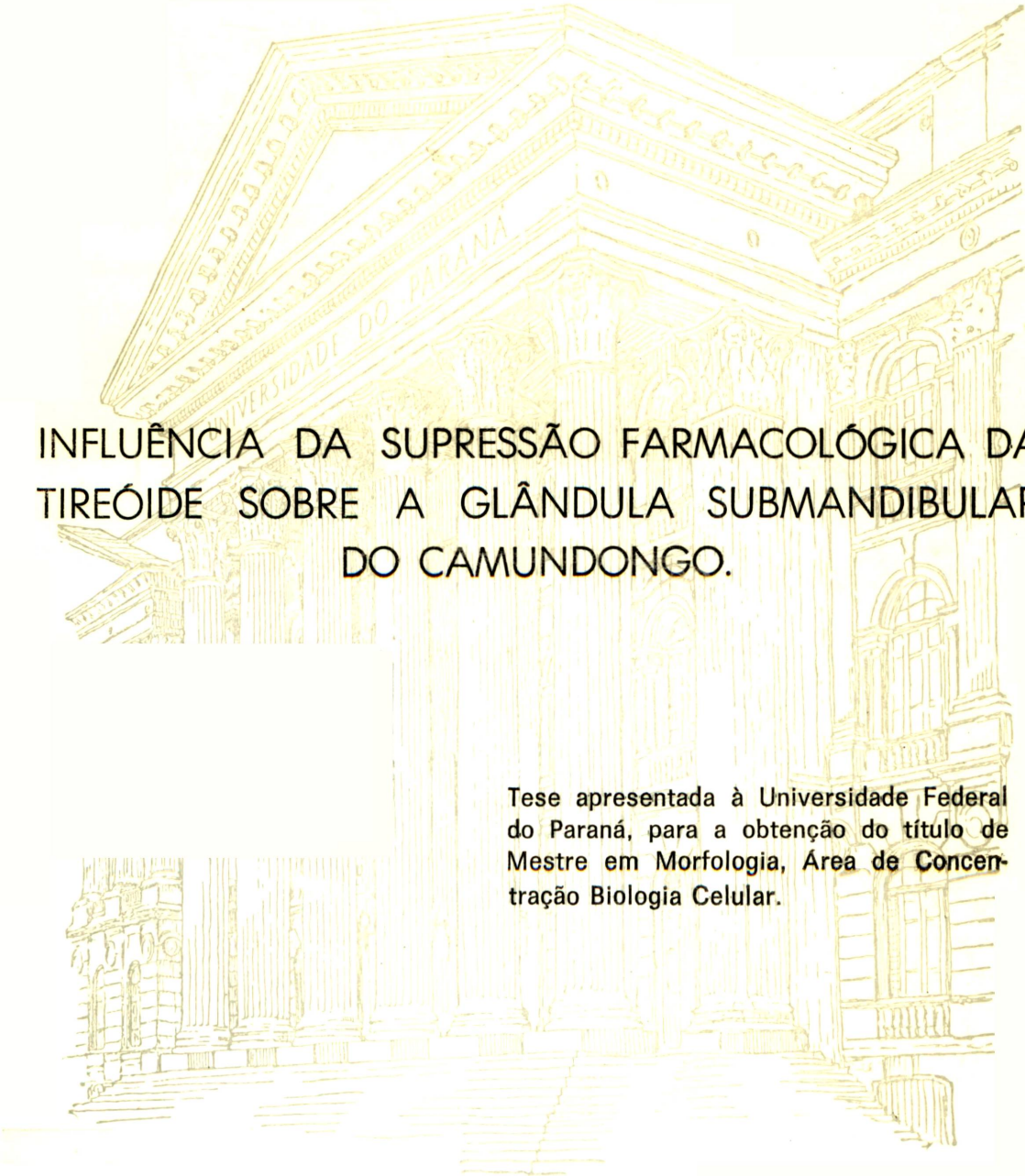


VIVIANE MARA WOHL



INFLUÊNCIA DA SUPRESSÃO FARMACOLÓGICA DA  
TIREÓIDE SOBRE A GLÂNDULA SUBMANDIBULAR  
DO CAMUNDONGO.

Tese apresentada à Universidade Federal  
do Paraná, para a obtenção do título de  
Mestre em Morfologia, Área de Con-  
centração Biologia Celular.

CURITIBA

1991

VIVIANE MARA WOHL

INFLUÊNCIA DA SUPRESSÃO FARMACOLÓGICA DA  
TIREÓIDE SOBRE A GLÂNDULA SUBMANDIBULAR  
DO CAMUNDONGO.

Tese apresentada à Universidade Federal  
do Paraná, para a obtenção do título de  
Mestre em Morfologia, Área de Concen-  
tração Biologia Celular.

CURITIBA

1991

Aos meus pais ,  
pelo carinho, compreensão e incentivo.

Aos meus irmãos, pelo apoio  
constante, incentivo  
e auxílios prestados.

A PROF<sup>a</sup>. DRA. IRENE DA SILVA

pela amizade, pela orientação segura,  
e pelas horas dedicadas a este traba-  
lho e a mim, que não foram poucas, e  
permitiram a realização desta tese.

## AGRADECIMENTOS

A professora Cloris D. Faraco, a quem devo a iniciação na área de Biologia Celular, pela orientação, apoio e incentivo durante o Curso de Graduação, e auxílios durante a realização deste trabalho.

A professora Dra. Maria Célia Jamur, pelo auxílio constante durante o Curso de Pós-Graduação, cedendo o laboratório, material e equipamentos, pelo incentivo e sugestões valiosas durante a execução desta tese.

A professora Dra. Edith S. E. Fanta, Coordenadora do curso de Pós-Graduação em Morfologia, pelo apoio durante o curso.

A professora Dra. Vânia B. Vieira de Souza, pelas sugestões e auxílio na revisão deste trabalho.

A amiga e secretária do Curso de Pós-Graduação em Morfologia, Sra. Elinor Ladanivsky, por seu apoio e carinho sempre constantes em todas as horas.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Morfologia, pela dedicação.

Ao amigo Andreas Sielaff pelo apoio e empréstimo da impressora.

A Srta. Betina Mehler pelo auxílio e apoio nas fases finais deste trabalho.

Ao amigo Francisco Sieracki pela colaboração, incentivo e auxílio nos estudos bibliográficos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia Celular pelos auxílios prestados e pela amizade.

Aos professores, funcionários e estagiários do Centro de Microscopia Eletrônica, pelo apoio nas etapas do trabalho que envolveram estudos de ultraestrutura.

Aos professores e estagiários do Laboratório de Estatística, pelo auxílio na parte estatística.

As bibliotecárias do Setor de Ciências Biológicas da UFPR pelo auxílio prestado na revisão bibliográfica.

Ao professor Dr. Ives José Sbalqueiro, do Departamento de Genética - Laboratório de Citogenética Animal, pelo empréstimo do microscópio, onde foram fotografadas as lâminas de microscopia óptica.

Aos funcionários e estagiários do Laboratório Fotográfico do Setor de Ciências biológicas, pela execução das fotografias apresentadas.

Aos professores e funcionários do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, onde foi desenvolvido este trabalho.

Ao professor Dr. Paulo E. P. Leite que nos concedeu o empréstimo da ocular histométrica.

A professora Dra. Conceição Aparecida S. A. Minetti pelas sugestões iniciais deste trabalho.

A professora Rosane de Mello Santo Nicola, pela revisão do texto.

Ao professor Dr. Philip Gorin, pela tradução do sumário.

Aos amigos pelo apoio sempre constante, paciência e carinho dedicados durante estes anos de estudo.

Ao CONCITEC, pelo financiamento parcial deste trabalho, à CAPES e CNPq, pela concessão da bolsa de Mestrado.

A todas as pessoas que colaboraram de alguma forma, direta ou indiretamente, e que contribuíram para a realização deste trabalho.

A Deus, pela minha família, pelos amigos e pela vida.

## SUMARIO

No presente trabalho foram estudadas as alterações morfológicas da glândula submandibular de camundongo após a indução do hipotireoidismo pelo uso de metimazol, administrado na água de beber.

O tratamento foi iniciado na fase de gestação dos camundongos e continuou por todo o período de vida dos animais jovens e adultos. Foram encontradas diferenças na resposta da submandibular ao hipotireoidismo entre os animais de diferentes idades. Essas diferenças foram mais acentuadas nos animais jovens, e foram notadas principalmente num dos segmentos do adenômero da submandibular, o ducto granuloso. Nos camundongos adultos, a interpretação dos resultados foi feita através de morfometria e essa avaliação mostrou que, nessa idade, não houve atrofia dos ductos granulosos como a encontrada nos animais jovens.

As observações feitas indicam que o tempo de duração da supressão tireoidiana pelo metimazol interfere na ação do hipotireoidismo sobre a glândula salivar submandibular.

## SUMMARY

Studies were carried out on modifications of submandibular gland of the mouse, following induction of hypothyroidism using methimazole in the drinking water.

The treatment was initiated during pregnancy of the parent mouse and continued with the progeny of various ages, from young to adult. Differences were observed in the submandibular gland, due to the hypothyroidism, depending on the age of mouse. These differences were greater in young animals, and the modifications were noted mainly in the granular duct. In adult mice, morphometric studies showed that atrophy of the granular ducts did not occur, in contrast with young animals.

In our studies on the salivary gland it was found that the duration of the treatment with methimazole had a significant effect on salivary glands development.

## INDICE

I.	INTRODUÇÃO .....	1
II.	REVISÃO DE LITERATURA .....	3
III.	MATERIAL E METODOS .....	15
3.1	Métodos histológicos.....	17
3.1.1	Microscopia óptica .....	17
3.1.2	Obtenção de cortes e coloração .....	18
3.1.3	Soluções fixadoras e corantes .....	18
3.1.4	Microscopia óptica .....	20
3.1.5	Soluções fixadoras e corantes .....	21
3.2	Métodos histométricos .....	23
3.3	Métodos estatísticos .....	23
3.3.1	Avaliação do peso corporal .....	23
3.3.2	Avaliação do peso glandular .....	24
IV.	RESULTADOS .....	25
4.1	Peso corporal .....	25
4.2	Peso glandular .....	26
4.3	Morfométricos .....	30
4.3.1	Camundongos fêmeas .....	30
4.3.2	Camundongos machos .....	30
4.4	Histologia .....	31
4.4.1	Glândula submandibular .....	31
4.4.1.1	Camundongos adultos .....	31
4.4.1.2	Camundongos jovens .....	31
4.4.2	Tireóide .....	33
4.4.2.1	Camundongos adultos .....	33
4.4.2.2	Camundongos jovens .....	33
V.	DISCUSSÃO .....	35
VI.	CONCLUSÕES .....	42
	DOCUMENTAÇÃO FOTOGRAFICA .....	43
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	49

## I. INTRODUÇÃO

O parênquima da glândula submandibular do camundongo é constituído por unidades morfofuncionais, os adenômeros, que são formados por diversos segmentos: ácinos, ducto intercalar, ducto granuloso, ducto estriado e ducto excretor.

Na glândula submandibular desses animais, existem características marcantes como órgão hormônio-dependente, dado o seu conhecido dimorfismo sexual (LACASSAGNE, 1940a) caracterizado por maior número e tamanho dos ductos granulosos nos animais machos, bem como pelo predomínio de substâncias biologicamente ativas relacionadas com a atividade funcional da glândula (BARKA, 1980). Tais estruturas são dependentes de hormônios androgênicos e, em consequência da castração do animal macho, notáveis modificações ocorrem num dos componentes do adenômero, o ducto granuloso. Este, na ausência de estímulo androgênico passa a apresentar morfologia e função de ducto estriado, sendo revertido o processo após a administração de testosterona (JUNQUEIRA et al., 1949; CYRIL-LUCKMAN, 1961; HOUSSAY et al., 1966; CHRETIEN, 1972; DOINE, 1976; DOINE et al., 1978; BRUSCHI, 1979; DOINE & FAVA-DE-MORAES, 1979).

A estrutura glandular é também dependente da integridade da glândula tireóide, e no hipotireoidismo sofre atrofia, caracterizada principalmente pelas diminuições do número e do tamanho dos ductos granulosos (ARVY & GABE, 1950; RAYNAUD, 1960; GRESIK & BARKA, 1980).

A maior parte das investigações realizadas dentro deste assunto são feitas a nível bioquímico, estudando os polipeptídeos biologicamente ativos da submandibular, verificando as modificações ocorridas tanto na presença excessiva dos hormônios tireoidianos, quanto na ausência dos mesmos. Poucos estudos têm sido realizados nos últimos anos a respeito dos efeitos causados pela falta dos hormônios tireoidianos (T3 e T4) sobre a estrutura dos componentes do parênquima da glândula submandibular de camundongo.

O hipotireoidismo pode ser induzido por métodos variáveis, podendo ser obtida a supressão tireoideana através de vários fármacos, pela tireoidectomia e pela radiodestruição. Essa disfunção glandular pode ser provocada nos diferentes períodos de vida, desde animais recém-nascidos, até a fase adulta.

