

*Cste exemplar
foi devidamente corrigido
conforme resolução do
CEPE. 1036/83
Piracicaba 27/06/1994*

ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA

**ANÁLISE HISTOQUÍMICA E ULTRAESTRUTURAL DA MATRIZ
EXTRACELULAR DE GLÂNDULAS SUBMANDIBULARES
ATRÓFICAS DE CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Odontologia (Área de Biologia e Patologia Buco-Dental) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Mestre em Ciência.

PIRACICABA-SP

Z13a

17983/BC

-1994-

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA

**ANÁLISE HISTOQUÍMICA E ULTRAESTRUTURAL DA MATRIZ
EXTRACELULAR DE GLÂNDULAS SUBMANDIBULARES
ATRÓFICAS DE CAMUNDONGOS**

Orientador: Prof.Dr.SÉRGIO ROBERTO P. LINE

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Odontologia (Área de Biologia e Patologia Buco-Dental) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Mestre em Ciência.

PIRACICABA-SP

-1994-

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho...

...aos meus pais, LOURENÇO e MARIA
HELENA, pela paciência, orientação e
apoio constantes.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Aos Profs. Drs. LOURENÇO BOZZO e MÁRIO ROBERTO VIZIOLI, pelo exemplo de dedicação à vida acadêmica.

Aos Profs. e Amigos JACKS JORGE JÚNIOR, EDGARD GRANER e MÁRCIO AJUDARTE LOPES, pelo companherismo, estímulo e apoio constantes.

Aos Profs. do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

Aos colegas da Disciplina de Patologia MARIA HELENA DE VASCONCELOS PERON, ROSA MARIA FORNASIER e ADRIANO LUIS MARTINS, pela rica convivência, e em especial a ANA CRISTINA DO AMARAL GODOY, pela ajuda na documentação fotográfica desse trabalho.

A sra. SÍLVIA MARIA PAES DE ALMEIDA, pelo apoio inestimável nas preparações em microscopia eletrônica.

Aos colegas de turma do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental: MIRALVA, BETE, FABIANA, AUGUSTA, CLAUDIA, SILVANA, ROSANA, DIOTTO E CHICO.

Aos CDs ANA PAULA GRANATO E MÁRCIO DE MORAES, pela amizade e ajuda no atendimento de nossos pacientes.

Ao Prof. Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA,
pela competência e segurança com que
sempre nos orientou.

Ao Prof. Dr. SÉRGIO ROBERTO PERES
LINE, pelo exemplo de dedicação,
confiança e amizade com que orientou
este trabalho.

I N D I C E

-OBJETIVO.....	01
-INTRODUÇÃO.....	02
-MATERIAL E MÉTODO.....	14
-RESULTADOS.....	17
-DISCUSSÃO.....	37
-CONCLUSÃO.....	43
-RESUMO.....	44
-SUMMARY.....	45
-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

OBJETIVO

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é estudar os aspectos morfológicos de glândulas submandibulares normais e atróficas de camundongos em microscopia eletrônica de transmissão e analisar, através de técnicas histoquímicas, a expressão das fibras colágenas e das fibras elásticas presentes na matriz extracelular durante diversos períodos de atrofia glândular.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. GLÂNDULA SALIVAR

Glândulas salivares são estruturas secretoras responsáveis pela produção de saliva. Anatomicamente as glândulas salivares dividem-se em maiores e menores. Pode-se distinguir três pares simétricos de glândulas salivares maiores: as parótidas, as submandibulares e as sublinguais, todas possuindo extensos sistemas ductais necessários para condução da saliva das unidades secretoras até a cavidade bucal. As glândulas menores apresentam um sistema de ductos curtos e estão localizados na submucosa de diversas regiões da cavidade bucal.

Embriologicamente as glândulas salivares originam-se da proliferação de cordões epiteliais que penetram e ramificam-se no ectomesênquima formando estruturas semelhantes a "brotos" que vão crescendo e diferenciando-se em lóbulos, originando assim as unidades secretoras. Os ductos formam-se pela degeneração das células centrais dos cordões epiteliais, completando a complexa estrutura das glândulas salivares (Ten Cate, 1988).

Histologicamente as unidades secretoras das glândulas salivares são denominadas ácinos: estruturas que apresentam

diversidade de tamanho, forma e número de células. Podem ser constituídas por dois tipos de células: mucosas e serosas, também conhecidas como seromucosas por secretarem polissacarídeos (Ten Cate, 1988). As células mucosas apresentam estrutura piramidal com núcleo achatado localizado na sua base. As células serosas são piramidais com núcleo esférico localizado no terço basal.

Quando o ácino apresenta os dois tipos de células juntas é denominado misto. No ácino misto as células mucosas formam uma estrutura acinar típica, com extremidade em fundo de saco, revestida por crescentes de várias células serosas, conhecidas como semiluas. A secreção das semiluas alcançam o lume através de canaliculos intercelulares.

O sistema ductal, em humanos, pode ser dividido em três classes: (a) ductos intercalares que são de menor diâmetro e estão revestidos por células cúbicas baixas com núcleo central e escasso citoplasma, (b) ductos estriados, que são uma continuação dos intercalares, possuem revestimento formado por células colunares, de núcleo central e citoplasma acidófilo e, (c) ductos excretores cujo revestimento é variado, apresentando epitélio pseudoestratificado com células colunares altas alternadas com células basais pequenas na extremidade próxima ao ducto estriado, e epitélio pavimentoso estratificado na extremidade próxima ao epitélio bucal. Em roedores existe também, na glândula submandibular, o ducto granuloso, que precede o ducto estriado. Esse ducto é formado por células colunares, com o núcleo no terço basal e os dois terços apicais preenchidos por grânulos secretores

eosinófilos ricos em polipeptídeos, como Fatores de Crescimento de Nervo (NGF), Fatores de Crescimento Epidermal (EGF) (Murphy et al, 1980; Takai et al, 1985) e Fatores de Crescimento Transformadores $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) (Amano et al, 1991). Amano et al (1993) mostrou que as glândulas salivares de ratos também são ricas em Fatores de Crescimento de Fibroblastos básicos (bFGF). Esses fatores são localizados principalmente nas células dos ductos excretorios e estriados, sendo discreta ou mesmo ausente nas células dos ductos granuloso.

Outro tipo celular também identificado no parênquima das glândulas salivares são as células mioepiteliais encontradas junto aos ácinos e ductos, interpostas no espaço entre a membrana basal e a membrana plasmática. Estas células possuem a forma estrelar com o núcleo localizado no corpo central de onde partem prolongamentos citoplasmáticos que "abraçam" as estruturas acinarias e ductais. Ultraestruturalmente são muito semelhantes a músculo liso, sendo associadas a função contrátil e suporte das células acinares (Nagato et al, 1980; Junqueira, 1986; Ten Cate, 1988).

