

REVERSIBILIDADE DOS EFEITOS DA PROGESTERONA NA GLÂNDULA SUBMANDIBULAR DO CAMUNDONGO FÊMEA. ESTUDO HISTOLÓGICO E HISTOQUÍMICO

Heloisa Augusto da SILVA*
Ronaldo Maia MELHADO**

- **RESUMO:** Os ductos granulosos das glândulas submandibulares do camundongo apresentam evidente dimorfismo sexual, sendo mais numerosos e desenvolvidos no macho. Na fêmea, tais estruturas são masculinizadas pela ação de vários hormônios, dentre eles a progesterona. Mostrou-se no presente trabalho que esta estimulação é reversível e ocorre 60 dias após cessada a aplicação da progesterona.
- **PALAVRAS-CHAVE:** Glândula submandibular; progesterona.

Introdução

O parênquima da glândula submandibular do camundongo é constituído por unidades morfofuncionais denominadas adenômeros, os quais contêm diversos compartimentos celulares, a saber: ácino, ducto intercalar, ducto granuloso, ducto estriado e ducto excretor.⁸

O dimorfismo sexual das glândulas submandibulares de camundongos, demonstrado por Lacassagne,¹⁰ caracteriza-se pelo predomínio dos ductos granulosos nos animais machos.^{2,6,26} Outros estudos evidenciaram que esta característica era consequência da ação dos hormônios androgênicos.^{2,3}

Alguns trabalhos mostram que os ductos granulosos das fêmeas podem ser estimulados em determinadas situações, tais como:

a) a injeção de testosterona na fêmea elimina o dimorfismo sexual em relação aos machos, "masculinizando" os ductos granulosos;^{10,15,21}

b) as fêmeas portadoras da síndrome anovulatória androgênica "masculinizam" os ductos granulosos;¹²

* Bolsista de Iniciação Científica da FAPESP – Processo n.93/4579-8.

** Departamento de Patologia – Faculdade de Odontologia – UNESP – 16015-050 – Araçatuba – SP.

c) situações fisiológicas, como a prenhez²⁷ e a lactação,⁵ estimulam os ductos granulosos;

d) substâncias que apresentam alta atividade progesteronal, como o acetato de ciproterona¹⁶ e o acetato de medroxiprogesterona,¹⁸ estimulam os ductos granulosos de fêmeas adultas.

Outros hormônios parecem agir em menor escala ou de forma indireta na diferenciação e manutenção dos ductos granulosos, por exemplo: hormônios hipofisários,^{1,11} hormônios adrenocorticóides^{21,25} e hormônios pancreáticos.⁹

Uma influência estimuladora da progesterona sobre os ductos granulosos da submandibular do camundongo fêmea tem sido demonstrada.^{4,7,14,16,27} Tal influência, em nível estrutural, evidencia-se por um aumento no tamanho dos ductos granulosos, bem como maior quantidade de grânulos de secreção. No nível histoquímico observou-se que a progesterona aumenta a intensidade de reação para o aminoácido triptofano nos ductos dos animais injetados.¹⁸

No entanto, não há informações se tal efeito estimulador é duradouro ou não.

Baseado nestes fatos, é que nos propomos a estudar a reversibilidade ou não dos efeitos estimuladores da progesterona sobre os ductos granulosos do camundongo fêmea, e se houver reversibilidade, determinar em quanto tempo ela ocorrerá.

Material e método

Para a realização deste trabalho, foram utilizados 24 camundongos de 60 dias de idade, sendo 3 machos e 21 fêmeas.

Os animais foram obtidos por acasalamento realizado no Biotério do Departamento de Patologia, da Faculdade de Odontologia Campus de Araçatuba, UNESP, e alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

Os animais machos não sofreram qualquer tipo de tratamento, enquanto nas fêmeas foram injetados diariamente, durante 14 dias, 5 mg de progesterona diluída em 0,1 ml de óleo de amendoim neutro, com exceção das fêmeas-controle, nas quais foram injetadas apenas 0,1 ml de óleo de amendoim neutro. As injeções foram realizadas subcutaneamente na face cérvico-lateral, alternando-se diariamente os lados direito e esquerdo.