A maioria dos trabalhos consultados refere-se a estudos da hipofunção da tireóide induzida na vida pós-natal. Não é encontrada na literatura, referência aos efeitos do hipotireoidismo provocado na fase de vida intra-uterina, sobre a glândula submandibular de camundongo.

Este trabalho se propõe a analisar histológica e morfometricamente os componentes do adenômero em submandibular de machos e fêmeas adultos, após a indução do hipotireoidismo na fase fetal, pelo uso do metimazol. A influência da hipofunção tireoideana será analisada também na submandibular dos animais jovens nível de microscopia óptica, verificando-se em que fase da vida se dá o aparecimento dos ductos granuloses, após o tratamento.

## II. REVISÃO DA LITERATURA

As glândulas submandibulares de camundongo constituíram-se num amplo campo de investigação a partir da descrição de sua organização histológica feita por Tupa (1926) apud Gresik (1980).

Diversos trabalhos mostraram que o parênquima glandular apresenta os ácinos conectados com a cavidade oral por um complexo sistema de ductos constituídos por quatro segmentos, cujo aspecto apresenta-se diversificado (Fig.1), de acordo com o sexo e a idade (LACASSAGNE, 1940a; RAYNAUD, 1960; DESCLIN, 1960; JUNQUEIRA & FAVA-DE-MORAES, 1965; HOUNG & VAN LENNEP, 1978).

A porção acinar, seromucosa do tipo homócrina, é formada por grupos de células piramidais, com núcleo basal arredondado. No citoplasma, encontram-se dispersos grânulos de secreção, cujo número varia com a atividade secretora. Após o processo de secreção, apresentam-se em menor número e confinados à região apical da célula. Pode-se observar, a nível de microscopia eletrônica, na região basal da célula, o retículo endoplasmático granular bem desenvolvido, além de numerosas mitocôndrias.

Os ductos intercalares são muito curtos, estreitos e formados por células baixas ou cúbicas, com um núcleo proeminente. Tais células possuem poucas mitocôndrias, e complexo de Golgi pouco desenvolvido; outras organelas não

são descritas nas células desse ducto. Os ductos intercalares são responsáveis pela conexão dos ácinos com os ductos granuloso (JUNQUEIRA et al., 1949). Envolvendo externamente ácinos e ductos intercalares, encontram-se as células mioepiteliais. Estas se dispõem entre a membrana basal e as células, de tal modo que promovem a liberação da saliva e atuam como suporte contra a distensão dos ácinos e ductos durante o processo secretório.

Os ductos granuloso são formados por um epitélio simples constituído de células piramidais. Contudo, são encontradas algumas diferenças nas características estruturais entre machos e fêmeas. As células são mais altas, e em maior número nos ductos dos machos do que nos das fêmeas. O núcleo situa-se próximo à base, ou centralmente, conforme a quantidade de grânulos. No citoplasma, o retículo endoplasmático granuloso é pouco desenvolvido e localizado na região basal, paranuclear e até apical, sendo menos desenvolvido nas fêmeas que nos machos e ficando restrito ao terço basal. O complexo de Golgi é constituído de sáculos membranosos, ocupando geralmente a região supranuclear.

Os grânulos de secreção apresentam-se esféricos e/ou irregulares, localizados nos dois terços superiores da célula sendo menores e em menor número nas fêmeas e com distribuição restrita ao pólo apical da célula. O produto de secreção destes grânulos é de natureza polipeptídica.

A membrana plasmática apresenta diferenciações na região apical, como microvilos e, lateralmente, observa-se o complexo juncional, os desmosomos e as interdigitações;

na região basal exhibe poucas invaginações, apresentando-se em maior número nas fêmeas.

Os ductos estriados são constituídos por um epitélio colunar simples, cujas células apresentam um núcleo oval e central. No citoplasma, o complexo de Golgi nem sempre é observado; os retículos endoplasmático liso e granuloso são pouco desenvolvidos e relativamente esparsos. O que chama a atenção nestas células é uma grande concentração de mitocôndrias na região basal, entre as invaginações verticais e paralelamente dispostas, da membrana plasmática. Além disso, a membrana apresenta, na região apical, estruturas semelhantes a microvilos, as quais se projetam para a luz; na superfície de contato entre as células vizinhas, observa-se o complexo juncional, desmosomos e interdigitações.

Os ductos excretores não têm recebido muita atenção dos investigadores; são constituídos por células cúbicas, com núcleo central, e citoplasma basal com muitas mitocôndrias ocupando a posição terminal no sistema de ductos da submandibular (JUNQUEIRA et al., 1949).

Essa glândula apresenta um dimorfismo sexual, que é restrito ao ducto granuloso (LACASSAGNE, 1940a,b). A partir desse fato inúmeros estudos morfológicos, bioquímicos e fisiológicos vêm sendo feitos (ALOE & LEVI, 1980).

O ducto granuloso tem grande importância fisiológica no que se refere à secreção de várias substâncias biologicamente ativas. Pelo menos vinte e cinco polipeptídeos já foram isolados da glândula submandibular de camundongo

(BARKA, 1980), como fator de crescimento nervoso (COHEN, 1962; ALOE & LEVI-MONTALCINI, 1980), fator de crescimento epidermal (COHEN, 1962), renina (WERLE et al., 1957), fator de crescimento epitelial (JONES; ASHWOOD SMITH, 1970), fator letal (HOSHINO & LIN, 1968), ribonucleases (MAYNER & ACKERMAN, 1963), amilases (CHRETIEN & ZAJDELA, 1965) e proteases (JUNQUEIRA et al., 1949; SREEBNY et al., 1955 b), entre outros.

Os ductos granulados não são ainda desenvolvidos nos recém-nascidos; sua diferenciação começa a ocorrer, em ambos os sexos, ao redor de 21 dias de vida, o que corresponde à puberdade dos camundongos. Esse processo de diferenciação é mais rápido nos machos do que nas fêmeas, resultando num claro dimorfismo sexual nos adultos (GRESIK, 1980) caracterizado pelo maior número e tamanho e pela atividade secretora mais pronunciada no macho adulto, quando comparado ao da fêmea (CHRETIEN, 1977). Esse desenvolvimento está completo ao redor do 40<sup>o</sup> dia de vida dos camundongos (JUNQUEIRA et al., 1949; GRESIK & MACRAE, 1975).

Enquanto a porção acinar parece ser independente do controle hormonal, a porção tubular (ducto estriado e granuloso), localizada entre o ácino e o ducto excretor, varia com o estado endócrino do animal (JUNQUEIRA et al., 1949). Lacassagne (1940) suspeitou que essa diferença estrutural poderia ser acompanhada de uma variação na composição dos produtos de secreção. Foram demonstradas por Junqueira et al. (1949) variações dos conteúdos enzimáticos da submandibular, relativas ao sexo.

Nos primeiros dias de vida pós-natal, inicia-se um processo de diferenciação (andrógeno-independente) com o surgimento de ductos estriados em ambos os sexos (TAKUMA et al., 1977), que são os precursores dos ductos granuloso-

Em geral, a diferenciação pós-natal das células do ducto granuloso é paralela ao aparecimento de várias substâncias intra-glandulares (GRESIK, 1980). Estes fatos coincidem com o início da produção de andrógenos testiculares (JEAN FAUCHER et al., 1978), comprovando a participação desses hormônios no desenvolvimento dos ductos granulosos.

A dependência androgênica desta glândula foi confirmada também pela descoberta de proteínas de ligação para 5-alfa-dihidrotestosterona no extrato citoplasmático dessa glândula. Tais sítios ligantes de andrógenos são detectáveis por volta do 5 dia de vida extra-uterina (TAKUMA et al., 1977).

LACASSAGNE (1940a) mostrou que a castração de camundongos machos produz uma atrofia nos ductos granuloso-

A partir dessa descoberta, vários estudos histológicos e bioquímicos vêm sendo feitos a respeito da ação da testosterona sobre a submandibular. Raynaud (1960) e Chrétien (1972) revelaram que glândula submandibular de camundongo castrado apresenta estrutura e ultra-estrutura semelhante à da fêmea. Porém a administração de testosterona

exógena em animais submetidos à castração, é capaz de recuperar a histofisiologia da glândula (JUNQUEIRA e cols., 1949; LUCKMAN, 1961; CHRETIEN, 1968; DOINE, 1976; BRUSCHI, 1979). Por outro lado a injeção de testosterona em fêmeas normais de camundongos, causa alteração na estrutura da glândula, que se torna similar à dos machos (LACASSAGNE, 1940b; RAYNAUD, 1960).

Pelo menos três hormônios estão envolvidos na manutenção da estrutura e funções da glândula submandibular: os hormônios androgênicos, os tireoidianos e os adrenocorticosteróides (LACASSAGNE, 1940; RAYNAUD, 1960; CHRETIEN, 1977; GRESIK et al., 1981a). Outros hormônios ainda são citados na literatura, como estrógenos (CHRETIEN, 1977), progestágenos (MOWSZOWICS et al., 1974) e insulina (KUMEGAWA et al., 1976), mas seus efeitos na estrutura da submandibular não são relevantes isoladamente, quando comparados aos três anteriores.

Cita-se ainda na literatura, trabalhos mostrando os efeitos dos esteróides anabolizantes sobre a glândula submandibular do camundongo castrado. Estes são capazes de recuperá-la tanto no aspecto estrutural quanto bioquímico, à semelhança dos andrógenos típicos (HOYSSAY et al., 1966; HARFIN, 1969; DOINE, 1976; DOINE et al., 1978; DOINE & FAVA-DE-MORAES, 1979).

Raynaud (1964) observou mudanças estruturais nas células do ducto granuloso, concomitantes com alterações no estado das glândulas tireóide e adrenocortical. Kumegawa et al. (1976) administrando simultaneamente testosterona,

tiroxina, hidrocortisona e insulina, causaram um desenvolvimento precoce dos ductos granulosos.

Para Raynaud (1960) o envolvimento dos hormônios adrenocorticosteróides com a glândula submandibular estaria na dependência da ação tireoidiana. Mostrou que a tiroxina é ativa na presença de cortisona e corticosterona. A tiroxina atua sobre a submandibular mediante estímulo sobre a córtex da supra-renal, fazendo secretar hidrocortisona.

A hipofisectomia induz extrema atrofia nos ductos granulosos e reduz a quantidade de seus grânulos de secreção. A testosterona administrada conjuntamente com a tiroxina previne a regressão deste componente da glândula após a hipofisectomia (SHAFER & MUHLER, 1960).

Aloe e Levi (1980), Gresik e Barka (1980) e Chabot et al. (1987) mostraram que a tiroxina sozinha era capaz de induzir um desenvolvimento precoce de células do ducto granuloso, quando administrada ao recém-nascido por vários dias.

Vários trabalhos de décadas passadas referem-se à participação dos hormônios da tireóide como fonte de estimulação da glândula submandibular de camundongo (LEBLOND & GRAD, 1948; GRAD & LEBLOND, 1949; ARVY & GABE, 1950a; CYRIL & LUCHMAN, 1961; RAYNAUD, 1964; KUMEGAWA ET AL., 1976; GRESIK, 1980).

Grad e Leblond (1949) asseguram que tiroxina e testosterona são ambos essenciais na manutenção da glândula submandibular. Raynaud (1964) sugeriu que a tiroxina

desempenhava um papel menor que a testosterona, enquanto Arvy e Gabe (1950) deduziram que a tiroxina era a fonte de estimulação, com a testosterona agindo apenas na liberação do hormônio pela glândula tireóide.

Na primeira semana de vida dos camundongos, não são identificados receptores específicos para andrógenos na glândula submandibular (DUNN et al., 1973 ; TAKUMA et al., 1977). Estes aparecem na segunda semana de vida, pouco antes do aparecimento dos ductos granulosos e rapidamente alcançam os níveis dos adultos (VERHOEVEN & WILSON, 1976). A falta de receptores específicos para andrógenos na glândula do animal jovem explicaria o fato de as injeções de andrógenos não induzirem o aparecimento dos ductos granulosos e seus produtos de secreção precocemente (DUNN et al., 1973; VERHOEVEN & WILSON, 1976, GRESIK, 1980).

A incapacidade de andrógenos induzirem o aparecimento precoce de células do ducto granuloso, foi confirmada por Dunn e Wilson (1975), Kumegawa et al., (1977) e Aloe e Levi (1980).

Em contraposição, injeções diárias de tiroxina desde o primeiro dia de vida pós-natal foram capazes de induzir o aparecimento precoce de muitas células pequenas do ducto granuloso e mensuráveis níveis de NGF (Fator de Crescimento Nervoso) (ALOE & LEVI, 1980; GRESIK, 1980). Andrógenos dados a camundongos em desenvolvimento, pré-tratados com tiroxina, agiram sinergicamente induzindo o aparecimento de células de ducto granuloso maiores e em maior número do que foi produzido por tiroxina sozinha (GRESIK & BARKA, 1980).

Os hormônios da tireóide agem induzindo o surgimento de receptores androgênicos em células dos ductos granuloso da submandibular (GRESIK, 1980).

Há evidências de uma ação diferenciada da tiroxina em relação ao sexo. Os resultados da tireoidectomia em camundongos foram estudados por Arvy e Gabe (1950) e Raynaud (1960), que demonstraram uma completa atrofia no ducto granuloso das fêmeas; nos machos, apesar de ter havido um menor grau de regressão no ducto, as células não produziram secreções normais.