As glândulas parótidas são formadas exclusivamente por ácinos serosos com numerosos ductos intercalares. Nas glândulas submandibulares, aproximadamente 80% dos ácinos são serosos e o restante misto. Poucos ductos intercalares são observados, sendo os ductos estriados mais facilmente encontrados. As glândulas sublinguais são variáveis, há um predomínio das estruturas acinares mistas e os ductos intercalares e estriados são difíceis de serem observados (Ten Cate, 1988).

2. ATROFIA GLANDULAR

A literatura sobre atrofia de glândulas salivares é bastante extensa. A atrofia ocorre quando há empedimento da passagem do fluido salivar devido a obliteração de seu ducto excretor (Junqueira, 1950; Bhaskar et al 1956; Standish and Shafer, 1957; Tamarin, 1971; Shiba et al, 1972; Emmelin et al, 1974, Martinez et al, 1982; Takai et al, 1985; Takai et al, 1986; Ikeno et al, 1988; Hashimoto et al 1992;). Em humanos, a glândula submandibular é a mais comumente encontrada em estado atrófico devido a formação de cálculo salivar (sialolito) no interior do ducto excretor principal (Shafer et al, 1987; Ten Cate, 1988; Shinohara et al, 1992). Existem várias possibilidades para se explicar a maior incidência de cálculos nos ductos das glândulas submandibulares, como pH alcalino, alto conteúdo de mucinas na secreção destas glândulas e fluxo salivar contrário a gravidade (Barnes, 1985).

Experimentalmente se tem estudado atrofia de glândulas salivares através da ligadura de seu ducto excretor principal em diversos animais: camundongos (Junqueira, 1950), ratos (Standish and Shafer, 1957), gatos (Emmelin et al, 1974), coelhos (Bhaskar et al, 1963). Deve-se tomar o cuidado de não incluir o suprimento arterial na ligadura o que levaria a infarto da glândula por isquemia (Standish and Shafer, 1957).

Shiba et al (1972), observou que as glândulas submandibular e sublingual de ratos apresentaram edema até 3 dias

após a ligadura, provocando discreto aumento no peso quando comparado com controle. Após 5 dias de atrofia, o peso diminuía e a queda era proporcional ao período de ligadura. As mudanças associadas a atrofia glandular mostraram ser mais proeminentes na glândula submandibular que na sublingual (Hashimoto et al, 1992).

A obstrução do ducto excretor das glândulas salivares produz uma atrofia progressiva das células acinares e ductais até atingir um estado inativo ou de repouso (Junqueira, 1950; Tamarin, 1971). Entretanto, quando essas células são estimuladas com repetidas injeções de andrógeno (testosterona) passam a apresentar moderada quantidade de grânulos secretores, indicando um potencial regenerativo da glândula (Junqueira, 1950). Araujo and Tomich (1971), descreveram aumento no peso de glândulas salivares atroficas de ratos após tratamento com isoproterenol. O potencial regenerativo das glândulas salivares foi confirmado por Junqueira e Rabinovitch (1953). Esses autores mostraram que as células acinares e ductais retornaram ao aspecto histológico normal, com a volta dos grânulos secretores e mitocôndrias que haviam praticamente desaparecidos, após a recanalização do ducto ligado. Resultados semelhantes foram obtidos por Bhaskar et al (1963), que provocaram mucocelos após incisão dos ductos ligados das glândulas submandibulares e sublinguais de camundongos com até 9,5 meses de atrofia.

Tamarin (1971), realizou um estudo minucioso em microscopia eletrônica da "restauração" da morfologia das células acinares e ductais após desobstrução do ducto excretor de glândulas

submandibulares de ratos com 31 dias de atrofia. Este autor observou recuperação total do parênquima glandular 180 dias após desobstrução do ducto ligado, sendo que as células acinares regeneraram mais rapidamente que as células ductais. Devido a não existência de morte celular e figuras de mitoses serem extremamente raras, o autor concluiu que a recuperação da glândula ocorreu pela reativação das células acinares e ductais e não pela diferenciação de novas células.

A atrofia da glândula salivar é acompanhada por diminuição no número de mitocôndrias das células acinares e ductais (Tamarin, 1971) e consequente diminuição na atividade de enzimas oxidativas, limitando-se apenas a manutenção das funções vitais da célula (Shiba et al, 1972).

Apesar da grande modificação ocorrida nas células acinares e ductais das glândulas salivares durante a atrofia, as células mioepiteliais aparentemente não sofreram alterações quando analisadas em microscopia eletrônica (Tamarin, 1971). Shiba et al (1972), não observou diminuição na ação de enzimas fosfatase alcalina presentes na membrana plasmática destas células. Shinohara et al (1992), estudando sialadenites obstrutivas crônicas mostraram modificações na ultraestrutura das células mioepiteliais com aumento na quantidade de vesículas lipídicas e grânulos de lipofusina. Emmelin et al (1974), notaram que apesar das células mioepiteliais persistirem após a ligadura da glândula, sua arquitetura encontrava-se bastante alterada quando observada em microscopia eletrônica, com células contendo numerosas estruturas

semelhantes a lipofuscina e a membrana basal apresentando áreas de espessamento grosseiro adjacentes às regiões de enrugamento na superfície da célula.

Hashimoto et al (1992), observaram através de reações imunohistoquímicas, diminuição da expressão das proteínas S-100 e de EGF em glândulas atroficas de ratos. A redução dessas proteínas estava associada a degranulação das vesículas dos ductos granulosos que armazenam esses peptídeos. Estes mesmos autores, usando anticorpos para evidenciar actina em glândulas atroficas, notaram que as células mioepiteliais em glândulas sublinguais com até 21 dias de atrofia apresentaram intensidade de coloração semelhante a glândula normal, enquanto que em glândulas submandibulares, com mesmo período de atrofia, a intensidade de coloração estava bastante reduzida. Este padrão distinto das reações imunohistoquímicas em cada glândula sugere, segundo os autores, que mudanças associadas à atrofia glândular sejam mais proeminentes na glândula submandibular. Shinohara et al (1992), também utilizando o marcador actina para analisar células mioepiteliais em glândulas submandibulares de humanos com sialoadenites crônicas obstrutivas, notaram que a marcação ficou reduzida e irregular, sugerindo que além das modificações estruturais ocorridas nestas células, possa haver também uma diminuição na sua atividade.

Takai et al (1985), analisando os EGF e NGF em camundongos, notou que 10 dias após a ligadura, nenhuma marcação era observada. Entretanto, ao se fazer injeções repetidas de testosterona no animal logo após a ligadura, preservou-se a

morfologia das células granulosas e a marcação foi positiva até o 100 dia de atrofia, vindo a diminuir somente a partir do 140 dia.

