribuídos em 17 grupos de 4 animais, a saber:

- Controle-normal (CN)
- Controle-castrado (CC) — constituído de animais orquiectomizados ao 21º dia de vida e mantidos por mais 50 dias nesta condição.
- Castrado-tratado (T) — composto por animais nas mesmas condições do grupo anterior (CC), e que ao 70º dia de vida receberam uma dose única de testosterona. Com o sacrifício dos animais deste grupo foi realizado em diferentes intervalos de tempo após a injeção de testosterona, à letra T, segue-se um número que indica em horas quanto tempo após a injeção foi feito o sacrifício dos animais. Desta forma, temos 15 grupos T, à saber: T0, T6, T9, T12, T18, T24, T30, T36, T42, T60, T66, T72, T120, T168, T210.

Os camundongos dos grupos CC e T foram castrados ao 21º dia de vida sob anestesia superficial com éter. Todos os animais castrados foram mantidos por mais 50 dias nesta condição, tempo suficiente para se obter a atrofia máxima dos ductos granulosos da glândula submandibular¹⁹.

As injeções foram subcutâneas na região cervico-lateral, através de seringa plástica descartável de 0,1 ml. Os animais dos grupos CN e CC receberam uma injeção de óleo de amendoim neutro (0,1 ml) 48 horas antes do sacrifício. Os animais castrados e tratados com testosterona (T) receberam dose única (5 mg em 0,1 ml de veículo oleoso) de propionato de testosterona (Neo-hombreol^R, Organon).

Todos os animais receberam água e alimento *ad libitum* durante todo o experimento e, após prévio jejum de 12 horas, foram sacrificados por deslocamento cervical.

3-MÉTODOS BIOQUÍMICOS

As glândulas submandibulares direitas mantidas congeladas, foram homogeneizadas a 10% em água destilada gelada (P/V), utilizando-se para tanto um homogeneizador de vidro

e pistilo de teflon. Alíquotas destes homogenatos foram, em seguida, submetidos às seguintes dosagens bioquímicas:

Proteína total:

A quantificação de proteínas foi feita pelo método proposto por LOWRY et alii¹⁶, utilizando-se hidrólise alcalina (NaOH) a 37º C, durante uma hora. As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro Beckman, em 650 nm, contra branco de reagentes. Os resultados foram expressos em termos de concentração (mg de proteína/g de tecido fresco) e conteúdo total (mg de proteína/glândula). A curva padrão para proteína total foi estabelecida com o uso de albumina bovina purificada (Sigma).

Proteases:

A determinação da atividade proteolítica, bem como da concentração de proteases, foi feita segundo ANSON¹. O substrato usado foi caseína em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6, durante uma hora à 37ºC. Os resultados foram expressos em termos de concentração (mg de tirosina/g de tecido), de atividade total (mg de tirosina/glândula) e em atividade específica da enzima (Δ AE). A curva padrão foi estabelecida utilizando-se tirosina purificada (Merck).

4-MÉTODOS ESTATÍSTICOS

O tratamento estatístico aplicado aos dados bioquímicos, foi o da análise da variância, proposta por SNEDECOR²³, seguido, quando necessário, do teste de comparações múltiplas de TUKEY²⁷.

O nível de significância foi fixado em 5%.

Nos quadros estatísticos colocados neste trabalho, o símbolo + determina que houve diferença estatística, enquanto o símbolo —, mostra semelhança entre os dados.

5-RESULTADOS

Proteína total: as médias e respectivos desvios padrão dos resultados da dosagem bioquímica de proteínas, encontram-se agrupadas na *tabela 1*. A análise estatística destes resultados encontra-se sumarizada nos quadros subjacentes à tabela.

Tabela 1: Médias e respectivos desvios-padrão, da dosagem bioquímica de proteína total na glândula submandibular dos grupos: CN, CC e T. Os resultados estão expressos em termos de concentração e conteúdo protéico. Os quadros abaixo da tabela, apenas indicam se existe (+) ou não (—) diferença estatística entre os grupos analisados.

GRUPOS	mg PROTEÍNAS/g DE TECIDO FRESCO	mg PROTEÍNA/GLÂNDULA
CN	175,53 ± 5,61	10,57 ± 0,72
CC	128,93 ± 2,25	3,91 ± 0,21
T0	133,77 ± 0,74	3,24 ± 0,43
T6	90,11 ± 7,17	2,38 ± 0,27
T9	79,51 ± 3,33	1,92 ± 0,03
T12	80,30 ± 0,32	1,75 ± 0,07
T18	105,06 ± 5,61	2,98 ± 0,47
T24	109,58 ± 6,58	3,76 ± 0,37
T30	112,80 ± 2,41	3,97 ± 0,46
T36	134,81 ± 9,44	4,65 ± 0,58
T42	126,17 ± 3,99	4,48 ± 0,35
T60	124,74 ± 1,90	4,80 ± 0,45
T66	128,46 ± 3,94	4,75 ± 0,13
T72	133,36 ± 3,14	6,12 ± 0,26
T120	148,86 ± 2,25	13,09 ± 0,67
T168	143,54 ± 2,81	10,10 ± 0,32
T210	149,55 ± 2,51	10,53 ± 0,14

Análise estatística da concentração de proteína total. Comparação entre os grupos de animais experimentais e os controles normais e controles castrados.