Raynaud (1960) propôs que a tiroxina é responsável pelo desenvolvimento dos ductos granuloso em ambos os sexos, até a puberdade; após esse período, ela é necessária para manter a integridade dos ductos granuloso nas fêmeas, sendo que nos machos, é a testosterona que promove o estímulo para o maior desenvolvimento dos ductos granuloso.

Níveis de hormônios tireoideanos são aparentemente mais elevados em camundongos jovens do que em animais adultos. Nos jovens não há diferença na quantidade do hormônio tireoideano secretado, em relação ao sexo. Uma diferenciação aparece em idade mais avançada, quando fêmeas maduras secretam o dobro de hormônio que os machos (HURST & TURNER, 1947; LUCHMAN, 1961). Gresik e Maruyama (1987) encontraram diferenças no padrão de indução de ductos granuloso por T3 (triiodotiroxina) e DHT (dihidrotestosterona), relacionadas com a idade dos camundongos. Nas fêmeas velhas a resposta para T3 diminui, mas aumenta para DHT.

É conhecido também que na glândula das fêmeas é mais acentuada a resposta aos efeitos da L-tiroxina do que no macho, por todo o do ciclo de vida (ALOE & LEVI, 1980).

Além de estimular a diferenciação e crescimento da submandibular (ALOE & LEVI, 1980; GRESIK & BARKA, 1980), a tireóide é necessária para a manutenção da integridade estrutural daquela glândula, particularmente do ducto granuloso (ARVY & GABE, 1950 a; RAYNAUD, 1960).

Muitos estudos vêm sendo feitos a respeito da ação dos hormônios tireoidianos sobre a produção dos polipeptídeos da glândula submandibular de camundongos, sendo responsáveis pela indução do aparecimento de produtos específicos nas células do ducto granuloso, tais como o fator de crescimento nervoso (ALOE & LEVI, 1980; WALKER et al., 1981), fator de crescimento epidermal, renina e esteropeptidases (TAKUMA et al., 1978; HOSOI et al., 1979, GRESIK & BARKA, 1980; GRESIK, 1980).

Hormônios da tireóide aceleram e aumentam a produção de fator de crescimento epidermal (GRESIK & BARKA, 1980) e aumentam a concentração de fator de crescimento nervoso da glândula submandibular de camundongo, e outros tecidos (ALOE & LEVI, 1980). Para Walker et al. (1981) a tiroxina atua na indução do fator de crescimento nervoso, enquanto a testosterona induz a produção de fator de crescimento nervoso e epidermal.

Nas fêmeas, a taxa de renina é menor que nos machos e aumenta com a administração de tiroxina, diminuindo

com a administração de propiltiuracil (PTU), droga anti-tireoidiana (WILSON et al., 1985).

Em camundongos com síndrome de feminilização (Tfm), que não possuem receptores para andrógenos (LION et al., 1970), foi induzida por hormônio da tireóide, a síntese de fator de crescimento epidermal, fator de crescimento nervoso, enzimas e renina (WILSON et al., 1985), bem como o desenvolvimento de ductos granulosos (HOSOI et al., 1979).

Embora tenham ação conjunta, os hormônios tireoidianos e androgênicos agem independentemente, pois nos Tfm, a síntese de renina na submandibular foi induzida por T4 e não pela testosterona (TRONIK & ROUGEON, 1988). Ação independente destes também foi encontrada por Takuma et al. (1977).

Têm sido investigados também nesses últimos anos os efeitos provocados pela ausência do hormônio tireoidiano. Valle et al. (1985) observaram uma diminuição nos níveis de testosterona, T4 e T3 quando foi induzido hipotireoidismo em animais jovens.

A administração de droga anti-tiroideana mostrou uma marcada atrofia nos ductos granulosos da submandibular de camundongos adultos, que apresentaram diâmetro reduzido e células quase desprovidas de grânulos (RAYNAUD, 1964; SHAFER & MUHLER, 1956), e também redução no número de ductos granulosos (KRONMAN & LEVENTHAL, 1967). Nos camundongos jovens, a falta do hormônio tireoidiano, durante o período de desenvolvimento, afeta a formação de grânulos de secreção (KUMEGAWA et al., 1977). Similar atrofia nos

ductos granulosos foi encontrada anteriormente, por Muhler et al. (1956), com o emprego de  $I^{131}$  em concentrações suficientes para inibir a função glandular.

Arvy e Gabe (1950) demonstraram que a tireoidectomia induz atrofia na glândula submandibular, similar àquela produzida por hipofisectomia.

Tem sido demonstrado que o hipotireoidismo está associado à diminuição no conteúdo de proteínas do extrato da submandibular (POITON et al., 1979) e à redução das atividades de alfa-glicerofosfatases, desidrogenases (TAKUMA et al., 1977) e fator de crescimento nervoso (WATSON et al., 1982). Por outro lado, tem aumentado a produção de fator de crescimento epidermal na submandibular de camundongo (WALKER et al., 1981).

Os trabalhos de Hosoi e colaboradores (1981) e Walker et al. (1981), confirmaram que T3 induz a produção de fator de crescimento epidermal, e que T4 induz a produção de fator de crescimento epidermal (ALOE & LEVI, 1980; GRESIK, 1980) nesses animais. Também confirmaram que a atividade da renina é regulada por testosterona e T4 (WILSON et al., 1982).

Os fatos relatados acima refletem a considerável influência que os hormônios tireoidianos têm sobre a glândula submandibular de roedores, tanto na bioquímica de seus produtos de secreção como na estrutura histológica.

### III. MATERIAIS E METODOS

Nos experimentos deste trabalho foram utilizadas as glândulas salivares submandibulares e tireóides de 72 camundongos *Mus musculus* adultos e 24 camundongos jovens, de ambos os sexos. Os animais foram criados no biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Todos os animais receberam alimento e água à vontade durante todo o experimento.

Camundongos adultos foram acasalados e de cada ninhada mantiveram-se quatro casais de filhotes, que foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

- a) grupo controle: 24 animais sem tratamento farmacológico;
- b) grupo tratado: 24 animais tratados com supressor da tireóide (metimazol, comercialmente conhecido como tapazol);
- c) grupo recuperado: 24 animais com a tireóide suprimida e depois recuperados com injeções de L-tiroxina sódica.

O aparecimento de um tampão mucoso vaginal marca o início da prenhez. As fêmeas grávidas de duas semanas foram tratadas com Tapazol (droga supressora da tireóide) a 0,02% na água de beber (SILVA & LARSEN, 1982 ; SILVA & MATTEWS, 1984) até o nascimento dos filhotes, e durante a lactação.

Após o desmame os filhotes foram tratados com tapazol a 0,02% na água de beber e a mãe foi desprezada.

O crescimento dos camundongos de todos os grupos foi acompanhado por pesagens feitas em intervalos de sete dias, desde o nascimento até a vida adulta.

Os camundongos jovens dos grupos controles e tratados foram sacrificados aos 16, 20, 22 e 28 dias de idade, para o estudo do aparecimento dos ductos granulosos da glândula submandibular.

A condição de hipotireoidismo foi verificada por um ganho de peso retardado (BACHMANN et al., 1985; VALLE et al. 1985), e pela histologia da tireóide (KRONMAN & LEVENTHAL, 1967).

Cada um dos animais do grupo recuperado recebeu 0,2 ml (0,12mg) de L-tiroxina sódica em solução fisiológica 0,9%, em aplicação subcutânea na região do dorso corporal, durante cinco dias. Vinte e quatro horas após a última injeção, os animais deste grupo foram sacrificados, juntamente com os dos grupos controle e tratado. Todos os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical na décima semana de vida. A seguir, as glândulas tireóides e submandibulares foram dissecadas e as submandibulares, após lavagem em solução salina e secagem em papel filtro, foram pesadas em balança de sensibilidade de 0,01 mg.

Ambas as glândulas foram cortadas em pequenos fragmentos e processadas para observação ao microscópio

óptico, sendo que as submandibulares foram também processadas para microscopia eletrônica.

### 3.1 Métodos Histológicos

#### 3.1.1 Microscopia Óptica

As amostras de tireóide e submandibular foram fixadas por imersão em paraformaldeído com tampão fosfato 0,2M e  $\text{CaCl}_2$ , durante 6 horas, a 4°C.

Após a fixação, o tecido foi lavado em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4, por 20 minutos.

A desidratação foi feita em uma série de soluções de álcool, em concentrações crescentes: 50%, 70%, 90% e 100%, sendo feitas, em cada etapa, duas trocas a cada 20 minutos.

O tecido foi pré-infiltrado em partes iguais de etanol 100% e Glicol Metacrilato (GMA) por duas horas; à temperatura ambiente, e infiltrado em solução de infiltração (GMA), "overnight".

A inclusão foi feita em Histroresina Glicol Metacrilato (solução de inclusão). A polimerização foi feita à temperatura ambiente (HAAPALAINEN, 1988).

O uso da Histroresina-GMA foi preferido ao uso de outros métodos conhecidos para histologia porque seu processamento é mais rápido, a resina é fácil de manejar, é hidrossolúvel, e a sua plasticidade permite cortes mais finos, entre 0,5 e 5 $\mu\text{m}$ , além de apresentar melhor resolução ao microscópio óptico.

### 3.1.2 Obtenção dos Cortes e Coloração

Cortes do material com 2um de espessura, foram obtidos em micrótomo tipo "Minot"; depois de serem distendidos em água foram transferidos para lâminas de vidro.

Após secagem a 37°C ou a temperatura ambiente, os cortes das glândulas tireóides foram coradas com H.E., e os das glândulas submandibulares com azul de toluidina a 0,25%. As lâminas foram montadas com Entelan.

### 3.1.3 Soluções Fixadoras e Corantes

A. Paraformaldeído em tampão fosfato a 0,2M e CaCl<sub>2</sub>

Paraformaldeído.....	0,5 g
Tampão fosfato 0,2 M.....	25 ml
Algumas gotas de solução saturada de soda	
Cloreto de cálcio.....	25 mg
Água destilada.....	20 ml

Aquece-se a água a 60°C, e mistura-se o paraformaldeído. Adiciona-se algumas gotas de solução de soda saturada, até que a solução fique cristalina. A seguir, adiciona-se o cloreto de cálcio previamente dissolvido no tampão fosfato. O fixador é filtrado e usado em seguida.

**B. Eosina acidificada**

Eosina amarela (solúvel em água).....1 g  
Água destilada.....100 ml  
Ácido acético glacial.....2 ml

Junta-se a eosina à água e adiciona-se o ácido. A solução pode ser estocada em temperatura ambiente para uso posterior.

**C. Solução de infiltração - Glicol Metacrilato (GMA)**

Historesina.....50 ml  
Ativador.....0,5 g

Dissolve-se o ativador (pó) na historesina agitando constantemente. Usa-se em seguida, ou estoca-se em geladeira por poucos dias, protegendo contra a umidade.

**D. Solução de inclusão**

Solução de infiltração.....15 ml  
Acelerador.....1 ml

Adiciona-se o acelerador à solução de infiltração, agitando sempre.

### 3.1.4 Microscopia Eletrônica

Fragmentos das glândulas submandibulares foram fixados por imersão em uma solução de glutaraldeído a 3% em tampão fosfato 0,15 M pH 7,4 na proporção de 1:1, por um período de duas horas a 4°C. A seguir, o material foi lavado três vezes em solução de lavagem, e pós-fixado com tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) a 1%, por 1 hora.

O material foi desidratado em soluções de acetona de concentrações crescentes: 30%, 50%, 70%, 95% e 100%, por 10 minutos em cada fase.

A inclusão foi feita em Polylyte, em três etapas de 24 horas cada. Na 1ª etapa, foi usado 1 volume de resina Polylyte para 3 volumes de acetona; na 2ª etapa, foi usado 1 volume de resina para 1 volume de acetona, e na 3ª etapa, foram usados 3 volumes de resina para 1 volume de acetona.

A emblocagem em resina pura foi feita em cápsulas de gelatina, onde o material permaneceu por mais 24 horas, a temperatura ambiente. A polimerização foi feita em estufa, a 60°C, durante 72 horas.

De cada grupo de animais controle, tratado e recuperado, foram cortados 6 blocos com navalha de vidro, em ultramicrotomo Sorvall tipo Porter Blum MT2-B.

Os cortes finos colocados sobre tela de cobre, malha 200 mesh, foram corados com acetato de uranila 3% durante duas horas, e solução de Reynolds por 10 minutos, e observadas em microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 300.

Nas eletronicografias de ácinos, ductos granuloso-  
sos, ductos estriados e ductos excretorios, obtidas dos  
grupos experimentais, foram observados e comparados, as-  
pectos gerais das estruturas citoplasmáticas (ribossomos,  
retículo endoplasmático, mitocôndrias, complexo de Golgi e  
grânulos de secreção), principalmente quanto ao número e ao  
tamanho.

