

## Alterações histológicas de glândulas submandibulares e testículos induzidas por dietas à base de soja e dieta zinco deficiente em ratos

Vanderlei L.C.M.<sup>1</sup>, Arruda Veiga M.C.F.<sup>2</sup>, Reis N.S.<sup>3</sup> y Tambeli C.H.<sup>2</sup>

**RESUMO.** Este trabalho teve por objetivo verificar, em ratos, as alterações histológicas das glândulas submandibulares e testículos induzidas por dietas à base de soja e dieta deficiente em zinco. A indução da deficiência de zinco produziu alterações testiculares incluindo atrofia de túbulos seminíferos, degeneração do epitélio germinativo e alterações na espermatogênese, e a nível de glândulas submandibulares uma significativa atrofia, com ácinos pouco delimitados. A dieta à base de soja sem complementação também comprometeu o processo de espermatogênese, com túbulos seminíferos atrofiados e redução do epitélio germinativo. A dieta à base de soja complementada, com mistura salina e vitamínica, não produziu alterações testiculares, mas a nível de glândulas submandibulares, induziu uma hipertrofia do componente ductal, principalmente com relação ao seu componente granular.

**SUMMARY.** Histologic alterations of the submandibular glands and testicles induced by soy and zinc deficient diets. The purpose of this study was to examine in rats the histologic alterations of the submandibular glands and testicles induced by soy diets and zinc deficient diet. The zinc deficiency produced testicles alterations including seminiferous tubulus atrophy, germinative epithelium degeneration, spermatogenesis alterations and a significant atrophy of the submandibular glands which presented no much delimited acines. The soy diet without complementations also compromised the spermatogenesis by showing seminiferous tubulus atrophied and a reduction of the germinative epithelium. The soy diet complemented by saline and vitaminic mixtures didn't produced testicles alterations but its induced in the submandibular glands a hypertrophy of the ductal component mainly in relation to the granular component.

Key words: Soy bean, Zinc deficiency, Submandibular glands, testicles.

### INTRODUÇÃO

A soja é uma leguminosa de alto valor nutritivo (1) que têm sido largamente utilizada na alimentação humana sob várias formas (2) contudo, a presença de fatores antinutricionais pode comprometer a sua utilização como fonte alimentar.

Um dos principais fatores antinutricionais presentes na soja é o ácido fítico, que associado com proteínas vegetais é um dos responsáveis pela baixa biodisponibilidade de zinco nas leguminosas (3). Portanto é possível que a presença da soja na alimentação humana, possa tornar o consumo de zinco submarginal produzindo como consequência a deficiência desse mineral. O zinco é um oligoelemento fundamental em várias funções biológicas do organismo (4) e a sua deficiência produz uma série de alterações, tanto nos animais quanto nos

seres humanos (5). Os testículos são estruturas bastante sensíveis à deficiência de zinco e o hipogonadismo têm sido associado à deficiência desse mineral (6). Dentre as alterações produzidas pela deficiência de zinco no sistema reprodutor podemos destacar a atrofia de túbulos seminíferos, diminuição do número de células do epitélio germinativo, redução acentuada do número de espermatozoides, alterações na espermatogênese e diminuição dos níveis séricos de prolactina e testosterona (7,8,9).

A deficiência de zinco também tem sido relacionada à redução da secreção salivar e aumento da susceptibilidade à cárie dental (10), redução da fosfatase alcalina e danos nas células mioepiteliais das glândulas submandibulares (11) e, atrofia das glândulas submandibulares com diminuição do volume citoplasmático dos grânulos secretores (12). Este trabalho teve por objetivo verificar, em ratos, as possíveis alterações histológicas a nível testicular e das glândulas submandibulares induzidas por dietas à base de soja e dieta deficiente em zinco.