A expressão de queratina também foi analisada durante atrofia glandular em ratos e camundongos. Takai et al (1986), notaram que em glândulas normais a expressão da queratina é limitada ao ducto estriado e ducto excretor sendo ausente nos túbulos granulosos. Nas glândulas atroficas o epitélio do ducto intercalar, ducto granuloso, estruturas semelhantes a ducto, ductos estriados e escretores passaram a apresentar positividade para queratina. Segundo os autores, essa alteração é indicativa de metaplasia escamosa, visto que os marcadores utilizados eram específicos para células de epitélio escamoso. Hashimoto et al (1992) obtiveram resultados semelhantes ao analisarem a expressão da citoqueratina do tipo II em glândulas submandibulares e sublinguais atroficas de ratos.

3. MATRIZ EXTRACELULAR

A matriz extracelular compreende uma intrincada rede de componentes fibrosos embebidos em gel de polissacarídeos hidratados: glicosaminoglicanas e proteoglicanas. Além de servir como suporte para as células, a matriz extracelular também exerce influência no desenvolvimento, migração, proliferação, forma e funções metabólicas das células (Alberts et al, 1989).

3.1 COLÁGENO

O colágeno compreende uma família de proteínas encontradas na matriz extracelular. As moléculas dos colágenos são formadas por 3 cadeias α que se associam na forma de hélices unidas através de pontes de hidrogênio. Cada cadeia α é codificada por um gene grande com cerca de 50 exons. O colágeno é secretado na forma de procolágeno, que sofre a ação de enzimas proteolíticas e transforma-se em protocolágeno o qual se polimeriza formando as fibrilas colágenas (Junqueira, 1986). A organização das fibrilas colágenas na matriz extracelular adapta-se às necessidades do tecido. Já foram descritos 13 tipos diferentes de colágenos. Os tipos I, II e III apresentam arranjo fibrilar e são os mais abundantes no tecido conjuntivo. O colágeno tipo IV é encontrado exclusivamente na lâmina basal, onde é um de seus principais componentes (Alberts et al, 1989; Vuorio and Crombrughe, 1990).

O colágeno tipo I é produzido por fibroblastos, odontoblastos, osteoblastos e condroblastos. Este colágeno compõe 90% do colágeno do corpo humano (Alberts et al, 1989) e está distribuído pelos ossos, tendões, dentina, cápsula de órgãos, pericôndrio e cartilagem fibrosa (Junqueira, 1986). Suas fibras possuem diâmetro médio de 78 nm (Montes e Junqueira, 1982).

O colágeno tipo II é produzido no tecidos adultos principalmente por condroblastos e encontra-se presente nas cartilagens elásticas e hialina. O diâmetro médio de suas fibrilas é de 20 nm (Montes e Junqueira, 1982).

O colágeno tipo III é produzido por fibroblastos, músculos lisos, células de Schwann, hepatócitos e células reticulares. É encontrado na camada média das artérias, útero, endoneuro, músculo liso, rim, fígado, linfonodo, baço e pele. O diâmetro médio de suas fibrilas é de 45 nm (Becker et al, 1986).

O colágeno tipo IV é produzido pelas células epiteliais, adiposas, musculares, Schwann e endoteliais. Concentra-se exclusivamente nas membranas basais associado a moléculas de laminina e fibronectina. Não apresenta estrutura fibrilar como os colágenos tipo I, II e III (Alberts et al, 1989).

Os colágenos do tipo V e XI apresentam estrutura fibrilar semelhante aos tipos I, II, e III, compondo o suporte estrutural para o corpo. O grupo dos colágenos que não apresentam arranjo em estrutura fibrilar englobam, além do tipo IV, os tipos VI, VII, VIII e X. Os tipos IX e XII correspondem a um subgrupo dos colágenos não fibrilares, porém aparecem sempre associados a outros tipos de colágenos fibrilares. O tipo IX, tem sido mostrado em associação com o colágeno tipo II, enquanto o tipo XII encontra-se associado ao colágeno tipo I. A estrutura do colágeno tipo XIII é desconhecida (Vuorio and Crombrughe, 1990).

3.2 FIBRAS ELÁSTICAS

As fibras elásticas são importantes constituintes da matriz extracelular. São encontradas principalmente nos tecidos que

requerem elasticidade durante suas funções como pele, vasos sanguíneos e pulmões. A principal proteína das fibras elásticas é a elastina, uma proteína de peso molecular de 72.000 Daltons, não glicosilizada, hidrofóbica, rica em prolina e glicina, contendo pouca hidroxiprolina e nenhuma hidroxilisina (Alberts et al, 1989). A elastina é responsável por 20% a 50% do total de proteínas dos vasos de grande calibre (Pearse, 1985).

As fibras elásticas não são compostas somente por elastina, a superfície da substância elásticas é frequentemente envolvida por microfibrilas formadas por glicoproteínas, cuja função parece ser de ajudar a célula na orientação da secreção da elastina (Alberts et al, 1989).

3.3 MEMBRANA BASAL

A membrana basal é um tipo especial de matriz extracelular constituída de uma fina camada com aproximadamente 50 nm de espessura, que separa as células endoteliais e epiteliais do tecido conjuntivo subjacente, além de formar um envoltório individualizado ao redor de células adiposas, células musculares lisas, cardíacas, esqueléticas e células de Schwann. Na M.E. de transmissão, a membrana basal é formada por: lâmina lúcida, que é adjacente a membrana da célula e apresenta baixa densidade eletrônica; e lâmina densa, que é adjacente ao tecido conjuntivo e apresenta alta densidade eletrônica (Martinez-Hernandez et al,

1983). A composição química da membrana basal apresenta certa complexidade, sendo composta principalmente por colágeno do tipo IV, heparan, condroitin sulfato, proteoglicanos e uma glicoproteína de alto peso molecular denominada laminina (Paulsson, 1987; Martín and Timpl, 1987). As principais funções da membrana basal incluem: suporte físico a diversas estruturas, união e ultrafiltração. Além disso, desempenha papel importante em diversas alterações patológicas (Martinez-Hernandez et al, 1983).

MATERIAL E MÉTODO

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 20 camundongos da linhagem C57b16, machos, adultos, pesando cerca de 30 gramas, provenientes do Biotério Central da UNICAMP, alimentados com ração Purina e água "ad libitum". Sob anestesia geral com éter etílico, os animais foram submetidos a tricotomia na região ventral do pescoço, assepsia local e incisão sagital mediana de aproximadamente 2,0 cm. As glândulas submandibulares esquerda e direita foram identificadas e separadas na linha média, rompendo a fáscia intermediária que as unia, com tesoura de ponta rômica. O ducto excretor principal da glândula submandibular direita foi dissecado e separado dos vasos sanguíneos que irrigam a glândula. Um fio de algodão foi passado ao redor do ducto e amarrado firmemente, tomando o cuidado de não incluir vasos da glândula na ligadura. A glândula esquerda permaneceu como controle. A ferida cirúrgica foi suturada com pontos simples isolados. Grupos de 5 animais foram sacrificados, por inalação excessiva de éter sulfúrico, nos seguintes períodos pós-ligadura: 2, 8, 14 e 28 dias.