### 3.1.5 Soluções Fixadoras e Corantes

#### A. Azul de toluidina

Bórax .....1 g  
Azul de toluidina.....1 g  
Água destilada.....100 ml

Dissolve-se lentamente o bórax na água destilada por  
aquecimento. Tira-se do fogo e adiciona-se o azul de meti-  
leno. Estoca-se na geladeira.

#### B. Solução de lavagem

Cloreto de sódio.....12 g  
Sacarose.....14,6 g  
Água destilada.....200 ml

Dissolve-se os produtos em água destilada e estoca-  
se a solução na geladeira.

## C. Solução de Reynolds

Nitrato de chumbo.....	1,33 g
Citrato de sódio.....	1,76 g
Água destilada.....	30 ml
Hidróxido de sódio 1 N.....	8 ml

Adicionam-se as duas primeiras substâncias citadas acima, à água destilada previamente fervida por 15 minutos e resfriada. Agita-se essa solução por 30 minutos, e adiciona-se o hidróxido de sódio, completando o volume da solução para 50 ml.

## D. Acetato de uranila 3%

Uranila (pó).....	3 g
Água destilada.....	100 ml

Dissolve-se a uranila na água destilada, agitando a solução por 30 minutos e filtra-se. Estoca-se essa solução em recipiente escuro, na geladeira.

### 3.2 Métodos Histométricos

Para analisar as alterações ocorridas no tecido da glândula submandibular, foi feita histometria. Para as medições, foi utilizado foto microscópio Leitz, com ocular integradora Zeiss Kpl 8 x, com graticulo de 100 pontos, e objetiva de 40 x. A partir do quociente de pontos que incidiram sobre as estruturas desejadas (ácinos, ductos granulados, ductos estriados e ductos excretorios), 60 pontos, pelo total de pontos do reticulo (100), admitindo-se um erro máximo de 10%, foi obtido na curva de características operacionais (Schaeffer, 1970), para um quociente de 0,6, o número mínimo de 300 campos a serem contados.

Foram contados 10 campos em cada lâmina de glândula submandibular de animal controle, tratado, e recuperado, de ambos os sexos, sendo 30 lâminas para cada grupo, num total de 300 leituras. Os campos foram escolhidos ao acaso pelo método de varredura horizontal.

### 3.3 Métodos Estatísticos

#### 3.3.1 Avaliação do Peso Corporal

Foram calculadas as médias dos pesos obtidos a cada semana, dos grupos de camundongos controle e tratado.

Para averiguação da hipótese de diferenças entre as médias, foi aplicado o teste "t" de Student, com nível de confiança de 95%.

### 3.3.2 Avaliação do Peso Glandular

Após verificada a homocedasticidade dos grupos através do teste de Bartlett, o peso da submandibular dos camundongos dos grupos controle, tratado e recuperado foi submetido a uma análise de variância do tipo CR-6 (completamente aleatório com 6 grupos). Também foi aplicado teste de comparações múltiplas LSD para verificação dos grupos homogêneos, com nível de confiança de 95%.

#### IV. RESULTADOS

Os resultados obtidos da análise do material experimental descrito anteriormente, são apresentados a seguir.

##### 4.1 Peso Corporal

As médias e variâncias dos pesos corporais dos grupos estão representadas na tabela 1.

A curva de crescimento dos animais dos grupos controle e tratado, machos e fêmeas, pode ser encontrada no gráfico 1.

Gráfico 1: Médias dos pesos corporais dos camundongos machos e fêmeas, do grupo controle (cont.) e tratado (trat.), acompanhados semanalmente.

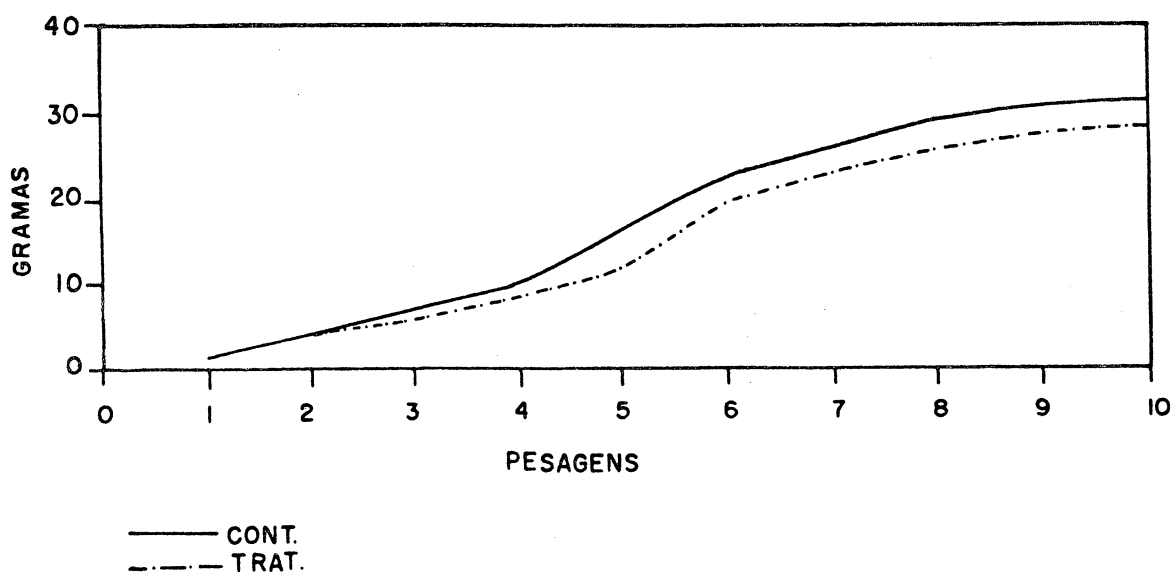


Tabela 1: Médias semanais (M) e variância(v) dos pesos corporais de camundongos machos e fêmeas dos grupos controle e tratado. Os valores são expressos em gramas.

Grupos		fêmea	fêmea	macho	macho
Pesagens\		controle	tratada	controle	tratado
1	M	1,420	1,378	1,518	1,504
	v	0,023	0,030	3,669	0,015
2	M	4,440	3,845	4,601	4,161
	v	0,155	0,139	0,110	0,088
3	M	7,145	6,020	7,179	6,276
	v	0,669	0,352	0,976	0,460
4	M	10,372	8,390	10,529	9,204
	v	1,485	0,768	1,172	1,333
5	M	16,127	11,040	17,658	12,425
	v	2,648	5,363	8,199	11,816
6	M	21,590	19,209	24,350	20,275
	v	1,124	8,316	3,800	2,823
7	M	24,100	21,345	27,675	24,841
	v	1,258	1,602	6,763	2,004
8	M	26,372	23,654	32,333	28,608
	v	1,006	3,072	6,744	3,997
9	M	27,700	25,300	33,883	30,429
	v	3,090	3,180	3,368	3,592
10	M	28,657	25,600	33,387	32,191
	v	1,141	3,538	2,249	2,944

A análise do gráfico 1 permite as seguintes observações em relação aos grupos controle e tratado:

a) não houve diferença significativa de peso entre os recém-nascidos dos grupos experimentais;

b) as diferenças de peso significativas começaram a aparecer a partir da primeira semana de vida, acentuando-se na quarta semana, o que corresponde à quinta pesagem;

c) o peso estabilizou a partir da nona semana de vida, mas permaneceu a diferença significativa entre grupos controle e tratado.

#### 4.2 Peso Glandular

O resultado dos valores obtidos para os pesos glandulares dos grupos controle e tratado se equipararam, ou seja, a diferença não foi significativa. Esses dados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Médias dos pesos glandulares dos animais dos grupos controle e tratado, de ambos os sexos. Nível de confiança de 95%.

Grupo Animal \	Controle	Tratado	Recuperado
Fêmea	0,122g	0,100g	0,129g
Macho	0,170g	0,168g	0,172g

Tabela 3: Médias dos dados morfométricos dos elementos da glândula submandibular de fêmeas dos grupos controle, tratado, e recuperado. Nível de confiança de 95%.

Elemento\Grupo	Controle	Tratado	Recuperado
Acinos	62,853	61,920	54,053 *
Ductos granulosos	14,193	15,350	22,946 *
Ductos estriados	8,063	8,913	6,023 *
Ductos Excretorios	1,166	1,916	1,130
Outros elementos	12,513	12,680	15,736

\* - Difere significativamente, ou seja, grupos controle, tratado, e recuperado não pertencem a mesma população.

Obs - Por outros elementos, compreenda-se quaisquer estruturas que não sejam objeto de análise.

Tabela 4: Médias dos dados morfométricos dos elementos da glândula submandibular do grupo de machos controle, tratado e recuperado. Nível de confiança de 95 %.

Elemento\Grupo	Controle	Tratado	Recuperado
Acinos	40,833	40,810	36,173 *
Ductos granulosos	39,893 *	43,560	46,883
Ductos estriados	1,013	0,873	0,933
Ductos Excretorios	0,610	0,683	0,720
Outros elementos	17,593	14,060	15,226

\* Difere significativamente, ou seja, grupos controle, tratado, e recuperado não pertencem a mesma população.

Obs - Por outros elementos compreenda-se quaisquer estruturas que não sejam objeto de análise.

### 4.3 Morfométricos

Na tabela 3 e 4 estão apresentados os valores morfométricos obtidos das glândulas submandibulares dos animais fêmeas e machos, respectivamente.

#### 4.3.1 Camundongos fêmeas

Os dados morfométricos mostram que, quanto aos componentes glandulares, ácinos, ductos granulados e ductos estriados não houve diferença significativa entre os grupos controle e o grupo tratado, mas o grupo recuperado difere de ambos os grupos, significativamente, para esses mesmos elementos.

No grupo de fêmeas recuperadas houve uma diminuição dos ácinos e ductos estriados, acompanhada de um aumento nos ductos granulados em relação às fêmeas dos grupos tratado e controle. Os ductos excretórios não apresentaram diferenças entre os grupos estudados (Tabela 3).

#### 4.3.2 Camundongos machos

Comparando os grupos recuperado e controle, observamos uma diminuição da quantidade de ácinos e um aumento dos ductos granulados.

O grupo tratado, em relação ao controle, também apresentou um aumento na quantidade de ductos granulados e para

ácinos, não mostrou diferença significativa. Em relação aos ductos estriados e excretorios, não houve diferença significativa entre os grupos estudados (Tabela 4).

#### 4.4 Histologia

##### 4.4.1 Glândula Submandibular - GSM

###### 4.4.1.1 Camundongos adultos

Não foram observadas diferenças marcantes nos cortes da glândula submandibular dos grupos estudados, assim os dados foram avaliados através de morfometria. Os resultados morfométricos de fêmeas e de machos estão apresentados nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Uma avaliação direta dos cortes ao Microscópio Eletrônico e através de eletronicografias (Fig. 8 e 9), não mostrou diferença entre os componentes do adenômero da submandibular dos grupos controle tratado e recuperado.

###### 4.4.1.2 Camundongos jovens

A tabela 5 apresenta os dados referentes ao aparecimento de ductos granulosos (DG) nos jovens. Essas estruturas não foram encontradas antes dos 22 dias de idade em nenhum dos sexos. A partir dessa idade começaram a aparecer

ductos granulosos e também surgiram as diferenças; nos animais do grupo controle esses ductos acharam-se mais desenvolvidos em relação aos do grupo tratado.

Os machos do grupo tratado (Fig. 3) apresentaram ductos granulosos em menor número em relação aos do grupo controle (Fig. 2), mas em ambos, os ductos encontravam-se pouco desenvolvidos, com células pequenas.

Nas fêmeas do grupo tratado, os ductos granulosos não foram observados, enquanto nas fêmeas do grupo controle estavam presentes mas também pouco desenvolvidos como nos machos desse grupo.

Aos 28 dias de idade, as diferenças entre os grupos experimentais se mostraram bem evidentes. Nos machos do grupo controle observou-se uma estrutura glandular semelhante à do adulto no que diz respeito à quantidade e ao tamanho das células do ducto granuloso (Fig. 4); enquanto que nos machos do grupo tratado, os ductos granulosos apresentaram-se menores e menos desenvolvidos que o controle (Fig. 5).

Nas fêmeas nessa mesma idade, também foram observadas diferenças entre os grupos controle e tratado. Enquanto que as fêmeas do primeiro grupo já apresentavam alguns ductos granulosos com pequenas células em desenvolvimento, as fêmeas do segundo grupo apresentavam ductos granulosos menos desenvolvidos.

#### 4.4.2 Tireóide

##### 4.4.2.1 Camundongos adultos

Nos camundongos do grupo controle, os folículos tireoidianos apresentaram-se pequenos em sua maioria, de formato regular e esférico, compostos por células epiteliais cúbicas baixas (Fig.6). No grupo tratado, os folículos apresentaram tamanho maior, predominando os de formato irregular e comprimido, constituídos por células epiteliais cúbicas altas (Fig. 7), com nítida hipertrofia. No grupo recuperado, a estrutura tireoideana encontrada foi a mesma observada no grupo controle.

##### 4.4.2.2 Camundongos jovens

Embora de menor tamanho, os folículos tireoideanos dos animais jovens apresentaram os mesmos aspectos histológicos observados nos grupos experimentais dos adultos.