1 Departamento de Fisioterapia, FCT/UNESP. Brasil.

2 Departamento de Ciências Fisiológicas, FOP/UNICAMP. Brasil

3 Departamento de Histologia, IBC/UNICAMP. Brasil.

## MATERIAL E METODOS

Formas utilizados para o presente trabalho 24 ratos machos, recém desmamados, pesando em média 55 gramas que foram distribuídos em gaiolas individuais de aço inox, separados em quatro grupos e submetidos às dietas A (controle padrão), B (deficiente em zinco), C (soja sem complementação) e D (soja complementada).

A dieta controle padrão (A) foi composta de 15 % de proteína (albumina), 5 % de óleo de milho, 5 % de fibra, 3,5 % de mistura salina isenta de zinco (13), 1 % de mistura vitamínica (14), 0,3 % de D.L. metionina, 0,15 % de cloreto de colina, 0,002 % de biotina, 0,6 % de mistura de zinco (15) e maizena para completar 100 %. A suplementação de biotina nesta dieta foi necessária devido à presença na albumina de avidina, uma glicoproteína que liga-se à biotina impedindo sua absorção (16). A dieta deficiente em zinco (B) foi composta de 15 % de proteína obtida através da caseína lavada com EDTA e o restante de sua composição foi semelhante à dieta A, como exceção da biotina e da mistura de zinco.

A soja utilizada para elaboração das dietas C e D foi da variedade IAC-8. A dieta (C) foi composta de farinha de soja integral (coação por 5 minutos e moída após secagem em estufa), com teor proteico de 42 %. A dieta de soja complementada (D) continha, além da farinha de soja integral 3,5 % de mistura salina isenta de zinco, 1,0 % de mistura vitamínica, 0,3 % de D.L. metionina e 0,15 % de cloreto de colina, com teor proteico de 40 %.

Os animais foram mantidos com suas respectivas dietas por um período de 69 dias, durante os quais foi realizado o controle de crescimento dos mesmos. Após esse período os animais foram sacrificados por hipovolemia e tiveram seus fêmures retirados, limpos e colocados em estufa por aproximadamente 12 horas a 105 °C. Posteriormente os mesmos foram moídos com o auxílio de um graal e levados à estufa para nova secagem por 4 horas, sendo então utilizados na preparação da solução de cinzas para a determinação de zinco que foi feita através de um espectrômetro de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente.

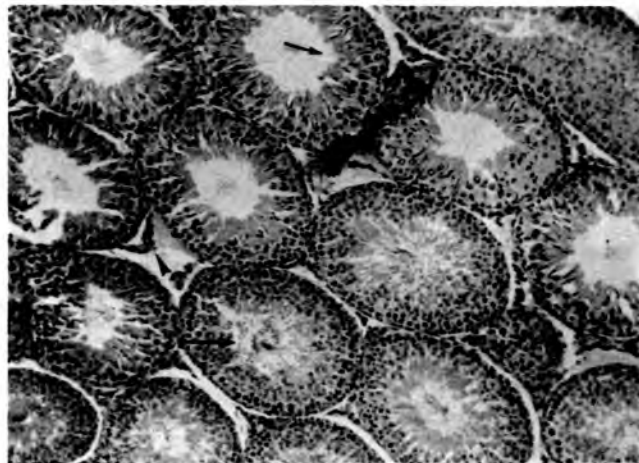
Foram também retirados o testículo esquerdo e as glândulas submandibulares, que foram fixadas em Bouin por um período de 24 horas e a seguir incluídas segundo técnica histológica de rotina, cortadas na espessura de 7 µ e coradas com HE e tricrômio de Mallory para o estudo histológico.