Após a última injeção, os animais foram divididos em grupos de 3 e sacrificados nos seguintes tempos:

- GRUPO A: Machos normais, sacrificados juntamente com o Grupo B.
- GRUPO B: Fêmeas-controle, sacrificadas 24 horas após a última injeção.
- GRUPO C: Fêmeas injetadas, sacrificadas 24 horas após a última injeção.
- GRUPO D: Fêmeas injetadas, sacrificadas 10 dias após a última injeção.
- GRUPO E: Fêmeas injetadas, sacrificadas 20 dias após a última injeção.
- GRUPO F: Fêmeas injetadas, sacrificadas 40 dias após a última injeção.
- GRUPO G: Fêmeas injetadas, sacrificadas 60 dias após a última injeção.
- GRUPO H: Fêmeas injetadas, sacrificadas 90 dias após a última injeção.

O sacrifício dos animais foi feito por deslocamento cervical, no período matinal, após jejum prévio de 10-12 horas.

As glândulas submandibulares foram removidas, dissecadas do tecido conjuntivo circunvizinho e lavadas em solução fisiológica.

As glândulas do lado direito foram recortadas em fragmentos de aproximadamente 2 mm de espessura e fixadas em Helly por 6 horas à temperatura ambiente. Após a fixação, foram lavadas em água corrente durante uma noite, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Foram realizados cortes de 6 μm de espessura, corados pelo Tricrômico de Mallory para exame histológico.

As glândulas do lado esquerdo foram cortadas ao meio, fixadas em formol neutro por 24 horas, lavadas por 1 dia em água corrente, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Foram obtidos cortes com 12 μm de espessura para histoquímica de proteína, sendo utilizado o método do paradimetilaminobenzoaldeído (PABA) em meio ácido¹³ para a detecção do aminoácido triptofano.

Resultado

1 Resultados histológicos

Grupo A – Machos normais

Nestes animais, as glândulas submandibulares mostram um predomínio de ductos granulosos, que são constituídos por células prismáticas altas, núcleos esféricos localizados no pólo basal do citoplasma e grande quantidade de grânulos de secreção nos 2/3 apicais do citoplasma (Figura 1).

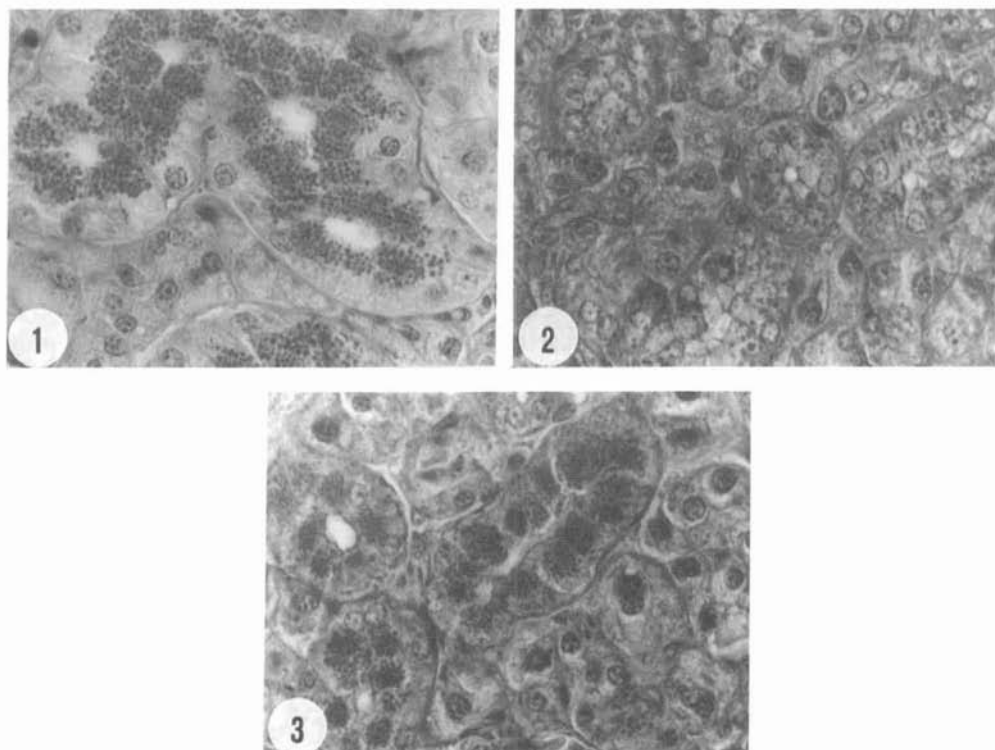
Grupo B – Fêmeas-controle

As glândulas submandibulares mostram número reduzido de ductos granulosos quando comparadas aos machos normais. Estes ductos são constituídos por células prismáticas baixas e com pequena quantidade de grânulos de secreção restritos à região apical (Figura 2).