Tabela 5: Aparecimento de ductos granulosos em camundongos jovens dos grupos controle e tratado de ambos os sexos, com as idades de 16, 20, 22 e 28 dias.

Idade\ Grupos	fêmea controle	fêmea tratada	macho controle	macho tratado
16	---	---	---	---
20	---	---	---	---
22	início de diferenciação de DG	---	início de diferenciação de DG	início de diferenciação, mas em menor grau que o normal
28	poucos DG com células pequenas	início de diferenciação de DG	DG em quantidade e tamanho semelhante ao do animal adulto controle.	DG presentes em menor quantidade que o controle

\* DG - Ducto granuloso

--- - Ductos granulosos ausentes

## V. DISCUSSÃO

A interdependência entre a glândula submandibular e o sistema endócrino é bem documentada e muitos estudos foram realizados a esse respeito nas últimas décadas.

Os hormônios tireoidianos, assim como a testosterona, estão envolvidos no desenvolvimento e manutenção da estrutura normal da submandibular de camundongos (LACASSAGNE, 1940; GRAD & LEBLOND, 1949; RAYNAUD, 1960; CHRETIEN, 1977; GRESIK et al., 1981a).

Nos camundongos adultos, a falta dos hormônios da tireóide provoca uma atrofia na glândula submandibular, caracterizada principalmente pela redução do tamanho e do número de ductos granulosos e de seus grânulos de secreção, sendo que nos jovens, afeta a formação dos mesmos. Também são notados os efeitos do hipotireoidismo pela redução dos pesos corporal e da glândula submandibular dos animais.

No presente experimento, a condição de hipotireoidismo foi controlada pela avaliação dos pesos corporal e glandular, e pela histologia da tireóide.

O hipotireoidismo induzido nos camundongos pelo uso do metimazol desde o período de gestação dos camundongos, provocou uma diminuição do peso corporal destes animais, em comparação com os controles. Embora essa diferença só tenha sido observada nos camundongos a partir de sete dias de idade, ela manteve-se significativa por todo o período experimental. Não foi encontrada diferença significativa do

peso corporal dos camundongos ao nascer. Em estudos semelhantes com ratos, Francavilla et al. (1990) iniciaram o tratamento com metimazol durante a vida intra-uterina e também não encontraram diferença de peso entre os grupos tratados e controles nessa fase, somente aparecendo diferença significativa nos animais de idade mais avançada.

Vários autores também notaram os efeitos da deficiência tireoidiana dos camundongos por meio de redução do peso corporal (MUNIESA et al., 1979; HOATH et al., 1983; LEVACHER et al., 1984; BACHAMANN et al., 1985; WILSON et al., 1985; FRANCAVILLA et al., 1990). Isto se deve ao fato dos animais com hipotireoidismo apresentarem uma diminuição no número de células adiposas (ROBERT & HERRERA, 1988). Por outro lado, o hipertireoidismo provoca um aumento de ganho de peso corporal (PERHEENTUPA et al., 1984).

Nas pesquisas realizadas, tem sido notada também uma relação entre o tamanho da glândula submandibular e a atividade da tireóide. Shafer e Muhler (1956), Carbone et al. (1968), Valle et al. (1985) e Wilson et al. (1985) obtiveram um decréscimo no peso da glândula submandibular em resposta ao estado de hipotireoidismo.

No entanto, Morgan et al. (1985), induziram hipotireoidismo em ratos com a administração de propiltiuracil e não evidenciaram diferença significativa no peso da submandibular. Esse resultado foi atribuído ao fato dos animais em estudo serem adultos e pertencerem a raças diferentes das usadas nos trabalhos anteriormente citados.

No presente experimento não foram encontradas

diferenças significativas entre os valores de peso da submandibular dos vários grupos, mas esse resultado pode ser atribuído ao número reduzido de amostras.

A análise histológica da tireóide dos animais tratados revelou que a dose de metimazol empregada foi efetiva na inibição da função tireoidiana, caracterizada pelo epitélio folicular hipertrofiado, e a administração de L-tiroxina (T4) por 5 dias foi suficiente para ocasionar uma reversão desta situação, isto é, a estrutura glandular tireoidiana dos animais recuperados assemelhou-se à dos camundongos do grupo controle. Esses dados conferem com os encontrados por Kronman e Leventhal (1967) quando utilizaram tiuracil para induzir hipotireoidismo em camundongos.

Na glândula submandibular dos animais tratados com metimazol, também foram observados os efeitos do hipotireoidismo. Encontramos diferenças na resposta da submandibular ao tratamento com metimazol entre os grupos de jovens e de adultos.

A resposta da glândula submandibular ao hipotireoidismo induzido pelo metimazol, foi mais evidente e marcante nos jovens do que nos animais adultos, no que se refere às alterações nos ductos granulosos. Nos jovens tratados o aparecimento desses ductos foi retardado, e quando surgiram, eram em menor número e tamanho, em relação ao normal.

Antes dos 22 dias de idade não foram observados ductos granulosos nas fêmeas nem em machos, mas a partir daí, começaram a aparecer. Foram então observadas diferenças entre os ductos granulosos da submandibular dos machos

do grupo controle e machos do grupo tratado, sendo menos desenvolvidos nos últimos. Também nas fêmeas começaram a surgir diferenças: no grupo controle observaram-se pequenas células dos ductos granulosos, enquanto nos grupos de fêmeas tratadas, não ocorreram tais estruturas nessa fase.

Aos 28 dias de idade o grupo controle apresentava estrutura glandular semelhante à dos animais adultos, enquanto nos animais tratados estava pouco desenvolvida.

Esses dados confirmam a importância dos hormônios secretados pela tireóide em fase precoce de vida, onde a falta afeta principalmente o aparecimento e desenvolvimento dos ductos granulosos, confirmando os dados da literatura.

Os adultos de ambos os sexos, recuperados com L-tiroxina administrada por 5 dias tiveram a estrutura da tireóide revertida. Na glândula submandibular foi observada uma diminuição da quantidade de ácinos, compensados por uma hipertrofia dos ductos granulosos. Esses dados conferem com os achados por Raynaud (1960), que também observou uma hipertrofia dos ductos granulosos provocada pela administração de dose alta de L-tiroxina.

Paradoxais foram os resultados encontrados para os animais adultos do grupo tratado. Enquanto em fase precoce a falta do hormônio tireoidiano provocou um retardo no aparecimento e desenvolvimento dos ductos granulosos dos animais jovens de ambos os sexos, nos adultos essa ausência hormonal não provocou regressão da estrutura glandular das fêmeas, e nos machos provocou um aumento nos ductos granulosos. Tais resultados nos levam a inferir que os

hormônios tireoidianos são mais importantes na fase jovem dos animais, já que se apresentam em níveis altos na circulação (ROBERT & HERRERA, 1988), e que nos adultos, desempenham um papel menor na manutenção da estrutura da submandibular, uma vez que as taxas hormonais são mais baixas.

No entanto, vários trabalhos mostram que os hormônios tireoidianos são importantes tanto no desenvolvimento, como na manutenção da estrutura da submandibular, e sua ausência afeta principalmente os ductos granulosos e seus produtos.

Sendo assim, nos animais adultos, algum mecanismo compensou a falta dos hormônios tireoidianos, pois não se observou regressão nos ductos granulosos das fêmeas, havendo hipertrofia dos mesmos nos machos.

Os resultados obtidos na submandibular dos camundongos adultos, com o uso do metimazol, são contrários aos obtidos quando o hipotireoidismo foi induzido por outros métodos ou drogas. A tireoidectomia (STEIDLER & READE, 1983), a radiodestruição da glândula tireóide (RAYNAUD, 1964; STEIDLER & READE, 1983) ou a administração de propiltiuracil (GRESIK, 1980) causaram atrofia na submandibular dos camundongos adultos, observada principalmente nas células dos ductos granulosos e em seus grânulos de secreção.

Neste trabalho, no grupo de jovens, a submandibular apresentou alterações com o tratamento pelo metimazol semelhantes às encontradas quando o hipotireoidismo foi induzido por outros métodos.

Porém nos adultos, não ocorreu atrofia na estrutura da submandibular, embora tenham ocorrido redução no peso corporal e alterações na histologia da tireóide dos animais tratados.

Observamos ainda que as fêmeas do grupo tratado, apresentaram a mesma estrutura do grupo controle, e nos machos do grupo tratado uma hipertrofia da glândula submandibular devida a um aumento dos ductos granuloses. A diferença entre os grupos jovens e adultos tratados pode ser atribuída ao período de exposição ao metimazol, que nos jovens foi desde a fase pré-natal até a vida adulta.

Dados obtidos no "Physicians Desk Reference" (1977) mostram que o próprio metimazol pode atuar também sobre as salivares promovendo a hipertrofia destas glândulas.

A droga, no entanto, tem-se mostrado eficiente na supressão da tireóide. O metimazol, comercialmente conhecido como tapazol, é usado no tratamento terapêutico de seres humanos. Este fármaco não interfere nas investigações da influência do hipotireoidismo no desenvolvimento de outros órgãos como os do sistema nervoso central (SILVA & LARSEN, 1982; SILVA & MATTHEWS, 1984) e dos testículos (FRANCAVILLA et al., 1990). Esses autores usaram o mesmo método do presente trabalho, sendo utilizada a mesma concentração de metimazol e o tratamento foi iniciado também no período de vida intra-uterina.

Os resultados obtidos por estes autores com os órgãos citados, são compatíveis com o estado de hipotireoidismo. Os nossos resultados obtidos com os animais jovens,

conferem com o estado de hipofunção glândular, sendo que a droga foi usada por um período de tempo curto. A administração de metimazol por um longo período, ou seja, desde a gestação até a fase adulta, mostrou-se inadequado para avaliar os efeitos do hipotireoidismo sobre a submandibular de camundongos, pois esse fármaco provoca sobre tal glândula, efeitos contrários aos esperados no estado de hipofunção tireoideana, uma vez que a própria droga atua sobre a submandibular promovendo sua hipertrofia (sialoadenopatia).

## VI. CONCLUSÕES

Os resultados da presente pesquisa nos levam às seguintes conclusões:

- O tratamento prolongado com metimazol interferiu nos efeitos do hipotireoidismo sobre a glândula submandibular, pois ele próprio determinou uma hipertrofia nos ductos granulosos da salivar mascarando o efeito da supressão tireoidiana.

- A indução do hipotireoidismo na fase fetal não determinou alterações nos padrões de respostas da submandibular, comparados com os dados obtidos de uma indução pós-natal.

- A análise do parênquima da submandibular sob a ação do hipotireoidismo demonstrou retardo no aparecimento dos ductos granulosos nos camundongos jovens.

DOCUMENTAÇÃO FOTOGRAFICA

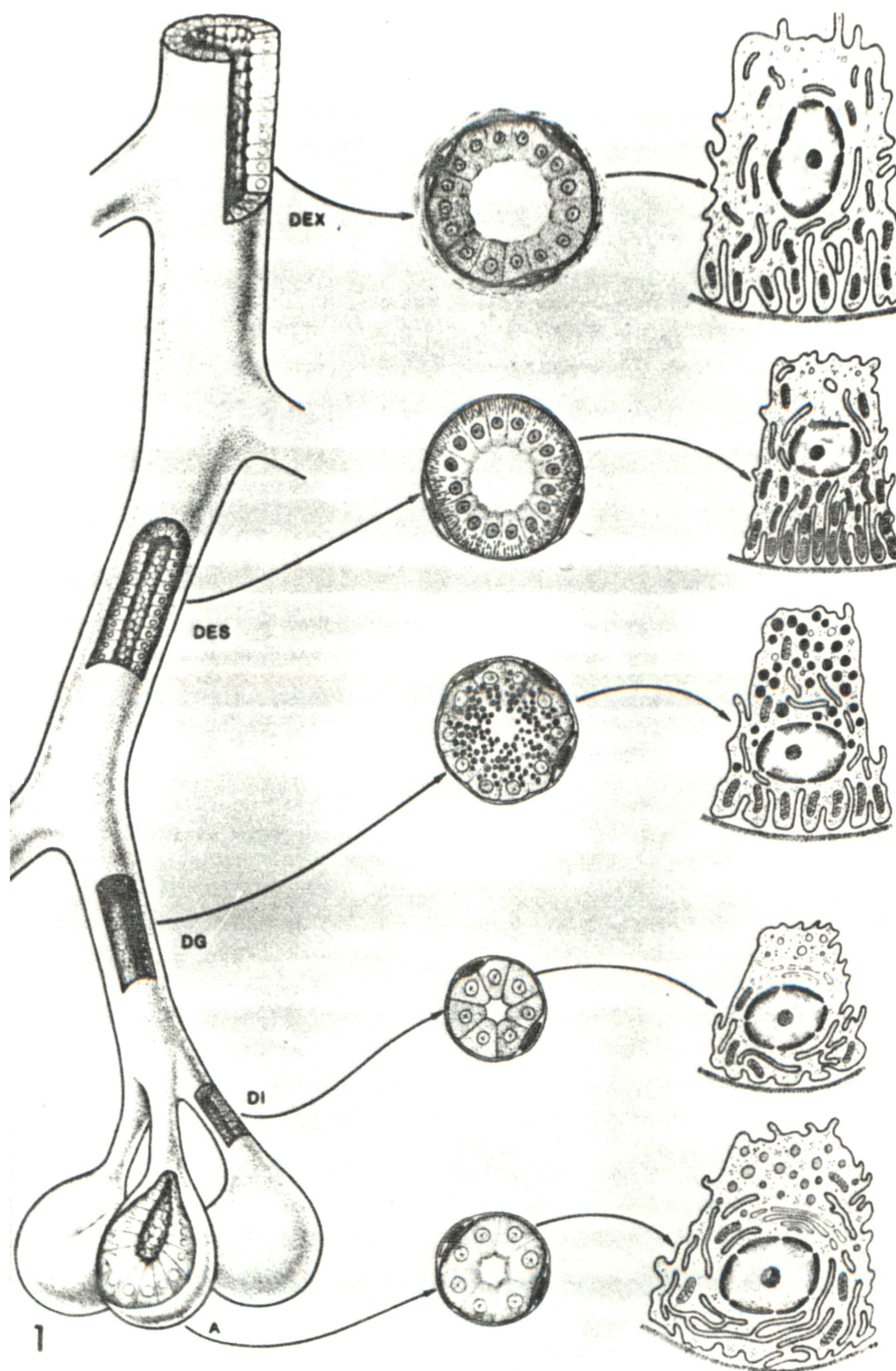


Fig. 1 Desenho esquemático do adenômero da glândula submandibular do camundongo (macho) mostrando os seus componentes. Em corte transversal a estrutura óptica e ultraestrutura das células dos respectivos compartimentos. Acino (A); Ducto intercalar (DI); Ducto Granuloso (DG); Ducto Estriado (DES); Ducto excretor (DEX) (SILVA, 1983).