## RESULTADOS

A análise histológica dos testículos dos animais submetidos à dieta à base de soja complementada (D) apresentaram aspectos de normalidade, semelhante ao grupo padrão (A) com túbulos seminíferos de tamanho normal e epitélio germinativo desenvolvido evidenciando-se os estádios 1, 7 e 14, característicos da espermatogênese da espécie (Figura 1)

## FIGURA 1

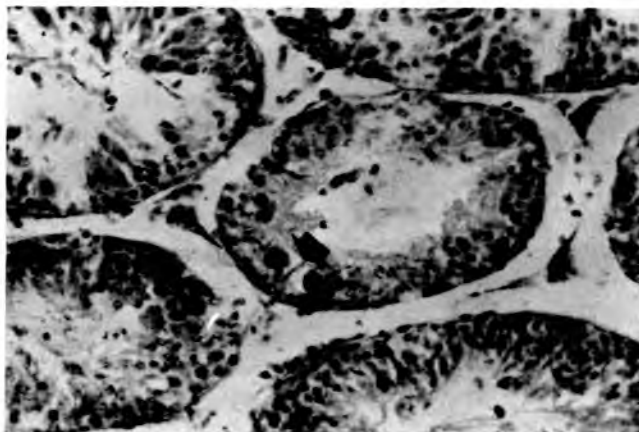
Corte transversal de túbulos seminíferos - Grupo D (soja complementada): Tecido intersticial (seta sem haste), estádios: 1 (seta pequena), 7 (seta média) e 14 (seta grande). HE aumento 160,5x



Os animais alimentados com a dieta deficiente em zinco (B) apresentaram atrofia de túbulos seminíferos, degeneração do epitélio germinativo e presença de espermatídes multinucleadas com núcleos picnóticos. A espermatogênese nesses túbulos atrofícos vai até Cito I sendo raras as imagens características do estádio 7 (Figura 2).

## FIGURA 2

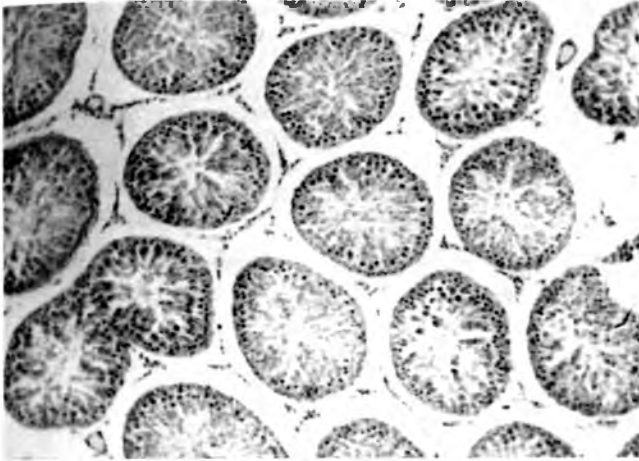
Corte transversal de túbulos seminíferos - Grupo B (Dieta deficiente em zinco): atrofia moderada e espermatídes multinucleadas com núcleo picnóticos (seta). HE aumento 160,5x



Os animais submetidos à farinha de soja sem complementação (C) apresentaram túbulos seminíferos atrofiados quanto ao seu tamanho e espessura do epitélio germinativo sendo que, nesses animais não evidenciaram-se os estádios característicos da espermatogênese própria da espécie, notando-se a ausência principalmente do estádio 7. Os animais apresentaram alguns túbulos seminíferos com hiperacromatose (Figura 3).

FIGURA 3

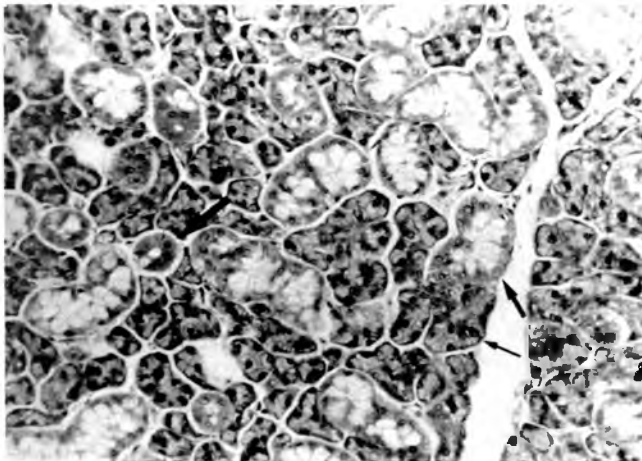
Corte transversal de túbulos seminíferos - Grupo C (soja sem complementação): epitélio germinativo atrofico, células com hiper cromatose. HE aumento 160,5x