Grupo C – Fêmeas injetadas, sacrificadas 24 horas após a última injeção

Grupo D – Fêmeas injetadas, sacrificadas 10 dias após a última injeção

Nestes grupos é bastante evidente o aumento de tamanho dos ductos granulosos, bem como um acentuado número de grânulos de secreção no citoplasma das células (Figuras 3 e 4).



Glândula submandibular de camundongos. Coloração: Tricrômico de Mallory.

FIGURA 1 – GRUPO A: Machos normais.

FIGURA 2 – GRUPO B: Fêmeas-controle.

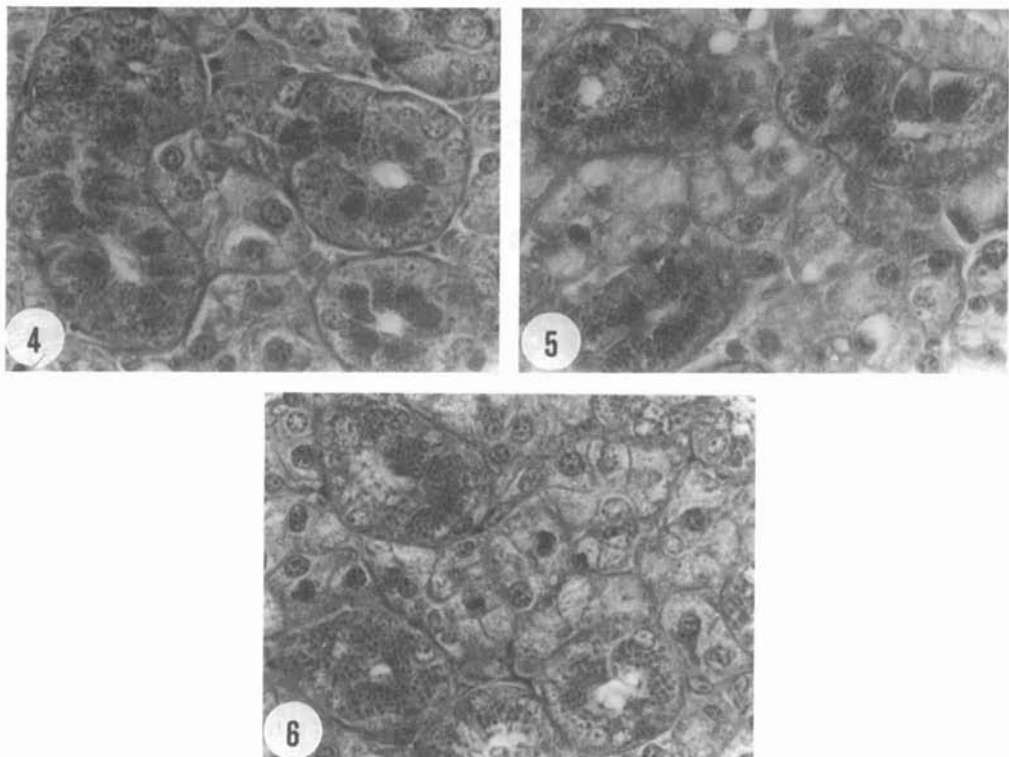
FIGURA 3 – GRUPO C: Fêmeas sacrificadas 24 horas após o tratamento.

Observar a nítida predominância de grânulos de secreção nos ductos granulosos dos animais machos normais em relação às fêmeas-controle. Notar, ainda, que a quantidade de grânulos de secreção nos ductos granulosos das fêmeas sacrificadas 24 horas após o tratamento se aproxima dos parâmetros dos animais machos normais (aumento 540x).

Grupo E – Fêmeas injetadas, sacrificadas 20 dias após a última injeção

Grupo F – Fêmeas injetadas, sacrificadas 40 dias após a última injeção

Nos animais destes grupos observa-se uma diminuição no tamanho dos ductos granulosos e menor quantidade de grânulos de secreção em relação aos grupos C e D (Figuras 5 e 6).



Glândula submandibular de camundongos. Coloração: Tricrômico de Mallory.

FIGURA 4 – GRUPO D: Fêmeas sacrificadas 10 dias após o tratamento.

FIGURA 5 – GRUPO E: Fêmeas sacrificadas 20 dias após o tratamento.