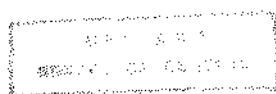
MICROSCOPIA DE LUZ

As glândulas foram retiradas cuidadosamente, fixadas em formol 10% por 24 horas, processadas e seccionadas em cortes de 5 µm corados em H.E., seguindo-se o método de rotina.

Para análise do colágeno e tecido elástico, cortes de 7 µm foram corados, repectivamente, pela técnica de Picrosírius-polarização (Junqueira et al, 1979), e pela técnica clássica de Weigert (Pearse, 1985).

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para observação em microscopia eletrônica, utilizou-se as glândulas submandibulares de 3 camundongos, onde a esquerda era normal e a direita estava ligada por 30 dias. Após as glândulas serem retiradas, foram seccionadas em pequenos fragmentos fixados em glutaraldeído 2,5%, durante 16 horas. Em seguida, as peças foram lavadas em tampão fosfato de Sorensen pH 7,3 e pós fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato por 2 horas. Após lavagem com solução salina, os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, imersos em óxido de propileno



e incluído em araldite.

Cortes semi-finos foram corados em azul de Toluidina e ultra-finos com acetato de uranila e citrato de chumbo. Os cortes foram observados e fotografados em microscópio eletrônico Zeiss EM 10 da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

RESULTADOS

1.2- Glândula após 2 dias de ligadura

Notou-se um edema bastante acentuado das células acinares, causando aumento no volume total da glândula. Esse aumento produziu uma compressão dos septos, deixando-os mais delgados neste período. As células ductais diminuíram de tamanho e os espaços luminiais apresentaram discreta dilatação (Fig. 1b).

1.3- Glândula após 8 dias de ligadura

Não foi possível, neste período, identificar nenhuma estrutura acinar íntegra. As células acinares apareciam em pequenos aglomerados entre os ductos. O formato destas células era arredondado e o núcleo ocupava praticamente todo citoplasma. As estruturas ductais estavam dilatadas, com alguns lumens apresentando diâmetro acentuado. As células dos ductos granulosos assumiram formato cubóide, sendo que em alguns casos sofriam metaplasia escamosa. Os espaços septais estavam espessados, preenchidos por tecido conjuntivo.

1.4- Glândula após 14 dias de ligadura

Os aglomerados de células acinares tornaram-se escassos. Ao redor dos ductos observou-se muitas células "livres" presentes na matriz extracelular, entretando não foi possível saber se estas células eram fibroblastos ou células acinares atróficas. Os espaços luminiais das estruturas ductais apresentavam uma maior dilatação em

relação a glândula anterior. Os septos de tecido conjuntivo estavam ainda mais espessados.

1.5- Glândula após 28 dias de ligadura

As características histológicas neste período foram semelhantes as observadas na glândula anterior (Fig. 1c).

2. *CORANTE DE WEIGERT*

O corante de Weigert, utilizado para visualização de fibras elásticas, mostrou-se excelente marcador dos grânulos presentes no citoplasma das células dos ductos granulosos.

2.1- Glândula submandibular normal

Em glândulas normais, as fibras elásticas apresentavam-se concentradas em grande quantidade ao redor dos ductos interlobulares e na parede das artérias. Ao redor dos ductos apareciam como fibras finas com muitas ramificações que se entrelaçavam umas com as outras, formando uma trama de malhas bastante irregular. Na parede das artérias, essas fibras encontravam-se condensadas na camada íntima da parede vascular

apresentando um aspecto semelhante a membrana. No interior dos lóbulos glandulares nenhuma fibra elástica podia ser observada. Na porção luminal do citoplasma das células dos ductos granulosos notou-se quantidade moderada de secreção (Fig. 2a).

2.2- Glândula após 2 dias de ligadura

Neste período, as fibras elásticas apresentaram padrão semelhante ao observado na glândula normal, com as fibras concentradas ao redor dos ductos interlobulares e na camada íntima das artérias. Não se observou material elástico na região intralobular. No citoplasma das células granulosas pode-se notar maior concentração dos grânulos de secreção, que também eram evidenciados pelo corante de Weigert (Fig. 2b).

2.3- Glândula após 8 dias de ligadura

Fibras elásticas podiam ser observadas nas regiões intralobulares. Essas fibras eram geralmente isoladas, delgadas e com discretas ramificações, localizadas preferencialmente ao redor das estruturas ductais cuja dilatação era mais acentuada. Nos ductos interlobulares e artérias o padrão foi semelhante ao descrito nas glândulas anteriores (Fig. 2c e 2d). Nesse período de atrofia, era possível identificar em uma mesma glândula, áreas onde as células granulosas estavam totalmente desprovidas de grânulos de secreção e outras áreas onde os grânulos estavam presentes no citoplasma destas células.

2.4- Glândula após 14 dias de ligadura

Notou-se aumento na espessura e no número de ramificações das fibras elásticas que circundavam as estruturas ductais de maior dilatação no interior do lóbulos da glândula (Fig. 2e e 2f).

2.5- Glândula após 28 dias de ligadura

Neste período, observou-se aumento na quantidade de fibras elásticas na região intralobular, com uma quantidade maior de ductos circundados por estas fibras. As fibras elásticas apresentaram um grau de ramificação mais acentuado que na glândula anterior, formando uma pequena trama de malha ao redor dos ductos (Fig. 2g e 2h).

3. *PICROSÍRIUS-POLARIZAÇÃO*

3.1- Glândula submandibular normal

Nos espaços septais, a presença de fibras colágenas foi discreta. Eram geralmente fibras finas, curtas, sem orientação definida, distribuídas aleatoriamente, ocupando uma pequena porção dos septos (Fig. 3a e 3a'). Na região intralobular, poucas fibras colágenas podiam ser observadas. Eram fibras discretas e delicadas,

localizadas principalmente ao redor das estruturas ductais (Fig. 3f e 3f').

3.2- Glândula após 2 dias de ligadura

Em algumas áreas dos espaços septais, houve aumento na quantidade de fibras colágenas. As fibras se apresentavam mais espessadas e com sua birrefringência aumentada (Fig. 3b e 3b'). Nas regiões intralobulares, o colágeno não apresentou alteração significativa em relação a glândula normal (Fig. 3g e 3g').