A análise histológica das glândulas submandibulares dos animais submetidos à dieta padrão apresentou aspectos de normalidade. Observam-se ácinos serosos, ácinos mistos com crescente seroso e ductos intralobulares (Figura 4). Os animais submetidos à dieta deficiente em zinco mostraram atrofia das glândulas submandibulares sem distinção entre os elementos seroso e mucoso com ácinos pouco delimitados (Figura 5).

FIGURA 4

Fotomicrografia de glândula submandibular - Grupo A (dieta padrão): ácinos serosos (seta pequena), ácinos mistos com crescente seroso (seta média e ductos intralobulares (seta grande). HE aumento 321x



Os animais alimentados com soja sem complementação apresentaram glândula submandibulares com atrofia incipiente de ácinos e ductos com alguns núcleos picnóticos (Figura 6). Entretanto, nos animais submetidos à farinha de soja complementada observou-se uma hipertrofia do componente ductal, principalmente com relação ao seu componente granular (Figura 7).

FIGURA 5

Fotomicrografia de glândula submandibular - Grupo B (dieta deficiente em zinco): ácinos pouco delimitados, atrofia aparente em especial do componente ductal. HF aumento 321x

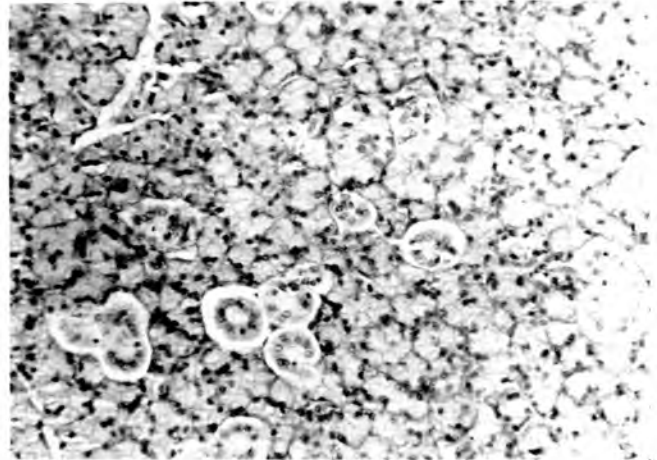
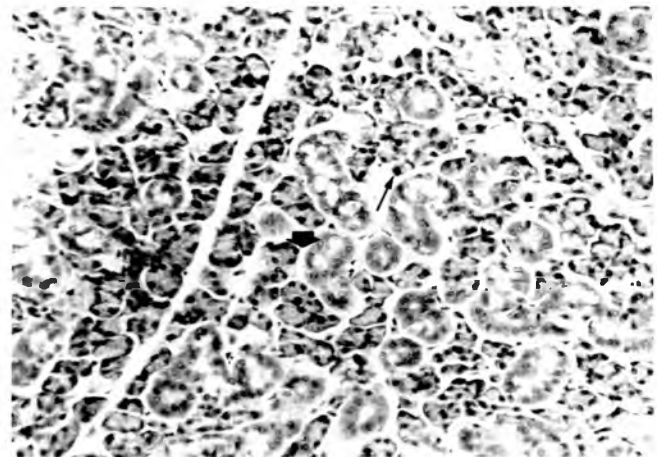


FIGURA 6

Fotomicrografia de glândula submandibular - Grupo C (soja sem complementação): núcleo celulares picnóticos (seta pequena), ácinos e ductos com atrofia incipiente (seta maior). HE aumento 321x