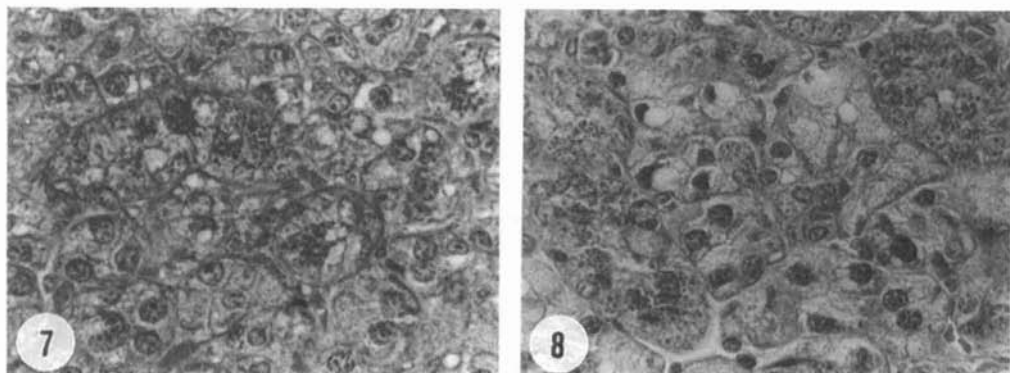
FIGURA 6 – GRUPO F: Fêmeas sacrificadas 40 dias após o tratamento.

Observar o nítido aumento de tamanho dos ductos granulosos das fêmeas sacrificadas 10 dias após o tratamento, tornando-se semelhante aos machos normais. Nos grupos sacrificados 20 dias e 40 dias após o tratamento, observar uma redução no tamanho dos ductos granulosos, bem como menor quantidade de grânulos de secreção, quando comparados aos grupos C e D (aumento 540x).

Grupo G – Fêmeas injetadas, sacrificadas 60 dias após a última injeção

Grupo H – Fêmeas injetadas, sacrificadas 90 dias após a última injeção

Nestes animais não são observadas alterações referentes ao aspecto estrutural dos ductos granulosos, quando comparados ao Grupo B (fêmeas-controle) (Figuras 7 e 8).



Glândula submandibular de camundongos. Coloração: Tricrômico de Mallory.

FIGURA 7 – GRUPO G: Fêmeas sacrificadas 60 dias após o tratamento.

FIGURA 8 – GRUPO H: Fêmeas sacrificadas 90 dias após o tratamento.

Observar a atrofia dos ductos granulosos das fêmeas sacrificadas 60 dias após o tratamento, evidenciando a reversibilidade do efeito masculinizante da progesterona. O mesmo quadro se mantém aos 90 dias pós-tratamento (aumento 540x).

2 Resultados histoquímicos

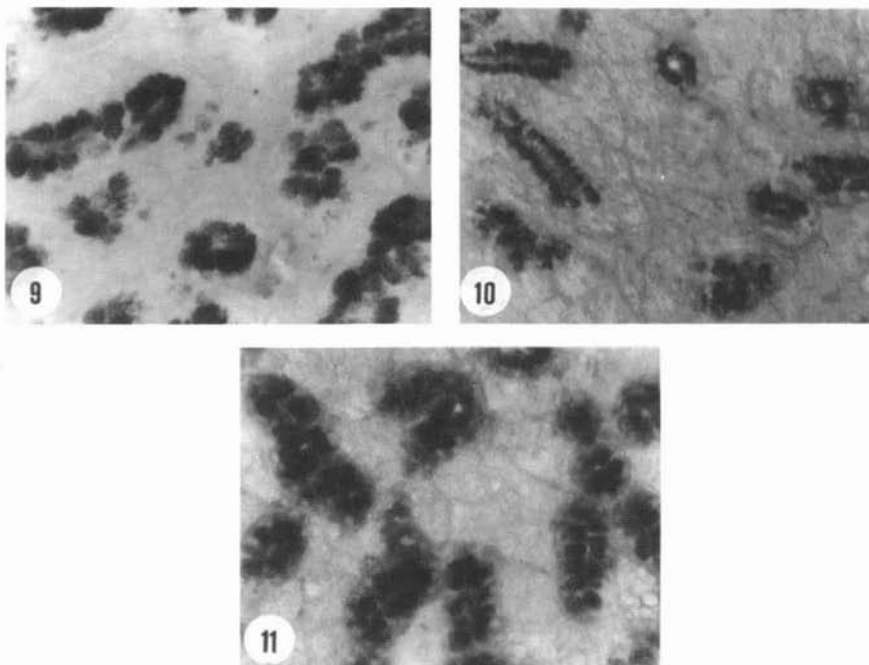
Os resultados histoquímicos para o aminoácido triptofano estão resumidos na Tabela 1.