CN	CC	TO	T6	T9	T12	T18	T24	T30	T36	T42	T60	T66	T72	T120	T168	T210
CN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	CC	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Análise estatística do conteúdo protéico total (mg proteína/glandula) Comparações entre animais experimentais com os controles normais e controles castrados.

CN	CC	TO	T6	T9	T12	T18	T24	T30	T36	T42	T60	T66	T72	T120	T168	T210
CN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
+	CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

TABELA 2: Média e respectivos desvios padrão, da concentração, da atividade total e atividade específica de proteases nas glândulas submandibulares dos grupos controle-normal, controle-castrado e castrado-tratado. nos quadros subseqüentes à tabela, está sumarizado o resultado da análise estatística destes dados.

Grupos	mg protease/g de tecido fresco	mg protease/glandula	AE X 10 ²
CN	33,88 + 4,78	207,33 + 35,86	17,76 + 2,35
CC	2,39 + 0,10	7,00 + 0,70	1,72 + 0,09
TO	2,96 + 0,33	8,33 + 0,84	2,00 + 0,22
T6	1,98 + 0,44	5,00 + 0,29	1,99 + 0,10
T9	1,76 + 0,15	4,33 + 0,51	2,10 + 0,27
T12	2,32 + 0,15	5,11 + 0,47	2,68 + 0,14
T18	2,31 + 0,03	6,53 + 0,14	2,05 + 0,09
T24	2,70 + 0,17	9,10 + 0,08	2,32 + 0,20
T30	2,24 + 0,38	8,26 + 1,78	1,81 + 0,28
T36	3,38 + 0,18	10,30 + 0,20	2,58 + 0,19
T42	4,68 + 0,48	16,38 + 1,50	3,42 + 0,30
T60	5,05 + 0,49	19,00 + 0,81	3,72 + 0,32
T66	7,97 + 0,49	28,33 + 1,93	5,80 + 0,51
T72	13,46 + 1,94	63,00 + 10,61	8,99 + 1,04
T120	15,94 + 1,80	238,66 + 34,88	16,29 + 1,55
T168	12,98 + 0,86	158,00 + 10,41	13,85 + 2,98
T210	6,80 + 0,26	79,95 + 3,39	7,01 + 0,39

Análise estatística dos resultados da concentração de proteases. Comparações entre animais experimentais com os controles normais e controles castrados.

CN	CC	TO	T6	T9	T12	T18	T24	T30	T36	T42	T60	T66	T72	T120	T168	T210
CN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Análise estatística dos resultados da atividade proteolítica total. Comparações entre animais experimentais com os controles normais e controles castrados.

CN	CC	TO	T6	T9	T12	T18	T24	T30	T36	T42	T60	T66	T72	T120	T168	T210
CN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
+	CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Análise estatística dos resultados da atividade específica da protease. Comparações entre animais experimentais com seus controles normais e controles castrados.

CN	CC	TO	T6	T9	T12	T18	T24	T30	T36	T42	T60	T66	T72	T120	T168	T210
CN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
+	CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

6 - DISCUSSÃO

Neste trabalho, pudemos demonstrar que a testosterona exerce influência direta na síntese protéica dos ductos granulados da glândula submandibular do camundongo. A significativa redução da concentração protéica glandular após a castração é plenamente recuperada pela ação hormonal.

O fato de termos utilizado dose única de hormônio e de termos acompanhado de forma intermitente, mas a curtos intervalos, possibilitou sequenciar as etapas fundamentais e estabelecer o período mínimo em que se estabelece a recuperação funcional destes ductos.

Nas primeiras 12 horas após a injeção de testosterona, observamos uma queda na concentração de proteínas em relação aos animais do grupo controle-castrado (CC). Em termos gerais, a castração promove redução tanto na concentração quanto no conteúdo protéico total, sendo este último plenamente recuperado pela ação hormonal, 120 horas após a injeção da testosterona.

A redução protéica inicial, aparentemente paradoxal, deve estar ligada ao fato de que a testosterona promove, como primeiro passo na modulação do ducto estriado para granuloso, um aumento no número de lisosomas, que desencadeiam um fenômeno de lise, representado pelo desaparecimento das invaginações da membrana basal e diminuição acentuada do número de mitocôndrias⁷.