3.3- Glândula após 8 dias de ligadura

Os septos encontravam-se quase que totalmente preenchidos por fibras colágenas, que apresentavam orientação definida e aumento acentuado na sua birrefringência (Fig. 3c e 3c'). Na região intralobular houve um aumento na quantidade de fibras colágenas que se distribuíam aleatoriamente, dispersas entre as células ductais e acinares. O aumento do material colágeno foi particularmente acentuado ao redor das estruturas ductais (Fig. 3h 3h').

3.4- Glândula após 14 dias de ligadura

Os septos encontravam-se mais espessados e totalmente preenchidos por fibras colágenas cuja birrefringência estava aumentada (Fig. 3d e 3d'). Na região intralobular, o aumento na

quantidade de colágeno era nítido, sendo que, ao redor das estruturas ductais a concentração de fibras era mais intensa (Fig. 3i e 3i').

3.5- Glândula após 28 dias de ligadura

Em algumas regiões dos septos, a birrefringência das fibras colágenas era mais intensa, evidenciando um aumento destas fibras em relação ao período anterior (Fig. 3e e 3e'). Na região intralobular, notou-se aumento ainda maior na quantidade de fibras colágenas, principalmente ao redor das estruturas ductais (Fig. 3j e 3j').

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

-GLÂNDULA SUBMANDIBULAR NORMAL

Os ductos granulosos apresentavam-se revestidos por células de formato retangular com núcleos arredondados localizados na porção basal. Os 2/3 apicais do citoplasma encontravam-se preenchidos por grânulos de secreção eletrôn-densos de diversos tamanhos. Mitocôndrias apareciam próximas a membrana basal da célula e ao lado do núcleo. O retículo endoplasmático rugoso era abundante, com cisternas dilatadas, preenchendo grande parte do

citoplasma celular (Fig. 4a).

As células acinares apresentavam formato triangular com núcleo arredondado localizado na porção basal e circundado por abundante retículo endoplasmático rugoso cujas cisternas eram estreitas. Diversas mitocôndrias espalhadas ao redor do núcleo podiam ser observadas. A porção apical da célula aparecia preenchida por pequenas vesículas de secreção eletrôn-lúcidas, que geralmente se coalesciam. Uma fina granulação eletro-densa podia ser observada no interior destas vesículas (Fig. 4b).

As células mioepiteliais possuíam o citoplasma preenchido por microfilamentos arranjados paralelamente, semelhantes a músculo liso. Seus prolongamentos uniam-se com a membrana plasmática das células ductais e acinares através de junções do tipo desmosoma. A membrana basal das células mioepiteliais aparecia distendida e delgada (Fig. 4c).

Na matriz extracelular foi possível notar a presença de alguns fibroblastos entre as estruturas acinares e ductais. Fibrilas colágenas eram poucas, mas podiam ser encontradas em regiões delgadas entre os ácinos, mesmo quando as células quase se tocavam. Não se observou presença de fibras elásticas.

-GLÂNDULA APÓS 30 DIAS DE LIGADURA

As células dos ductos granulosa apresentavam formato

cúbico com o núcleo arredondado ocupando a porção central da célula e o citoplasma completamente desprovido de grânulos de secreção. O retículo endoplasmático rugoso encontrava-se bastante reduzido, com suas cisternas delgadas. Houve um aumento no número de mitocôndrias que se concentravam principalmente nas regiões laterais e basal do núcleo. Grânulos do tipo lipofuscina podiam ser encontrados por todo citoplasma (Fig. 5a).

As células acinares, após 30 dias de ligadura, apresentaram uma diminuição na relação citoplasma/núcleo. O retículo endoplasmático rugoso estava bastante reduzido e distribuído na região apical da célula. Houve discreto aumento na quantidade de mitocôndrias, que encontravam-se espalhadas ao redor do núcleo, excluindo as regiões adjacentes ao lumen da célula. Grânulos eletrôn-densos de lipofuscina podiam ser observados por todo citoplasma (Fig. 5b).

As células mioepiteliais apresentaram alterações menos significativas do que as ocorridas nas células acinares e ductais durante a atrofia glandular. Alguns grânulos semelhantes a lipofuscina puderam ser observados em diversas áreas do citoplasma (Fig. 5b). Entretanto, a alteração mais marcante nas células mioepiteliais durante a atrofia ocorreu na sua arquitetura. Em algumas regiões notou-se enrugamento bastante acentuado na superfície da célula originando formas de aparências bizarras (Fig. 5b e 5c). A membrana basal adjacente a estas áreas apresentava espessamento grosseiro, com aumento acentuado na quantidade de um material de aspecto granular (Fig. 5c). Nas regiões em que a

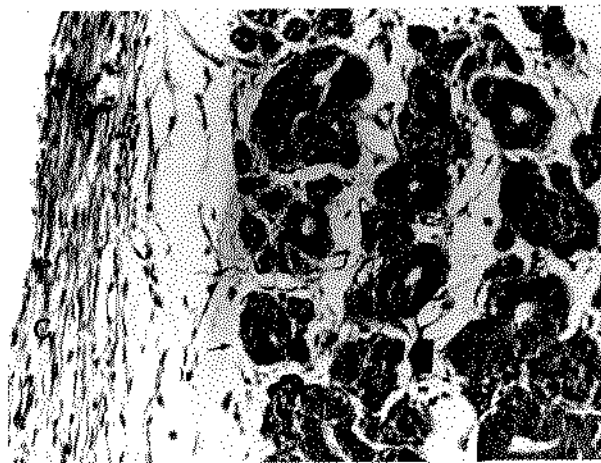
superfície da célula encontrava-se distendida, a membrana basal apresentava características semelhantes a normal (Fig. 5d).

A matriz extracelular, apresentou aumento acentuado após 30 dias de atrofia. Fibroblastos eram numerosos e facilmente encontrados nos espaços intersticiais (Fig. 5a). A quantidade de fibrilas colágenas estava aumentada em relação a glândula normal, sendo que, não se notou alteração aparente na espessura ou densidade dessas fibrilas. Fibrilas elásticas, que nas regiões intralobulares de glândulas normais não eram observadas, podiam ser encontradas próximas a membrana basal das células atroficas e circundadas por fibrilas colágenas. Essas fibrilas elásticas eram "maduras" na sua maioria, formada por material amorfo circundado por diversas microfibrilas (Fig. 5).

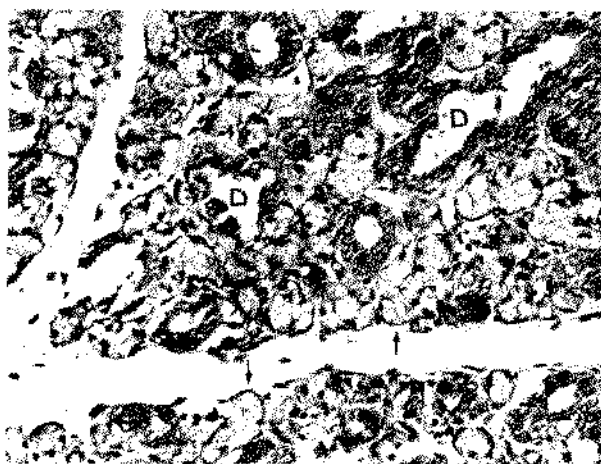
Fig. 1a - Glândula submandibular de camundongo normal mostrando cápsula delgada (C) e estroma escasso. Há predomínio das estruturas ductais (setas menores) sobre as estruturas acinares (setas maiores). HE, 130x.