A reação para o aminoácido triptofano foi intensamente positiva nos grânulos de secreção dos ductos granulosos dos animais machos normais (Figura 9). As fêmeas-controle mostram uma fraca intensidade de reação para este aminoácido (Figura 10).

A injeção de progesterona promoveu, nos ductos granulosos das fêmeas sacrificadas 24 horas após a última injeção, um aumento da intensidade de reação (Figura 11), aproximando-se dos parâmetros do macho normal. O mesmo aconteceu com as fêmeas injetadas, sacrificadas 10 dias após a última injeção (Figura 12).

As fêmeas tratadas, sacrificadas 20 dias (Figura 13) e 40 dias (Figura 14) após a última injeção de progesterona, apresentaram uma moderada intensidade de reação para o aminoácido triptofano, ligeiramente maior que as fêmeas-controle.

Nas fêmeas tratadas e sacrificadas 60 dias (Figura 15) e 90 dias (Figura 16) após a última injeção de progesterona, os ductos granulosos mostraram uma fraca intensidade de reação para o aminoácido triptofano, semelhante à observada nas fêmeas-controle.



Glândula submandibular de camundongos. Histoquímica do aminoácido triptofano.

FIGURA 9 - GRUPO A: Machos normais.

FIGURA 10 - GRUPO B: Fêmeas-controle.

FIGURA 11 - GRUPO C: Fêmeas sacrificadas 24 horas após o tratamento.

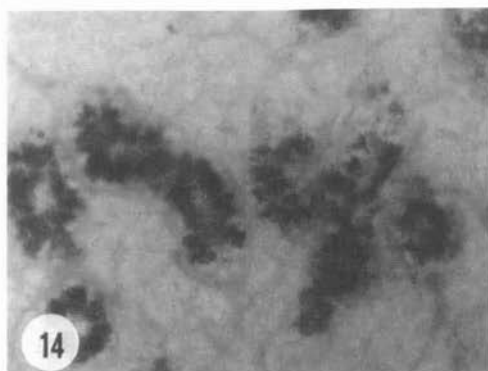
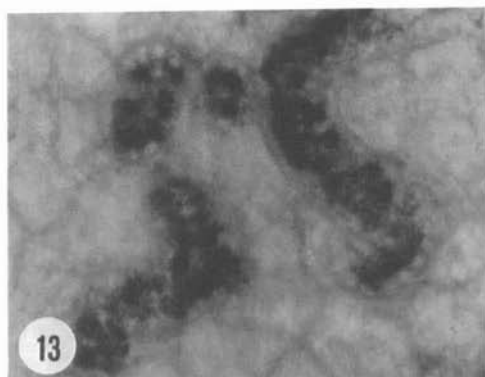
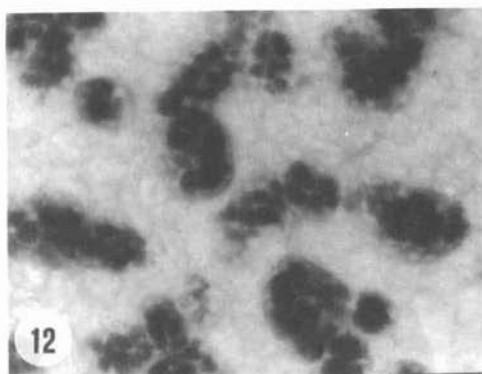
Observar que os animais machos normais apresentam maior positividade ao triptofano do que as fêmeas-controle.

Notar, ainda, que nas fêmeas sacrificadas 24 horas após o tratamento, a reação ao triptofano aproxima-se do resultado obtido para o grupo macho normal (aumento 338x).

Tabela 1 - Resultados da reação histoquímica para triptofano na glândula submandibular de camundongos

Grupos	Estruturas				
	Acino	Ducto intercalar	Ducto granuloso	Ducto estriado	Ducto excretor
Macho normal (A)	-	-	++++	-	-
Fêmea controle (B)	-	-	+	-	-
Fêmea + progesterona 24 horas (C)	-	-	+++	-	-
Fêmea + progesterona 10 dias (D)	-	-	+	-	-
Fêmea + progesterona 20 dias (E)	-	-	+	-	-
Fêmea + progesterona 40 dias (F)	-	-	+	-	-
Fêmea + progesterona 60 dias (G)	-	-	+	-	-
Fêmea + progesterona 90 dias (H)	-	-	+	-	-

- Não houve reação; + Reação fraca; ++ Reação moderada; +++ Reação forte; ++++ Reação intensa



Glândula submandibular de camundongos. Histoquímica do aminoácido triptofano.