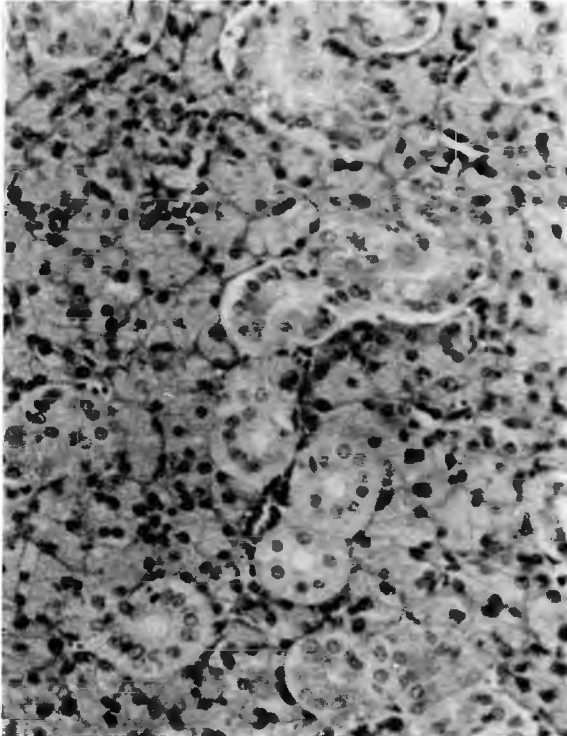


Em relação à concentração de zinco no lêmur podemos observar uma redução significativa nos animais submetidos às dietas B e D quando comparados com o grupo controle, como pode ser visualizado no Gráfico 1.

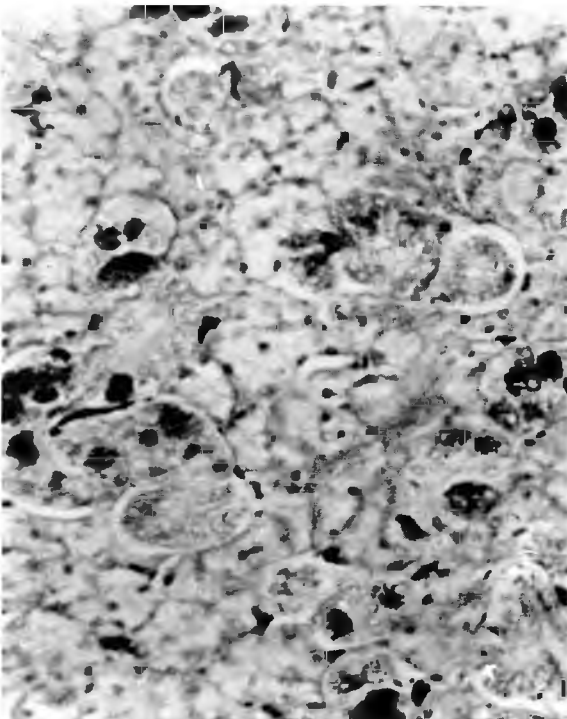
Os animais submetidos às dietas B e C tiveram uma redução significativa do ganho de peso em relação aos outros grupos (Gráfico 2).

FIGURA 7

Fotomicrografia de glândula submandibular (composição) - Grupo D (soja complementada): hipertrofia de ductos granulosos. Aumento 321x



HE



TRICRÔMIO

GRAFICO 1

Média do nível de zinco no fêmur dos animais submetidos às dietas A, B, C e D.

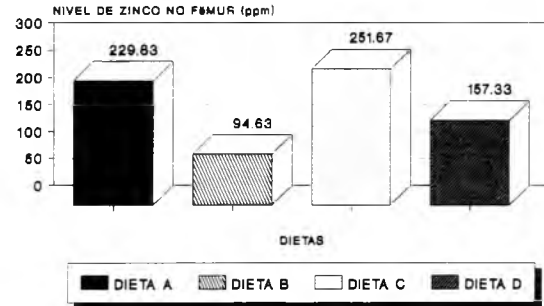
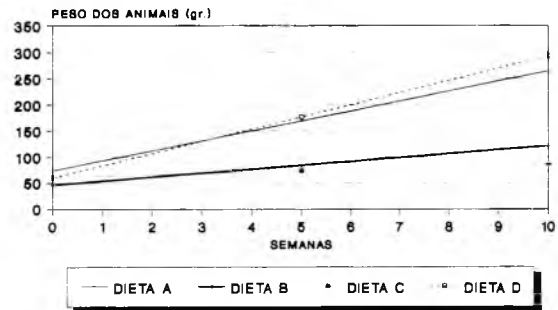


GRAFICO 2

Evolução dos pesos semanais dos animais submetidos às dietas A, B, C e D.