Somente após estas modificações é que a célula promove intensa síntese protéica. De fato, CHRÉTIEN⁴, administrando leucina-H³, mostra que a síntese protéica neste sistema só se inicia 12 horas após o estímulo hormonal, atingindo um máximo de concentração 168 horas após a injeção de testosterona.

Nossos resultados também mostram um incremento de proteínas a partir de 18 horas após a injeção de testosterona, atingindo a máxima concentração 120 horas após a injeção. Comparativamente a outros órgãos andrógeno-dependentes, a glândula submandibular mostra-se muito efetiva na resposta de síntese ao estímulo androgênico, pois a vesícula seminal e próstata respondem com síntese protéica, respectivamente 12 e 24 horas após a injeção de testosterona¹³.

Contudo, uma interpretação mais precisa sobre a recuperação protéica dos ductos atrofiados, pela testosterona, pode ser feita quando se analisa especificamente uma proteína exportável, sediada exclusivamente nos grânulos de secreção dos ductos granulados e que seja andrógeno-dependente, como é o caso da protease ativa em pH alcalino¹³.

Esta atividade proteolítica, significativamente reduzida pela castração, foi recuperada plenamente em termos de atividade total ou de atividade específica da enzima. Esta recuperação, embora detectável a partir de 66 horas após o estímulo hormonal, equipara-se aos valores normais em torno de 120 horas. Cumpre salientar que apenas após 210 horas a atividade proteolítica retorna aos níveis do animal castrado. Esta demora na reversão, favorece a interpretação de que a metabolização da testosterona é relativamente lenta nos ductos granulados. De fato, já foi demonstrado que este fenômeno é muito mais rápido na glândula submandibular do rato do que no camundongo²⁴.

Nossos resultados para a atividade proteolítica, bem como para a variação da concentração de proteínas, estão em absoluta concordância com os dados da análise radioautográfica e ultraestrutural realizada por CHRÉTIEN^{3, 4, 7}. Conclui a autora, que as primeiras 48 horas após a injeção de testosterona estariam vinculadas com a síntese de proteínas estruturais, enquanto os tempos posteriores estariam envolvidos com a síntese de proteínas exportáveis sediadas nos grânulos de secreção.

A análise morfológica paralela ao experimento, mostrou-se compatível com os resultados auferidos dos dados bioquímicos, visto que, 24 horas após a injeção de testosterona, os ductos granulados de animais castrados já ensaiam uma hipertrofia que é máxima em 120 horas, a partir do que mostram uma redução do volume, bem como da quantidade de grânulos apicais de suas células.

Analisando sob um prisma histofuncional, podemos inferir que a glândula submandibular comporta-se efetivamente como um órgão andrógeno-dependente, segundo proposto por MAINWARING¹⁸, visto que a incorporação de testosterona², sua metabolização⁸, sua ligação à receptores específicos^{25, 28, 29} e seus efeitos na síntese protéica⁴ e mormente na síntese de proteínas andrógeno-dependentes específicas¹³, tem sido demonstrada.

De mão de nossos dados e das informações da literatura, podemos dizer que nas primeiras doze horas após o estímulo hormonal, ocorre absorção da testosterona, sua ligação com receptores citoplasmáticos específicos, a passagem do complexo hormônio-receptor para o interior do núcleo, sua ligação à sítios específicos do genoma e a ativação da síntese protéica geral, mormente de proteínas específicas. Tudo isto nos fornece base sólida para credenciar o ducto granuloso como uma estrutura de grande sensibilidade ao andrógeno, visto que em outros órgãos esteróide-dependentes, como o hipotálamo em diferenciação, não se observa nenhum fenômeno nas onze primeiras horas após o estímulo hormonal¹⁷.

Da mesma forma que considera CHRÉTIEN⁷, nossos re-

sultados sugerem que nos primeiros dois dias após o estímulo hormonal, a síntese protéica fica mais restrita à síntese de proteínas estruturais, visto que, paralela análise morfológica, mostra ductos granulosos com células bem volumosas, mas com restrita granulação apical. Nos dias subseqüentes há incremento das proteínas exportáveis acumuladas nos ductos granulosos, sendo que o maior acúmulo de grânulos é encontrado por volta do 5º dia após o estímulo hormonal.

Após o 5º dia da injeção do hormônio, a concentração protéica, especialmente das proteínas andrógeno-dependentes, decai, sugerindo uma desativação neste tempo do complexo hormônio-receptor, ao mesmo tempo que reitera a lenta metabolização da testosterona na glândula submandibular do camundongo.

ABSTRACT

The submandibular glands of castrated male mice show atrophied convoluted duct cells with reduction in protein synthesis. In this work we studied the effect of a single dose of testosterone upon the stimulation of protein synthesis by these cells. We determined the steps and cronology of this recuperation by intermittent accompaniment at short intervals. We demonstrated that, after the hormonal stimulation, the glands show a decay in the protein synthesis in the first 12 hours. Then there is an increase of the exportable protein rising to maximum in the fifth day after testosterone administration. The analysis of a specific androgen-sensitive protein shows a similar kinetics as with general protein synthesis.