FIGURA 12 – GRUPO D: Fêmeas sacrificadas 10 dias após o tratamento.

FIGURA 13 – GRUPO E: Fêmeas sacrificadas 20 dias após o tratamento.

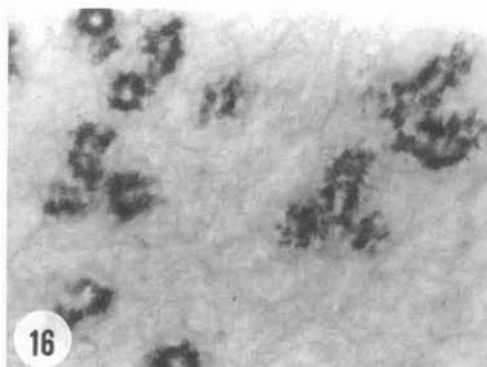
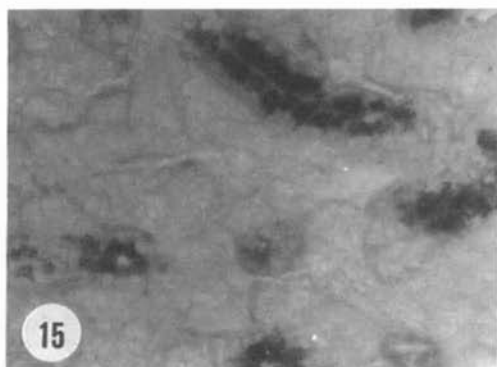
FIGURA 14 – GRUPO F: Fêmeas sacrificadas 40 dias após o tratamento.

Observar que os ductos granuloso das fêmeas sacrificadas 10 dias após o tratamento apresentam uma intensidade de reação ao triptofano semelhante aos machos normais. Notar que a reação é moderada nos ductos granuloso das fêmeas sacrificadas 20 dias e 40 dias após o tratamento; contudo, é ligeiramente maior que as fêmeas-controle (aumento 338x).

Discussão

Os nossos resultados em nível estrutural mostraram, nas fêmeas injetadas com progesterona, um aumento no tamanho dos ductos granuloso, bem como maior quantidade de grânulos de secreção. Igualmente, em nível histoquímico, mostraram um aumento na intensidade de reação para o aminoácido triptofano.

O efeito estimulante da progesterona sobre os ductos granuloso da submandibular do camundongo fêmea tem sido admitido por alguns autores.^{4,7,14,16} Alterações semelhantes são observadas em camundongos fêmeas prenhes e lactantes.^{5,23,27}



Glândula submandibular de camundongo. Histoquímica do aminoácido triptofano.

FIGURA 15 – GRUPO G: Fêmeas sacrificadas 60 dias após o tratamento.

FIGURA 16 – GRUPO H: Fêmeas sacrificadas 90 dias após o tratamento.

Observar que a positividade ao triptofano nestes dois grupos não exhibe diferença em relação às fêmeas-controle, evidenciando a reversibilidade do efeito masculinizante da progesterona. (aumento 338x).

Sugere-se que esta atividade da progesterona e de outros esteróides progestacionais seria desencadeada pela interação com os receptores androgênicos; a progesterona pode ser convertida em 5α -dihidrotestosterona em alguns órgãos andrógeno-dependentes, como as glândulas prepuciais do rato.¹⁷

Esta sugestão pode ser viável em relação à ação da progesterona nos ductos granulosos da glândula submandibular de camundongos fêmeas. Alguns trabalhos têm mostrado que *in vitro* a glândula submandibular tem capacidade de incorporar colesterol e convertê-lo em dihidroepiandrosterona, o qual possui atividade androgênica.²² Ainda, podem transformar *in vitro* a pregnenolona em progesterona e dihidroepiandrosterona, bem como converter a progesterona em androstenediona.²²

Progestágenos, como o acetato de medroxiprogesterona,¹⁹ e mesmo antiandrógenos, como o acetato de ciproterona,¹⁶ têm efeito estimulador sobre os ductos granulosos da glândula submandibular de machos castrados e fêmeas normais, provavelmente em razão da alta atividade progestacional desses fármacos.