DISCUSSAO

Os animais alimentados com soja complementada com mistura salina e vitamínica, embora tenham apresentado uma redução de zinco a nível ósseo, esta não foi suficiente para comprometer o crescimento e o desenvolvimento testicular, uma vez que os mesmos foram semelhantes aos observado em animais submetidos à dieta padrão.

O requerimento de zinco necessário para o desenvolvimento normal de ratos alimentados com isolado protéico de soja é de 18 ppm (17), bem inferior ao valor encontrado para essa dieta que foi de 62 ppm.

Os animais submetidos à dieta deficiente em zinco apresentaram uma redução do crescimento, do nível de zinco no osso e alterações testiculares semelhantes às relatadas por outros autores (7, 8, 18). O hipogonadismo associado á deficiência de zinco está provavelmente relacionado a um comprometimento das células de Leydig (6).

Por outro lado, as alterações glândulares observadas nos animais alimentados com o a dieta à base de soja sem complementação, demonstram um comprometimento da

espermato gênese e uma atrofia incipiente de ácinos nas glândulas submandibulares que podem ser atribuídas as deficiências vitamínicas da soja (19) e ao quadro de anorexia desenvolvido por esses animais uma vez que os mesmos não apresentaram redução dos níveis de zinco no fêmur, provavelmente devido a drástica redução do crescimento.

A atrofia das glândulas submandibulares apresentada pelos animais deficientes em zinco pode estar relacionada, em parte, ao hipogonadismo uma vez que estas glândulas são andrógeno-dependentes (20) e foi encontrado uma desestabilização na interação do complexo andrógeno-receptor em células nucleares de glândulas submandibulares em animais deficientes em zinco (21). Porém, não podemos descartar a existência de outros mecanismos incluindo um efeito direto do zinco no desenvolvimento dessas glândulas uma vez que, a administração de testosterona em animais deficientes em zinco foi menos eficiente em produzir reversão das alterações observadas nessas glândulas do que uma dieta suplementada com zinco (12) e, têm sido demonstrado que o zinco têm um papel importante no desenvolvimento dos grânulos secretores das glândulas submandibulares (22).

As alterações observadas nas glândulas submandibulares dos animais alimentados com a farinha de soja complementada sugerem uma hiperfunção dessas glândulas. Esse aumento da atividade glandular pode estar relacionado ao elevado nível protéico apresentado por essa dieta (42%), uma vez que, entre os fatores ativos que as células dos ductos granulosos possuem estão incluídos proteases (23).

Portanto, a alimentação à base de soja sem complementação, causa uma drástica redução do crescimento e um comprometimento no desenvolvimento do testículo e das glândulas submandibulares de ratos. Por outro lado os animais alimentados com soja complementada com mistura salina e vitamínica apesar de apresentar uma leve redução do nível de zinco no osso apresentaram crescimento e desenvolvimento normal e uma hipertrofia de glândulas submandibulares.