KEY WORDS: Salivar gland; Submandibular; Protein synthesis; Testosterone; Convoluted duct.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANSON, M. L. The estimation of pepsin, trypsin, pepsin and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 22:79-89, 1938.
2. APPELGREEN, L.E. The distribution of labelles testosterone in mice. *Acta Endocrinol.*, 62:505-12, 1969.
3. CHRÉTIEN, M. Étude autoradiographique des synthèses de RNA induites par la testostérone dans les glandes sous maxillaires de la Souris. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 266:690-3, 1968.
4. CHRÉTIEN, M. Étude radio-autographique des synthèses protéiques induites par la testostérone dans les glandes sous-maxillaire de la Souris. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 267: 1004-6, 1968.
5. CHRÉTIEN, M. Action de la testostérone sur la structure fine d'un effecteur: la glande sous-maxillaire de la Souris mâle. I. Morphologie des tubes sécréteurs avant et après castration. *J. Microsc. (Paris)*, 14:35-54, 1972.
6. CHRÉTIEN, M. Action de la testotérone 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.
7. CHRÉTIEN, M. Action de la testosterone on the differentiation and secretory activity of a target organ: the submaxillaire gland of the mouse. *Int. Rev. Cytol.*, 50:333-96, 1977.
8. COFFEY, J.C. Steroide metabolism by mouse submaxillary glands. I. In vitro metabolism of testosterone and 4-androstene-3, 17-dione. *Steroids*, 22:247-57, 1973.
9. COHEN, S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.*, 237:1555-62, 1962.
10. 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.
11. FUJII, T. & VILLEE, C. RNA metabolism in seminal vesicle and prostate of imature rats following castration and androgen replacement. *Acta Endocrinol.*, 60:527-36, 1969.
12. GRESIK, E.W. & MACRAE, E.K. The postnatal development of the sexually dimorphic duct system and of amylase activity in the submandibular glands of mice. *Cell tissues Res.*, 157:411-22, 1975.
13. HOSOI, K. & UEHA, T. Effects of sex hormones on synthesis of protein contained in granules present in convoluted tubular cells of mouse submandibular glands. *J. Biochem.* 82:351-8, 1977.
14. JUNQUEIRA, L.C.U.; FAJER, A.; RABINOVITCH, M.; FRANKENTHAL, L. Biochemical and histochemical observations on the sexual dimorphism of mice submaxillary glands. *J. Cell Com. Physiol.*, 34:129-58, 1949.
15. LACASSANGNE, A. Dimorphisme sexuel de la glande sous-maxillaire chez la Souris. *C.R. Seances Soc. Biol. Fil.*, 133:180-1, 1940.
16. LOWRY, O.H.; ROSEBOUCH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-75, 1951.
17. MACEWEN, B.S. Interactions between hormones and nerve tissue. *Sci. Amer.*, 235:48-58, 1976.
18. MAINWARING, W.I.P. *The mechanism of action of androgen.* New York, Springer, 1977. 178 p.

19. OOTA, Y. (1961) apud DESCLIN, Jr., J. (1967).
20. RAYNAUD, J. Controle hormonal de la glande sous-maxillaire de la Souris. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 94:399-523, 1960.
21. RAYNAUD, J. & REBEYROTTE, P.M. Différence de l'activité amylasique de la salive des Souris mâles et des Souris femelles: son conditionnement hormonal. *C.R. Acad. Sci.*, (Paris), 228:433-5, 1949.
22. SALVI, M. & ANGELETTI, P.U. Azione del testosterone sulla ghiandola sottomascellare dell topo. *Ann. Ist. Super Sanità*, 2:356-62, 1966.
23. SNEDOR, G.W. *Statistical methods*. 5 ed. Iowa State College Press, 1956. 557 p.
24. 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.
25. TAKUMA, T.; NAKAMURA, R.; HOSOI, K.; KUMEGAWA, Binding prote in for 5 dihidrotestosterone in mouse submandibular gland. *Biochim. Biophys. Acta*, 496:175-81, 1977.
26. TRAVILL, A. The effect of pregnancy on the submandibular glands of mice. *Anat. Rec.*, 155:217-9, 1966.
27. TUKEY, G.W. The problem of multiple comparisons. *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, 16, 1953
28. VERHOEVEN'G & WILSON, J.D. Cytosol androgen binding in submandibular gland and kidney of the normal mouse with testicular feminization. *Endocrinology*, 99:79-92, 1976.
29. VERHOEVEN, G. Androgen binding proteins in mouse submandibular gland. *J. Steroid Biochem.* 10:129-138, 1979.