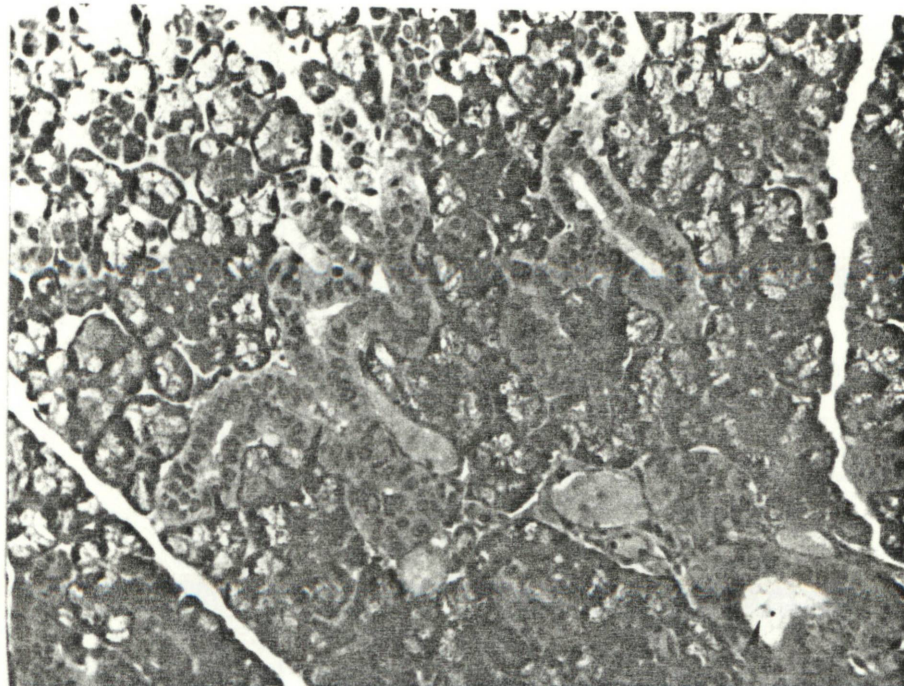


Fig. 2 Corte da glândula submandibular de camundongo macho controle com 22 dias de idade. As setas indicam pequenas células do ducto granuloso. A = ácino; DE = ducto estriado. Aum. 320 X.

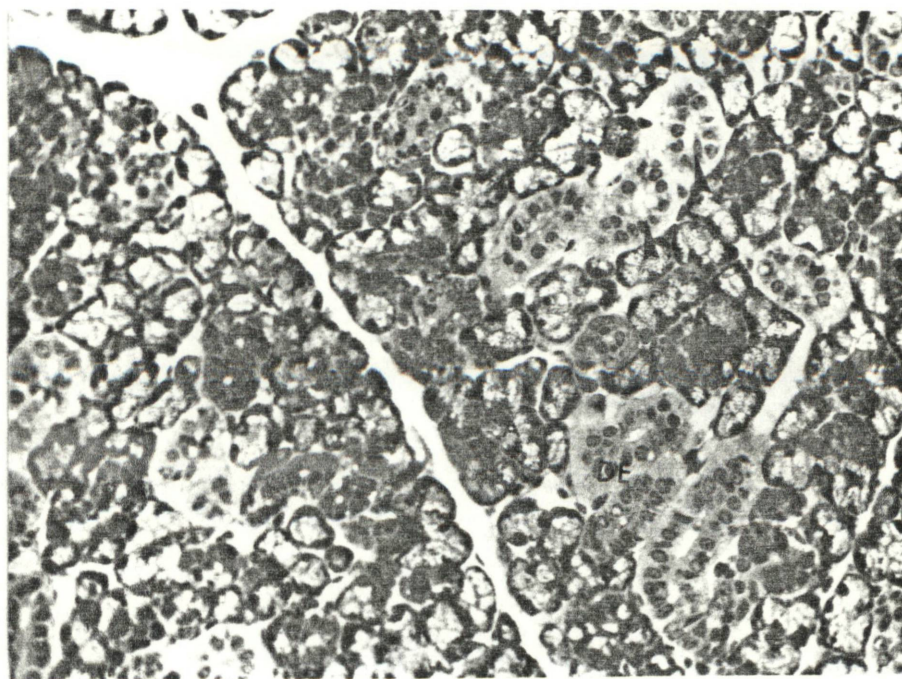


Fig. 3 Corte da glândula submandibular de camundongo macho tratado com 22 dias de idade. As setas indicam pequenas células do ducto granuloso. A = ácino; DE = ducto estriado. Aum. 320 X.

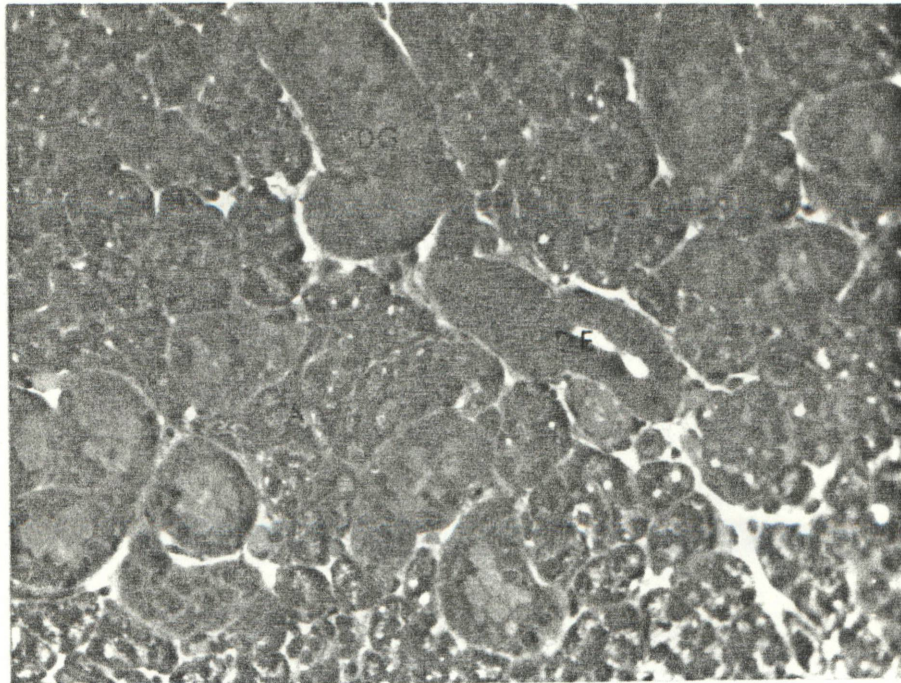


Fig. 4 Corte da glândula submandibular de camundongo macho controle com 28 dias de idade. A = ácino; DE = ducto estriado; DG = ducto granuloso. Aum. 320 X.

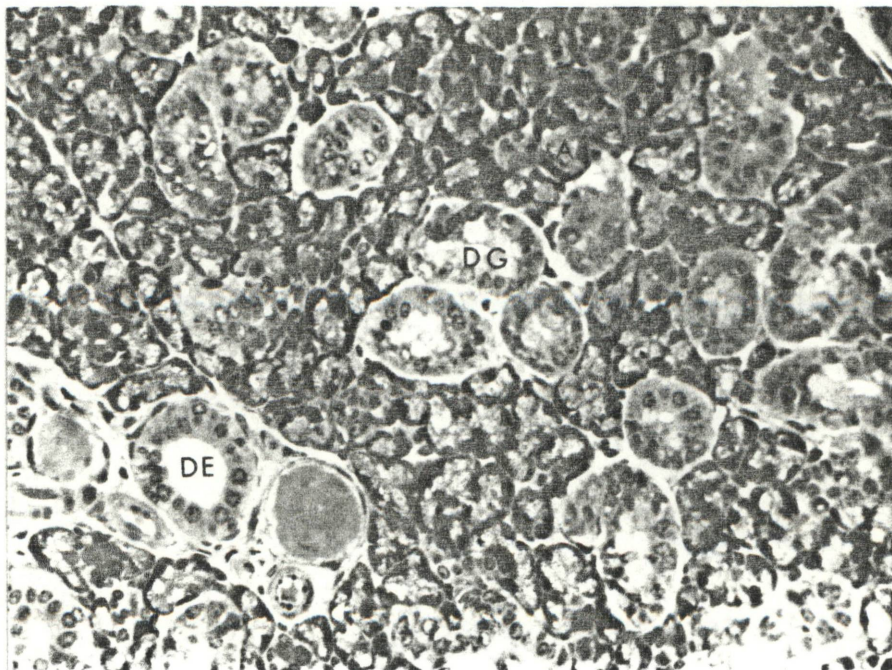


Fig. 5 Corte da glândula submandibular de camundongo macho tratado com 28 dias de idade. A = ácino; DE = ducto estriado; DG = ducto granuloso; Aum. 320 X.

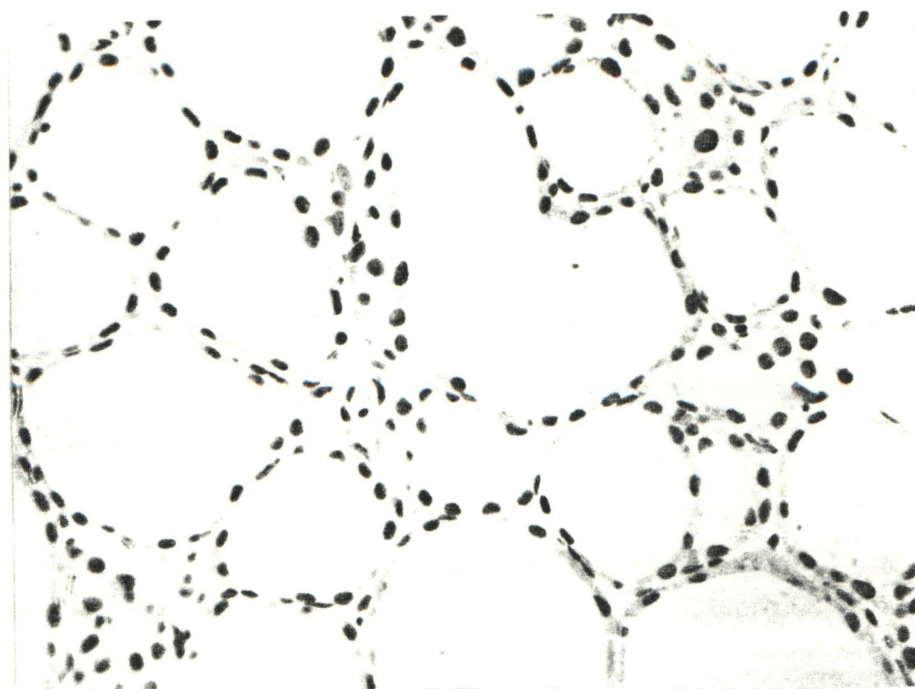


Fig. 6 Corte da glândula tireóide de camundongo controle. O epitélio folicular apresenta células cúbicas baixas. Aum. 350 X.