A presença de receptores para progestágenos²⁴ e para a progesterona²⁰ tem sido demonstrada na glândula submandibular de ratos. Tais receptores estão localizados no sistema de ductos, mas não nos ácinos,²⁴ e em maior quantidade nas glândulas das fêmeas.²⁰

É possível, assim, que os efeitos da progesterona sobre os ductos granulosos possam ser modulados por uma interação com receptores específicos nas células ductais.

O efeito “masculinizante” observado na prenhez mostra aumento no peso das glândulas, maior porcentagem de ductos granulosos, aumento do diâmetro dos ductos

granulosos, localização basal do núcleo e ausência de estriações basais.²⁷ Tais alterações são creditadas pelo autor a uma expressão de efeitos metabólicos complementares da progesterona.

Nossos resultados mostraram ainda que a “masculinização” da glândula induzida pela progesterona não atinge valores iguais ao do animal macho normal, o que igualmente acontece na prenhez e lactação.²³

Rossi²³ já demonstrou que na prenhez e lactação o efeito masculinizante inicia-se a partir do 10º dia de prenhez e persiste aumentando até o final da lactação (21º dia).

Para Travill,²⁷ as alterações de peso e o aspecto microscópico das glândulas submandibulares observadas na prenhez somente regridem cerca de 6 semanas após o final da prenhez.

Côm relação à reversibilidade deste efeito “masculinizante”, nossos resultados mostram que o processo começa a se estabelecer discretamente aos 20 e 40 dias pós-injeção e somente retorna aos parâmetros do animal controle aos 60 dias.

Dados da literatura mostram que são necessários pelos menos 10 dias para a completa atrofia da glândula após a castração cirúrgica em machos²⁶ e que persiste o efeito masculinizante até o final da lactação nas fêmeas.²³ Assim, nos parece que, à semelhança do formulado por Rossi,²³ a retenção de hormônios no tecido glandular possibilitaria a manutenção da masculinização mesmo em fases de redução da progesterona plasmática.

Conclusão

De acordo com os resultados obtidos por intermédio do estudo histológico e histoquímico dos efeitos da progesterona sobre a glândula submandibular de camundongos fêmeas, concluímos que:

- a progesterona exerce um efeito estimulante sobre os ductos granulosos da glândula submandibular;
- este efeito “masculinizante” é totalmente reversível e ocorre 60 dias após haver cessado a aplicação da progesterona.

SILVA, H. A. da, MELHADO, R. M. Reversibility of the effects of progesterone on the submandibular gland of female mice. Histological and histochemical study. *Rev. Odontol. UNESP (São Paulo)*, v.25, n.1, p.85-96, 1996.

- **ABSTRACT:** *The granular ducts of mice submandibular glands shows an evident sexual dimorphism, and it is more numerous and developed in male. Such structure in female turns to masculine pattern by the action of several hormones, progesterone is one of them. The present report shown that this stimulation is reversible and it happened 60 days after cessation of progesterone application.*
- **KEYWORDS:** *Submandibular gland; progesterone.*