#### REFERENCIAS

1. Carrão-Panizzi M.C. Soja proteína para milhões. *Ciências Hoje*, 6(33): 25-31. 1987.
2. Anonymus. Temos a soja, mais poucos sabem o que fazer com ela. *Aliment. & Nutr.* 2(4):14-9, Abr/Jun. 1981.
3. O'Dettl B.L., Burpo C.E., Savage J.E. Evaluation of zinc availability in foodstuffs of plant and animal origin. *J Nutr* 102:653-60. 1972.
4. Wada L.L., King J.C. Clinical, tissue and biochemical signs of zinc deficiency. *Comprehensive Therapy* 9(4):45-50. 1983.
5. Halsted J.A., Smith Jr. J.C., Irwin M.E. A conspectus of research on zinc requirements of man. *The Journal of Nutrition*, 104 (3):345-78. 1974.
6. Mansour M.M.S., Hafiez A.A., El-Kirdassy Z.h.M., El-Malkh M.N., Halawa F.A., El-Zayat E.M.I. Role of zinc in regulating the testicular function. Part 2. Effect of dietary zinc deficiency on gonadotropins, prolactin and testosterone levels as well as 3-hydroxysteroid dehydrogenase activity in testes of male albino rats. *Die Nahrung* 33(10):941-47. 1989.
7. Hafiez A.A., El-Kirdassy H.M., El-Malkh N.M., El-Zayat E.M.I. Role of zinc in regulating the testicular function. Part 3. Histopathological changes induced by dietary zinc deficiency in testes of male albino rats. *Die Nahrung*, 34(1):65-73. 1990.
8. Hambidge K.M., Casey C.E., Krebs N.F. Trace elements in human and animal nutrition. New York: Academic Press p.499. 1987.
9. Hafiez A.A., El-Kirdassy Z.H.M., Mansour M.M.S., Sharada H.M., El-Zayat E.M.I. Role of zinc in regulating the testicular function. Part I. Effect of dietary zinc deficiency on serum levels of gonadotropins, prolactin and testosterone in male albino rats. *Die Nahrung*, 33(10):935-40. 1989.
10. Fang M.M., Lei K. Y., Kilgore L.T. Effects of zinc deficiency on dental caries in rat. *J Nutrition*, 110:1032-36. 1980.
11. Chaudhry I.M., Meyer J. Response of submandibular gland of the rat to nutritional zinc deficiency. *J. Nutr.* 109:316-20. 1979.
12. Kondo I., Ozono S., Sato K., Ito Y. Histology of the submandibular gland in experimentally induced zinc-deficient mice. *Bull. of Kanagawa Dent. Col* 17(2):159-63. 1989.
13. Report of the American Institute of Nutrition. Ad Hoc. Committee on Standards for Nutritional Studies. *J Nutr* 17:1340-48. 1977.
14. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 11 ed., Washington: AOAC. 1970.
15. Stuart S.M.A. et al. Absorption of zinc and iron by rats fed meals containing sorghum food products. *J of Cereal Science* 6:81-90. 1987.
16. Gilman A.G. et al. As Bases Farmacológicas da Terapêutica 8. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.1025. 1991.
17. Forbes R.M., Yoke M. Zinc requirement and balance studies with the rat. *J. Nutr.* 70:53-57. 1960.
18. Mason K.E., Burns W.A., Smith Jr. J.C. Testicular damage associated with zinc deficiency in pre and postpuberal rats: response to zinc repletion. *J Nutr* 112:1019-028. 1982.
19. Rackis J.J. Biological and physiological factors in soybeans. *J Am Oil Chem Soc.* 51:161A-174a. 1974.
20. Minetti C.A.S.A. et al. Differential actions of testosterone and its metabolites on mice submandibular gland. *Jour. Biol. Buccale*, 13:205-13. 1985.
21. Minetti C.A.S.A. et al. Androgenic expression in the submandibular gland of zinc-deficient mice. *Ann. Nutr. Metab.* 36(3):167-74. 1992.
22. Frederickson C.J., Pérez-Clausell J., Danscher G. Zinc-containing 7s-NGF complex. Evidence from zinc histochemistry for localization in salivary secretory granules. *J. Histochem. Cytochem.* 35:579-83. 1987.
23. Gresik E.W., Schenkein I., Barka T. Immunocytochemical localization of proteases in mature and developing mouse submandibular glands. *Anat. Rec.* 193:554. 1979.

Recibido: 10-10-1994

Aceptado: 29-04-1995