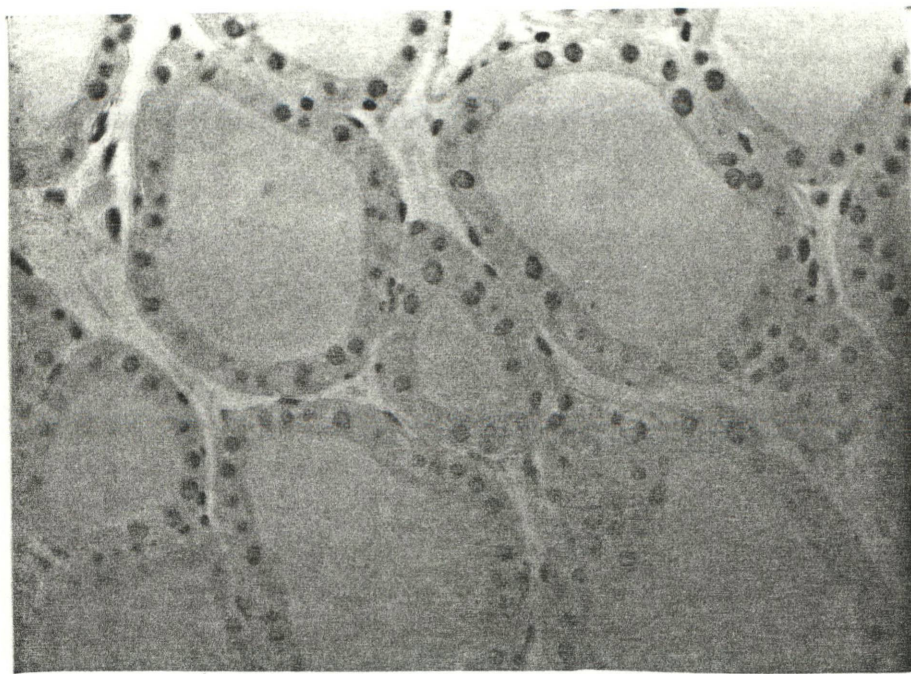


Fig. 7 Corte correspondente à glândula tireóide de camundongo tratado. O epitélio folicular apresenta células hipertrofiadas. Aum. 380 X.

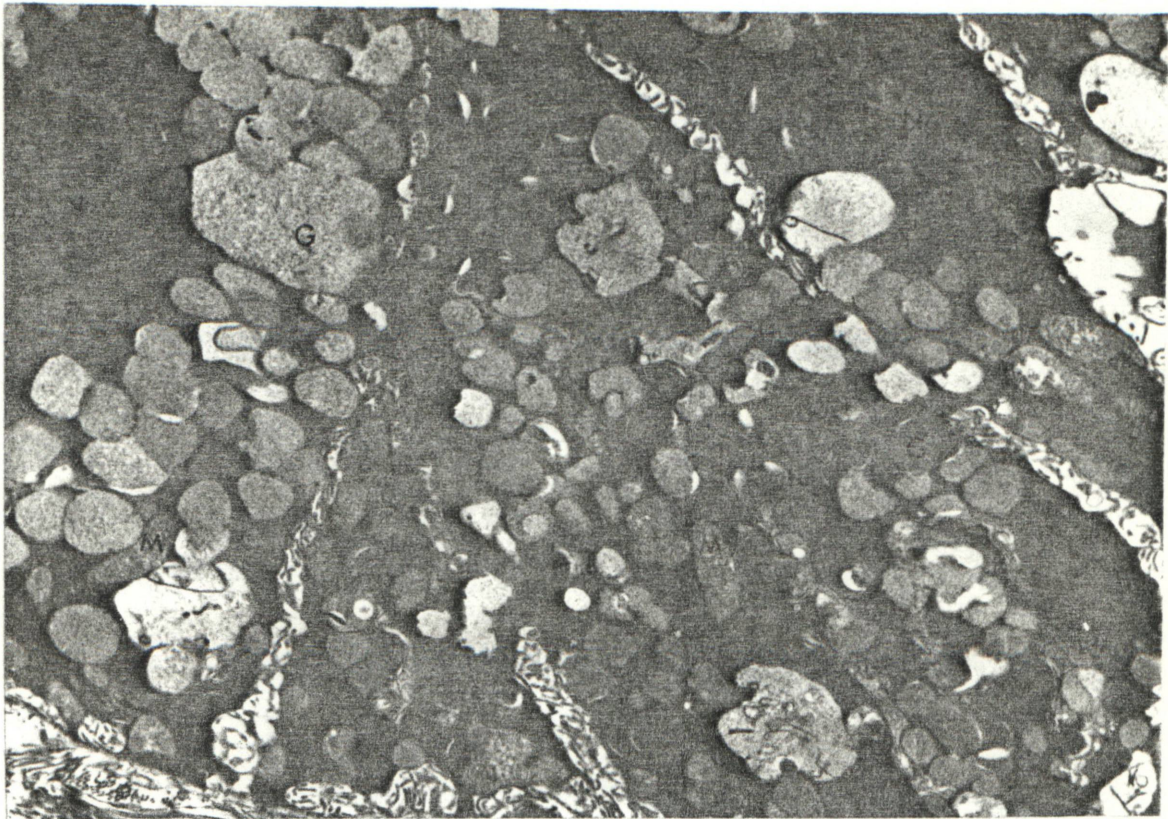


Fig. 8 Acino da glândula submandibular de camundongo macho adulto. N = núcleo; M = mitocôndria; REL = retículo endoplasmático liso; G = grânulo de secreção. Aum. 6000 X.

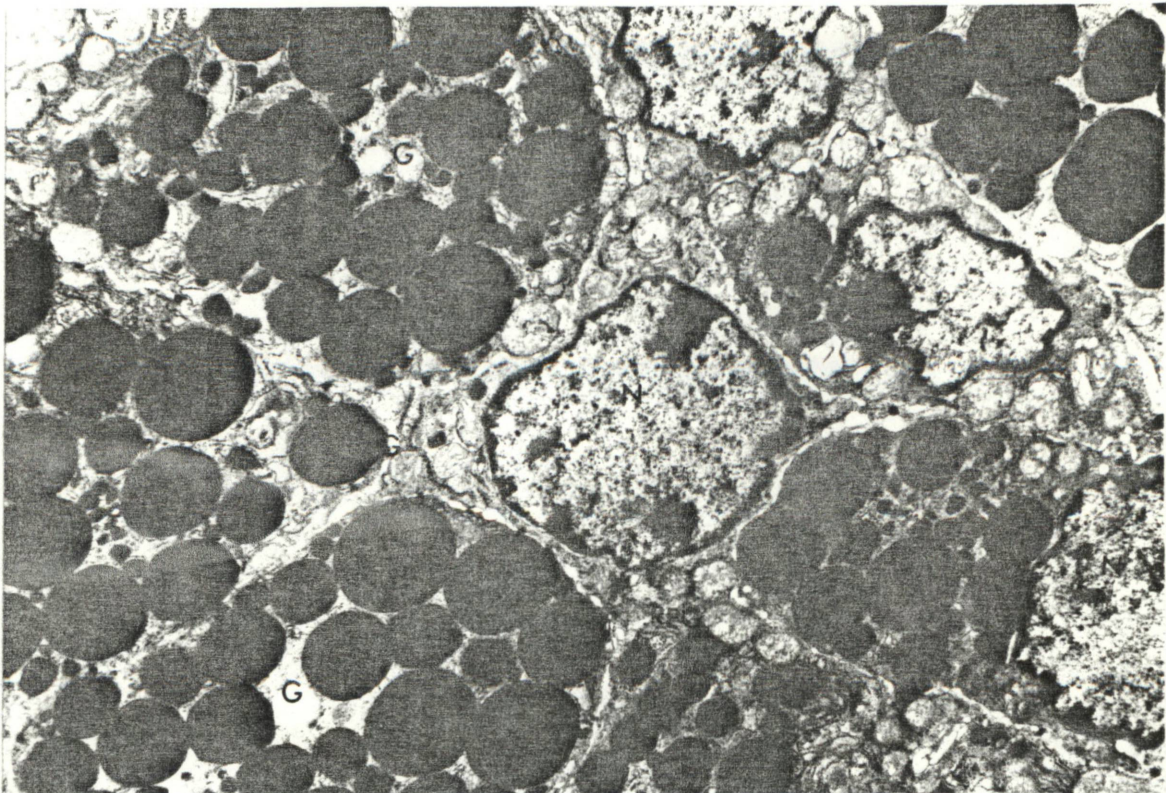


Fig. 9 Ducto granuloso da glândula submandibular de camundongo macho adulto. N = núcleo; REG = retículo endoplasmático granuloso; G = grânulo de secreção. Aum. 6000 X.

## VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALOE, L. ; LEVI-MONTALCINE, R. Comparative studies on testosterone and L-thyroxine effects on the synthesis of nerve growth factor in mouse submaxillary salivary glands. *Exp. Cell. Res.*, New York, v. 125, p. 15-20, 1980.
- ARVY, L. ; GABE, M. Action de la thyroïdectomie et des injections de thyroxine sur la glande sous-maxillaire de la souris albinos. *C. R. Acad. Sci.*, Montreuil, v.230, p. 1611-1613, 1950.
- BACHMANN, K.; ARIELI, A.; BURGER, A. G.; CHINET, A. F. Tri-iodothyronine (T3) Induced thermogenesis: altered T3 efficiency in tissues from fed, starved, and refeed hypothyroid rats. *Endocrinology*, Baltimore, v. 117, p. 1084-1089, 1985.
- BARKA, T. Biologically active polypeptides in submandibular glands. *J. Histochem. Cytochem.*, New York, v. 28, p. 836-856, 1980.
- 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. 114p. Tese (Doutorado em Ciências) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

CARBONE, D. F.; SWEENEY, E. A.; SHAW, J. H. The comparative influence of thyroid imbalance and limited bodyweight gain on submandibular gland weight, the protein components of saliva and dental caries in the rat. *Arch. Oral Biol.*, Oxford, v. 11, p. 781, 1968.

CHABOT, F.; WALKER, P.; PELLETIER, G. Thyroxine accelerates the differentiation of granular convoluted tubule cells and the appearance of epidermal growth factor in the submandibular gland of the neonatal mouse. *Tissue Res.*, New York, v. 248, p. 351-358, 1987.

CHRETIEN, M. Etude autoradiographique de synthèses de RNA induites par la testostérone dans les glandes sous-maxillaires de la Souris. *C. R. Acad. Sci.*, Montreuil, v. 266, p. 690-693, 1968.

CHRETIEN, M. Action de la testostérone sur la structure fine d'un effecteur: la glande sous-maxillaire de la Souris male. I. Morphologie des tubes sécréteurs avant et après castration. *J. Microsc. (Paris)*, v. 14, p. 35-54, 1972.

CHRETIEN, M. Action of testosterone on the differentiation and secretory activity of a target organ: the submaxillary gland of the mouse. *Int. Rev. Cytol.*, New York, v. 50, p. 333-339, 1977.

- CHRETIEN, M.; ZAJDELA, F. Mise en évidence histochimique de la sécrétion de l'amylase, dans les glandes salivaires sous-maxillaires, rétrolinguales et sous-parotidiennes de la Souris. *C. R. Acad. Sci.*, Montreuil, v. 260, p. 4263, 1965.
- COHEN, S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v. 237, p. 1555-1562, 1962.
- CYRIL E. LUCKMAN The response of the submaxillary glands of mature mice to treatment with the hormones of the thyroid gland and the testis. *Anat. Rec.*, New York, v. 139, p. 77-83. 1961.
- DESCLIN, J. JR. Recherches sur la masculinization spontanée et expérimentale des glandes sous-maxillaires chez la Souris femelle. *Arch. Biol.*, Liege, v. 71, p. 235-268, 1960.
- DOINE, A. I. *Estudo estrutural, histoquímico e bioquímico dos efeitos do anabolizante "deca-durabolin" na glândula submandibular do camundongo castrado.* São Paulo, 1976. 57p. Tese (Doutorado em Ciências) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

DOINE, A.I. & FAVA-DE-MORAES, F., LEITE, P.E.P. Efeitos de esteróides androgênico e/ou anabolizante na estrutura e histometria da glândula submandibular do camundongo castrado. *Rev. Fac. Odontol. Univ. São Paulo*, v. 16, p. 87-96. 1978.

DOINE, A. I. & FAVA-DE-MORAES, F. Histochemistry of the submandibular salivary gland of castrated male mice treated with androgens and anabolic steroids. *Arch. Oral Biol.*, v. 24, p. 569. 1979.

DUNN, J. F.; GOLDSTEIN, J. L.; WILSON, J. Development of increased cytoplasmic binding of androgen in the submandibular gland of the mouse with testicular feminization. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v. 248, p. 8719-8725, 1973.

DUNN, J. F. ; WILSON. J. D. Development study of androgen responsiveness in the submandibular gland of the mouse. *Endocrinology*, Baltimore, v. 96, p. 1571-1578, 1975.

FRANCAVILLA, S.; CORDESCHI, G.; PROPERZI, L.; DI CICCO, L.; JANNINI, E. A.; PALMERO, S.; FUGASSA, E.; LORAS, B.; D'ARMIENTO, M. Effect of thyroid hormone on the pre-natal and post-natal development of the rat testis. *J. Endocrinol.*, Bristol, v. 129, n. 1, p. 35-42, 1991.