Fig. 1b - Glândula submandibular com 2 dias de ligadura. Os ácinos encontram-se edemaciados (setas) e os ductos dilatados (D). HE, 130x.

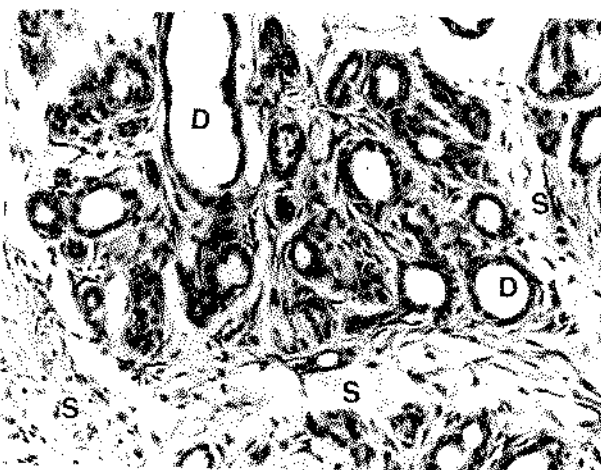
Fig. 1c - Glândula submandibular com 28 dias de ligadura. Os espaços septais encontram-se espessados (S). As células acinares são difíceis de serem identificadas e os ductos apresentam acentuada dilatação (D). HE, 130x.



1a



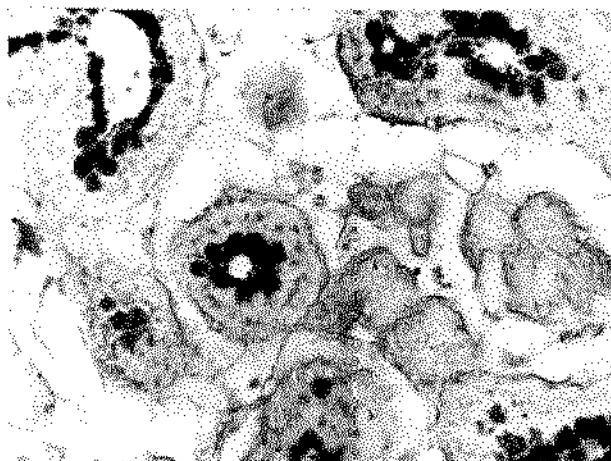
1b



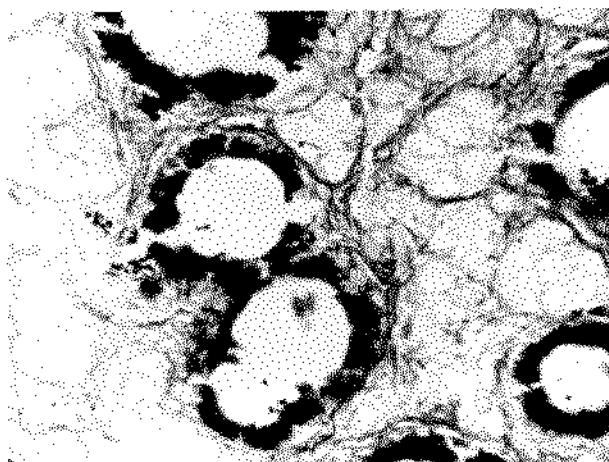
1c

Fig. 2a - Glândula submandibular normal mostrando uma área intralobular onde se nota os grânulos corados nas células do ducto granuloso. Corante de Weigert, 320x.

Fig. 2b - Glândula após 2 dias de ligadura. Não se observa ainda fibras elásticas nas regiões intralobulares. Notar o aumento na quantidade de grânulos nas células dos ductos granulosos. Corante de Weigert, 320x.



2a



2b

Fig. 2c - Glândula após 8 dias de ligadura onde se observa presença de fibras elásticas ao redor de estruturas ductiformes no interior dos lóbulos (setas). Corante de Weigert, 130x.

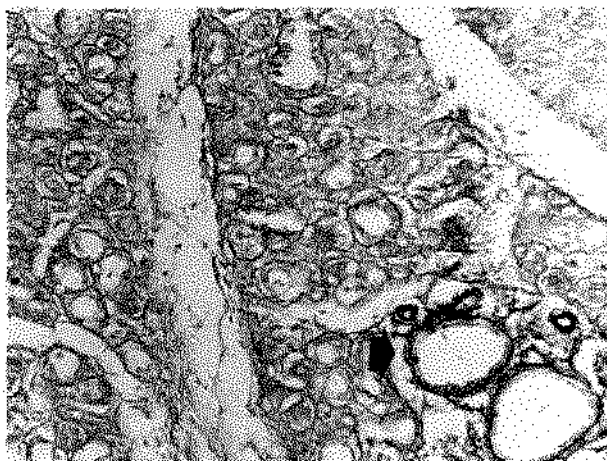
Fig. 2d - Maior aumento da glândula anterior mostrando fibras elásticas ao redor de ductos intralobulares (seta). Corante de Weigert, 320x.

Fig. 2e - Glândula com 14 dias de atrofia mostrando fibras elásticas (setas) ao redor de ductos intralobulares. Corante de Weigert, 130x.

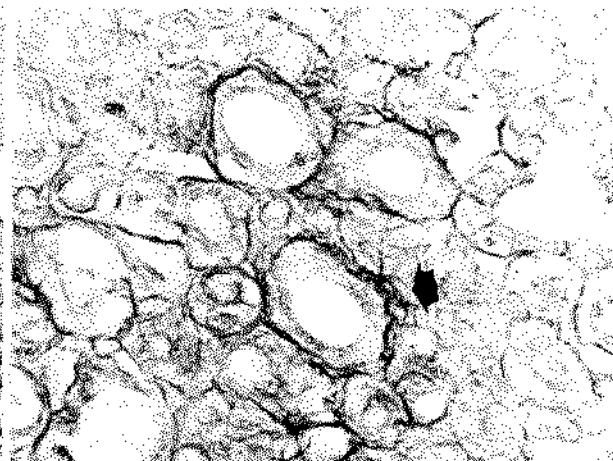
Fig. 2f - Detalhe da anterior mostrando as fibras elásticas circundando uma estrutura ductiforme (seta). Corante de Weigert, 320x.

Fig. 2g - Glândula com 28 dias de ligadura. As fibras elásticas ao redor dos ductos intralobulares apresentam um número maior de ramificações (setas). Corante de Weigert. 130x.