Referências bibliográficas

- 1 BAKER, B. L., CLAPP, H. W., LIGHT, J. A. Hormonal influence on the citology and physiology of salivary glands. In: SREEEBNEY, L. M., MEYER, J. *Salivary glands and their secretion*. New York: Pergamon, 1964. p.63-81.
- 2 BRUSCHI, L. C. *Efeitos de dose única de testosterona na modulação estrutural e bioquímica dos ductos granulosos da glândula submandibular do camundongo castrado*. São Paulo, 1979. 113p. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- 3 CHRÉTIEN, M. Action of testosterone on the differentiation and secretory activity of a target organ: the submaxillary gland of the mouse. *Int. Rev. Cytol.*, v.50, p.333-96, 1977.
- 4 COELHO, R. B. *Varições estruturais da glândula submaxilar do Mus musculus induzidas pelos hormônios gonadais*. Recife, 1946. 67p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de Recife.
- 5 DESCLIN JUNIOR, J. Action de la progésterone sur la structure des glandes sous-maxillaires chez la souris. *C. R. Acad. Sci.*, v.264, p.367-9, 1967.
- 6 DOINE, A. I. *Estudo estrutural, histoquímico e bioquímico dos efeitos do anabolizante "decadurabolin" na glândula submandibular do camundongo castrado*. São Paulo, 1976. 57p. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- 7 JUNQUEIRA, L. C. U. et al. Biochemical and histochemical observations on the sexual dimorphism of mice submaxillary glands. *J. Cell. Comp. Physiol.*, v.34, p.129-58, 1949.
- 8 JUNQUEIRA, L. C. U., FAVA-DE-MORAES, F. Comparative aspects of the vertebrate major salivary glands biology. In: _____. *Sekretion und exkretion*. Berlin: Springer-Verlag, 1965. v.2, p.36-48.
- 9 KUMEGAWA, M., TAKUMA, T., TAKAGI, Y. Precocious induction of secretory granules by hormones in convoluted tubules of mouse submandibular glands. *Am. J. Anat.*, v.149, p.111-4, 1977.
- 10 LACASSAGNE, A. Dimorphisme sexuel de la glande sous-maxillaire chez la souris. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.*, v.133, p.180-1, 1940.
- 11 LACASSAGNE, A., CHAMORRO, A. Reaction a la testostérone de la glande sous-maxillaire, atrophiée consecutivement a L'hypophysectomie chez la souris. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.*, v.134, p.223-4, 1940.
- 12 LEITE, P. E. P. *Estudo estrutural, histoquímico e bioquímico da glândula submandibular da camundonga portadora da síndrome anovulatória androgênica*. São Paulo, 1976. 63p. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- 13 LISON, L., PINHEIRO, P. In: LISON, L. *Histochimie et cytochimie animales: principes et méthodes*. 3.ed. Paris: Gauthiers-Villars, 1960. 2v.
- 14 LIU, F. T. Y., LIN, H. S. Effects of some contraceptive steroids on growth and development of salivary glands and incidence of dental caries in female rats. *J. Dent. Res.*, v.48, p.477-82, 1969.
- 15 LYON, M. F., HENDRY, I., SHORT, R. V. The submaxillary salivary glands as test organs for response to androgen in mice with testicular feminization. *J. Endocrinol.*, v.58, p.357-62, 1973.
- 16 MELHADO, R. M. *Efeitos do antiandrógeno acetato de ciproterona na glândula submandibular do camundongo*. Araçatuba, 1980. 126p. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

- 17 MOWSZOWICZ, I. et al. Synandrogenic and antiandrogenic effect of progestins: comparison with nonprogestational antiandrogens. *Endocrinol.*, v.95, p.1589-99, 1974.
- 18 NOGUEIRA-CAMPOS, C. R. *Efeitos do progestágeno acetato de medroxiprogesterona na glândula submandibular e no tecido de granulação da ferida cirúrgica cutânea em camundongos*. Estudo ponderal, histológico e histoquímico. Araçatuba, 1982. 59p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.
- 19 NOGUEIRA-CAMPOS, C. R., MELHADO, R. M. Effects of medroxiprogesterone acetate on submandibular salivary gland of female mice. *J. Nihon Univ. Sch. Dent.*, v.26, p.310-5, 1984.
- 20 OZONO, S. et al. Immunohistochemical evidence for the presence of progesterone receptor in rat submandibular glands. *Cell. Struct. Funct.*, v.16, p.511-3, 1991.
- 21 RAYNAUD, J. Controle hormonal de la glande sous-maxillaire de la Souris. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, v.94, p.399-523, 1960.
- 22 ROSNER, J. M. et al. "In vitro" biosynthesis of androgens by rat submaxillary glands. *Acta Physiol. Latinoam.*, v.15, p.221-3, 1965.
- 23 ROSSI, J. A. *Alterações das glândulas submandibulares de camundongos fêmeas durante a prenhez e a lactação*. Estudo histológico, histométrico e histoquímico. Londrina, 1986. 79p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina.
- 24 SAKABE, K. et al. Progestin receptor and its localization in submandibular gland of male rats. *I. R. C. S. Med. Sci.*, v.14, p.928-9, 1986.
- 25 SATO, S., CHEN, J. N., MARUYAMA, S. A histochemical study of the effects of 19-nortestosterone on the RNA in the secretory tubules of the submandibular glands of castrated-andrenalectomized mice. *Arch. Oral Biol.*, v.22, p.563-9, 1977.
- 26 TAMES, D. R. *Efeitos da castração na modulação estrutural e bioquímica dos ductos granulados da glândula submandibular do camundongo*. São Paulo, 1979. 94p. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- 27 TRAVILL, A. The effect of pregnancy on the submandibular glands of mice. *Anat. Rec.*, v.155, p.217-22, 1966.