- GRAD, B. ; LEBLOND, C. P. The necessity of testis and thyroid hormones for the maintenance of the serous tubules of the submaxillary gland in the male rat. *Endocrinology*, Baltimore, v. 45, p. 250-266, 1949.
- GRESIK, E. W. Postnatal developmental changes in submandibular glands of rats and mice. *J. Histochem. Cytochem.*, New York, v. 28, p. 860-870, 1980.
- GRESIK, E. W. ; BARKA, T. Precocious development of granular convoluted tubules in the mouse submandibular gland induced by thyroxine or by thyroxine and testosterone. *Am. J. Anat.*, New York, v. 159, p.177-185, 1980.
- 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 Tissue Res.*, Heidelberg, v. 157, p. 411-422, 1975.
- GRESIK, E. W. ; MARUYAMA, S. Inductive effects of triiodothyronine or dihydrotestosterone on EGF in the submandibular glands of young, middle - aged, and old C57 BL / 6 N Nia female mice. *Gerontol.*, Washington, v. 42, p. 491-496, 1987.
- GRESIK, E. W. ; SCHENKEIN, I. ; van der NOEN, H. ; BARKA, T. Hormonal regulation of epidermal growth factor and protease in the submandibular gland of the adult mouse. *Endocrinology*, Baltimore, v. 109, p. 924-929, 1981a.

- HAAPALAINEN, E. (1988) *Utilização de resinas plásticas em técnicas de preparação de material biológico*. São Paulo. 5 p. (apostila mimeografada)
- HOATH, S. B.; LAKSHMANAN, J.; SCOTT, S. M.; FISHER, D. A. Effect of thyroid hormones on epidermal growth factor concentration in neonatal mouse skin. *Endocrinology*, Baltimore, v. 112, p. 308, 1983.
- HOSHINO, K. ; LIN, C. D. Transplantability of salivary glands of mice and its lethal effects on the host. *Anat. Rec.*, v. 160, p. 474, 1968.
- HOSOI, K.; KOBAYASHI, S.; UEHA, T.; MARUYAMA, S.; SATO, S.; TAKUMA, T.; KUMEGAWA, M. Induction of androgen-dependent protease and serous-like granules by triiodothyronine in the submandibular gland of mice with testicular feminization. *J. Endocrinol.*, Bristol, v. 83, p. 429-434, 1979.
- HOSOI, K.; TANAKA, I.; UEHA, T. Induction of epithelial growth factor by tri-iodo-L-thyronine in the submandibular glands of mice with testicular feminization. *J. Biochem.* (Tokyo), v. 90, p. 267-270, 1981.
- HOUNG, J. A. ; VAN LENNEP *The morphology of salivary glands*. London: Academic. Press., 1978.

- HOUSSAY, A. B.; DE HARFIN, J. F.; MONTUORI, E.; EPPER, C. E.  
Effects of anabolic steroids upon submandibular glands in  
C3H/Ep mice. *Acta Physiol. Lat. Am.*, v. 16, p. 52-62.  
1966.
- HURST, V.; TURNER, C. W. The thyroid secretion rat of  
growing and mature mice. *Am. J. physiol.*, v. 150, p. 692,  
1947.
- JEAN-FAUCHER, C.; BERGER, M.; TURCKHEIM, M.; VEYSSIERE, G.;  
JEAN, C. Developmental patterns of plasma and testicular  
testosterone in mice from birth to adulthood. *Acta En-  
docrinol.*, Copenhagen Valby, v. 89, p. 780-788, 1978.
- JONES, R. O. ; ASHWOOD-SMITH, M. J. Some preliminary obser-  
vation on the biochemical and biological properties of an  
epithelial growth factor. *Exp. Cell Res.*, New York, v.  
59, p. 161-163, 1970.
- JUNQUEIRA, L. C.; FAJER, A.; RABINOVITCH, M. FRANKENTHAL, L.  
Biochemical and histochemical observations on the sexual  
dimorphism of mice submaxillary glands. *J. Cell. Comp.  
Physiol.*, Philadelphia, v. 34, p. 129-158, 1949.
- JUNQUEIRA, L. C. ; FAVA-DE-MORAES, F. Comparative aspects  
of the vertebrate major salivary glands biology. In: *Sek-  
retion und Exkretion*. Berlin: Springer, 1965. v. 2. p.  
36-48.

- KRONMAN, J.H. ; LEVENTHAL, M. M. A histochemical study of the effect of impaired thyroid function and replacement therapy on the mouse submandibular gland. *Arch. Oral Biol.*, Oxford, v. 12, p. 367-379, 1967.
- KUMEGAWA, M.; TAKUMA, T.; TACAGI, Y. Precocious induction of secretory granules by hormones in convoluted tubules of mouse submandibular glands. *Am. J. Anat.*, New York, v. 149, p. 111-114, 1977.
- LACASSAGNE, A. Dimorphisme sexual de la glande sous-maxillaire chez la Souris. *C.R. Soc. Biol.*, Paris, v. 133, p. 180-181, 1940a.
- LACASSAGNE, A. Mesure de l'action des hormones sexuelles sur la glande sous-maxillaire de la Souris. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, v. 133, p. 227-229, 1940b.
- LEBLOND, C. P.; GRAD, B. Control of the serous acini of the rat submaxillary gland by the thyroid hormone. *Anat. Rec.*, New York, v. 100, p. 750, 1948.
- LEVACHER, C.; SZTALRYD, C.; KINEBANYAN, M. F.; PICON, L. Effects of thyroid hormones on adipose tissue development in Sherman and Zucker rats. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v. 246, p. C50-C56, 1984.

- LEVI-MONTALCINI, R. Chemical stimulation of nerve factor.  
In: "The chemical basis of development." In: *McElroy W.D.; Glass B., Baltimore: J. Hopkins Press, 1958. p. 646.*
- LYON, M. ; HAWKES, E. An X-linked gene for testicular feminization in the mouse. *Nature (Lond.)*, v. 227, p. 1217-1219, 1970.
- MAYNER, D. A. ; ACKERMAN, G. A. Tissue localization of ribonuclease activity by the substrate film technique. *J. Histochem. Cytochem.*, New York, v. 11, p. 573, 1963.
- MEDINA, J. H.; WOLFMAN, C.; LEVI DE STEIN, M.; TUMILASCI, O.; HOUSSAY A. B. Thyroid hormone regulation of adrenergic receptors and beta-adrenergic responsiveness in the rat submandibular gland. *Life Sci.*, Oxford, v.35, p. 819-825, 1984.
- MORGAN, B. L.; KUYATT, B. L.; FINK, J. Effects of hypothyroidism on the DNA, carbohydrate, soluble protein and sialic acid contents of rat submandibular glands. *J. Oral Pathol.*, Copenhagen, v. 14, p. 37-41, 1985.
- MOWSZOWICS, I. M.; BIEBER, D. E.; CHUNG, K. W.; BULLOK, L. F.; BARDIN, C. W. Synandrogenic and antiandrogenic effect of progestins: comparison with nonprogestational androgens. *Endocrinology*, Baltimore, v. 95, p. 1589-1599, 1974.

MUHLER, J. C.; BIXLER D. ; SHAFER, W. G. Effect of replacement therapy on dental caries experience of radiothyroidectomized rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, New York, v. 93, p. 328, 1956.

MUNIESA, A.; LLOBERA, M.; HERRERA, E. Adipose tissue cellularity in hypo and hyperthyroid rats. *Horm. Res.*, (Basel), v. 11, p. 254-261, 1979.

PERHEENTUPA, J.; LAKSHMANAN, I.; HOATH, S. B., FISCHER, D.A. Hormonal modulation of mouse plasma concentration of epidermal growth factor. *Acta Endocrinol.*, Copenhagen, v. 107, p. 571-576, 1984.

PHYSICIAN'S desk reference. 31 ed. Oradell, Medical Economics, 1977. 2044p.

POINTON, S. E. ; BANERJEE, S. P. Beta adrenergic and muscarinic cholinergic receptor in rat submaxillary glands: Effects of thyroidectomy. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 583, p. 129, 1979.

RAYNAUD, J. Controle hormonal de la gland sous-maxillaire de la souris. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, Paris, v. 94, p. 399-523, 1960.

RAYNAUD, J. The action of thyroid and adrenal glands on the submaxillary glands of mice. In: SREEBNY L.; MEYER J.(eds) *Salivary Glands and Their Secretions*. New York: MacMillan, 1964. p. 47-62.

- ROBERT, M. Q. ; HERRERA, H. Effect of postweaning thyroid status on endocrine and adipose development in rats. *A. Physiol.*, Barcelona, p. 280-286. 1988.
- SCHAEFFER, A. Micro-stereology. The mathematical basis of stereology. New development and techniques. Wild Heerbrugg Ltd. Optical Precision Instrument makers. *Microscopy division*, v. 7, p. 3-17, 1970.
- SHAFER, W. G. ; MUHLER, J. C. The effect of desiccated thyroid, propylthiuracil, testosterone, and fluorine on the submaxillary glands of the rat. *J. Dent. Res.*, Washington, v. 35, p. 922, 1956.
- SHAFER, W. G. ; MUHLER, J. C. Endocrine influences upon the salivary glands. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, v. 85, p. 215-225, 1960.
- SILVA, I. *Citoquímica da delta 5 - 3 beta e 17 beta hidroxisteróide desidrogenase na glândula submandibular do camundongo*. São Paulo, 1983. 96p. Tese (doutorado em Ciências) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- SILVA, J. E. ; LARSEN, P. R. Comparison of iodothyronine 5'-deiodinase and other thyroid-hormone-dependent enzyme activities in the cerebral cortex and hypothyroid neonatal rat. Evidence for adaptation to hypothyroidism. *J. Clin. Invest.*, New York, v. 70, p. 1110-1123, 1982.

- SILVA, J. E. ; MATTHEWS, P. S. Production rates and turnover of triiodothyronine in rat developing cerebral cortex and cerebellum. *J. Clin. Invest.*, New York, v. 74, p. 1035-1049, 1984.
- SREEBNY, L. M.; MEYER, J.; BACHEM, E.; WEINMANN, J. P. Postnatal changes in proteolytic activity and in the morphology of the submaxillary gland in male and female albino rats. *Growth*, Lakeland, v. 19, p. 57-73, 1955.
- STEIDLER, N. E.; READE, P. C. An immunohistochemical and histological study of the influence of the thyroid gland on epidermal growth factor-containing cells in the submandibular salivary glands of mice. *J. Anat.*, London, v. 136, p. 225, 1983.
- TAKUMA, T.; NAKAMURA, T.; HOSOI, K.; KUMEGAWA, M. Binding protein for 5 alpha-dihydrotestosterone in mouse submandibular gland. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 496, p. 177-181, 1977.
- TAKUMA, T.; TANEMURA, T.; HOSODA, S.; KUMEGAWA, M. Effects of thyroxine and 5-alpha-dihydrotestosterone on the activities of various enzymes in the mouse submandibular gland. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 541, p. 143-149, 1978.

- TRONIK, D.; FRANÇOIS, R. Thyroxine and testosterone transcriptionally regulate renin gene expression in the submaxillary gland of normal and transgenic mice carrying extra copies of the *Ren2* gene. *Fed. Europ. Bioch.*, Elsevier Science, B. V. (Biomedical Division), v. 234, p. 336-340, 1988.
- VALLE, L. B. S.; OLIVEIRA-FILHO, R. M. ROMALDINI, J. H.; LARA, P.F. Pituitary-testicular axis abnormalities in immature male hypothyroid rats. *J. Steroid Biochem.*, Oxford, v. 23, p. 253-257, 1985.
- VERHOEVEN, G. ; WILSON, J. D. Cytosol androgen binding in submandibular gland and kidney of the normal mouse and the mouse with testicular feminization. *Endocrinology*, Baltimore, v. 99, p. 79-92, 1976.
- WALKER, P.; WEICHSEL, M.; HOATH, S.; POLAND, R. ; FISCHER, D. Effect of thyroxine, testosterone, and corticosterone on nerve growth factor (NGF) and epidermal growth factor (EGF) concentrations in adult female mouse submaxillary gland: Dissociation of NGF and EGF responses. *Endocrinology*, Baltimore, v. 109, p. 582-587, 1981.
- WATSON, A. Y.; RADIE, K.; MCCARTHY, M.; LARSEN, P. R. MURPHY, R. A. Thyroxine reverses deficits of nerve growth factor, epidermal growth factor in submandibular glands of mice with muscular dystrophy. *Endocrinology*, Baltimore, v. 110, p. 1392-1401, 1982.

WERLE, E; VOGEL, R.; GOLDEL, L. F. Ueber ein blutdrucksteigerndes Prinzip in Extrakten aus der glandula submaxillaris der Weissen Maus. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, Heidelberg, v. 230, p. 236, 1957.

WILSON, C. M., GRIFFIN, J. E., REYNOLDS, R. C. ; WILSON, J. D. The interaction of androgen and thyroid hormones in the submandibular gland of the genetically hypothyroid (*hyt/hyt*) mouse. *Endocrinology*, Baltimore, v. 116, p. 2568-2577, 1985.

WILSON, C. M., MYHRE, M. J.; REYNOLDS, R. C.; WILSON, J. D. Regulation of mouse submaxillary gland renin by thyroxine. *Endocrinology*, Baltimore, v. 110, p. 982-989, 1982.