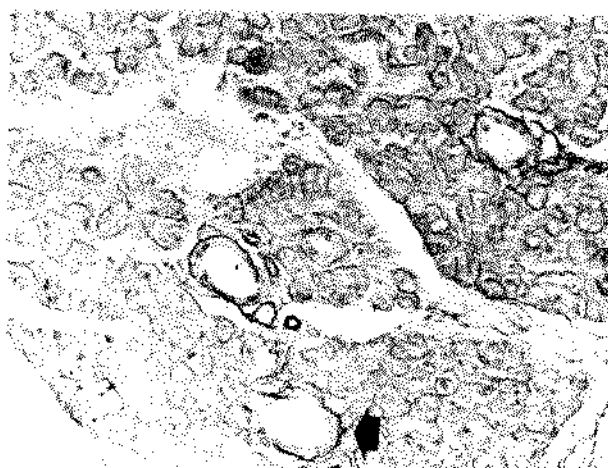
Fig. 2h - Maior aumento da anterior, onde se observa ramificações das fibras elásticas (setas). Corante de Weigert, 320x.



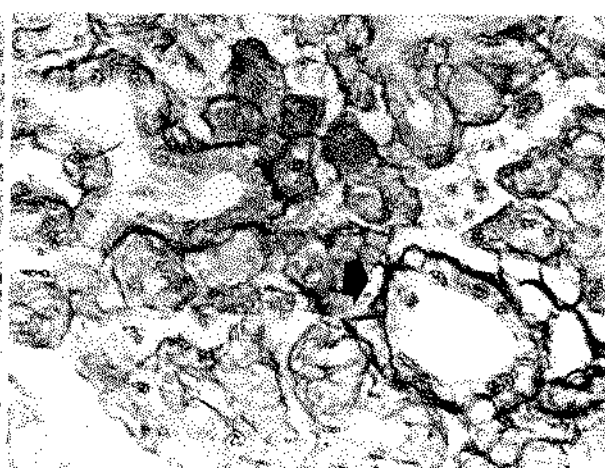
2c



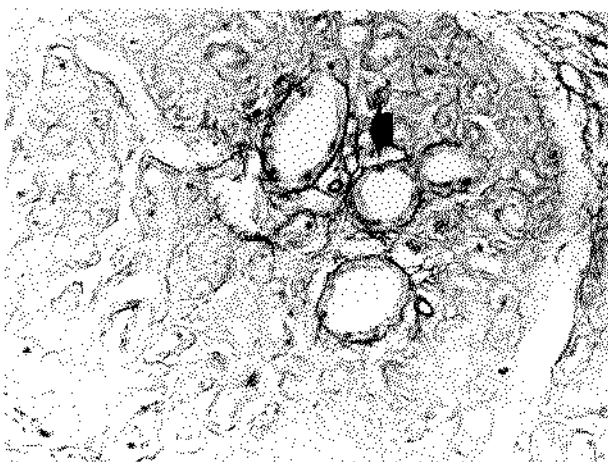
2d



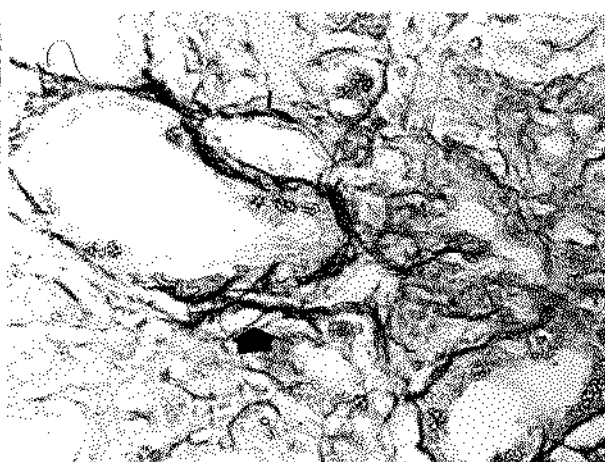
2e



2f



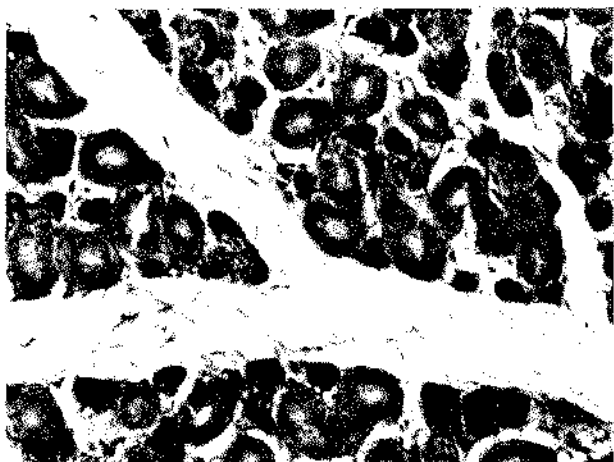
2g



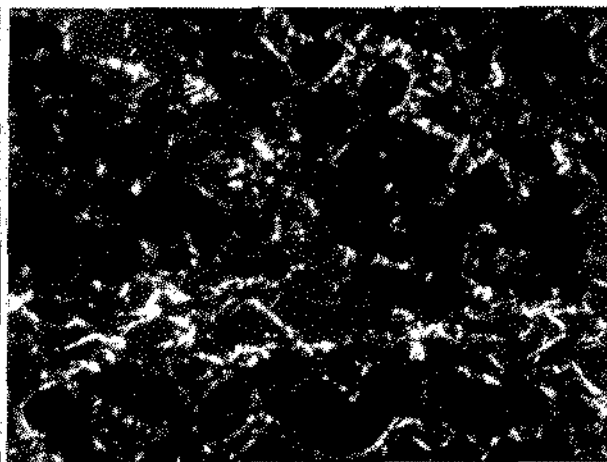
2h

Fig. 3a e 3a' - Glândula submandibular normal mostrando espaços septais com discretas fibras colágenas sem orientação definida. Picrosírius-polarização, 130x.

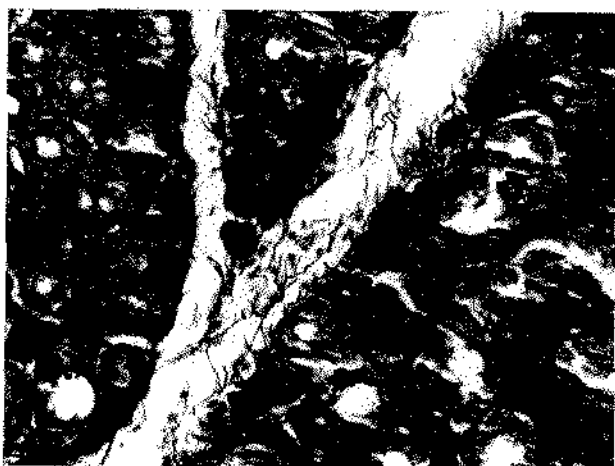
Fig. 3b e 3b' - Glândula após 2 dias de ligadura mostrando uma área maior de fibras em relação ao normal. Picrosírius-polarização, 130x.



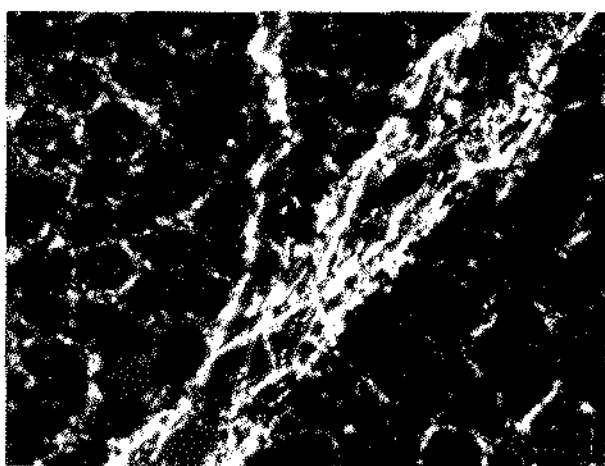
3a



3a'



3b



3b'

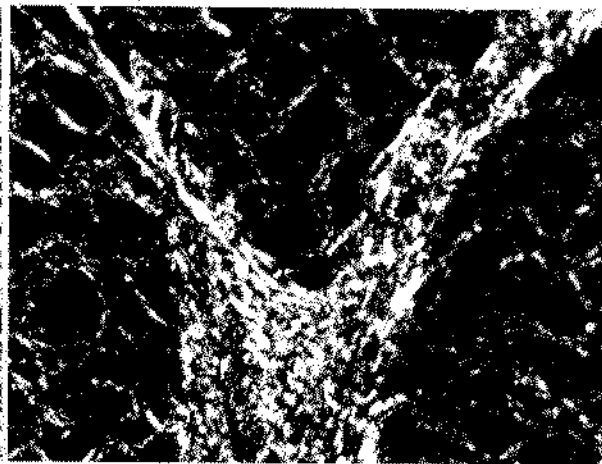
Fig. 3c e 3c' - Glândula após 8 dias de ligadura mostrando espaços septais dilatados e preenchidos por fibras com orientação bem definida. Picrosírius-polarização, 130x.

Fig. 3d e 3d' - Glândula após 14 dias de ligadura mostrando dilatação ainda maior dos espaços septais, Na imagem polarizada notamos que todo o septo está preenchido por fibras colágenas. Picrosírius-polarização, 130x.

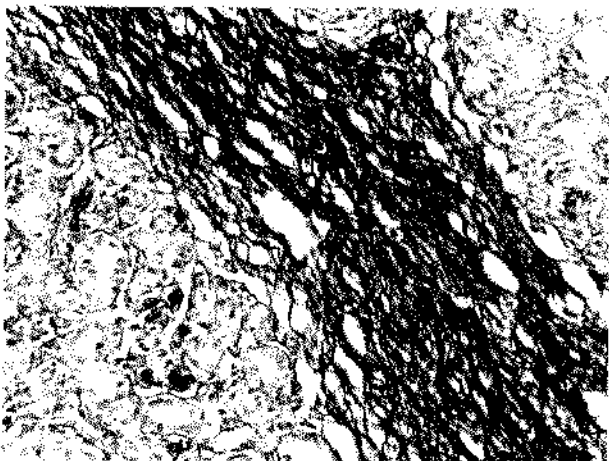
Fig. 3e e 3e' - Glândula após 28 dias de ligadura mostrando aspecto histológico semelhante à glândula anterior. Na imagem polarizada notamos uma birrefringência mais intensa nos espaços septais. Picrosírius-polarização, 130x.



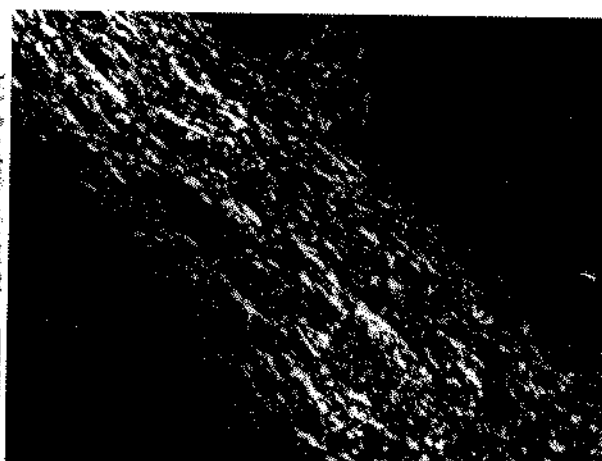
3c



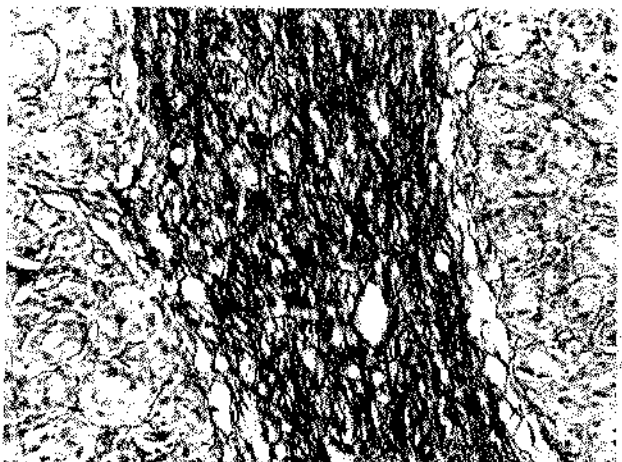
3c'



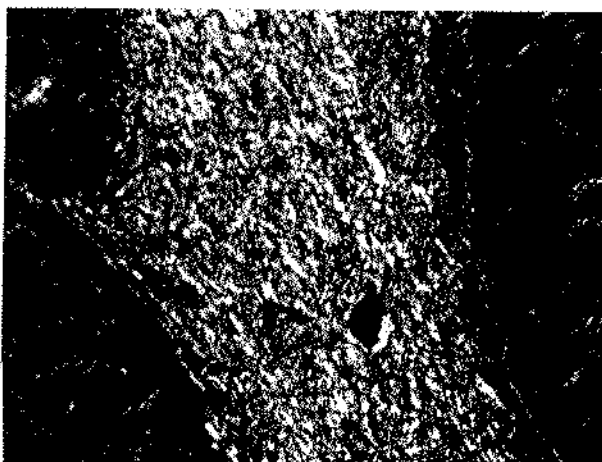
3d



3d'



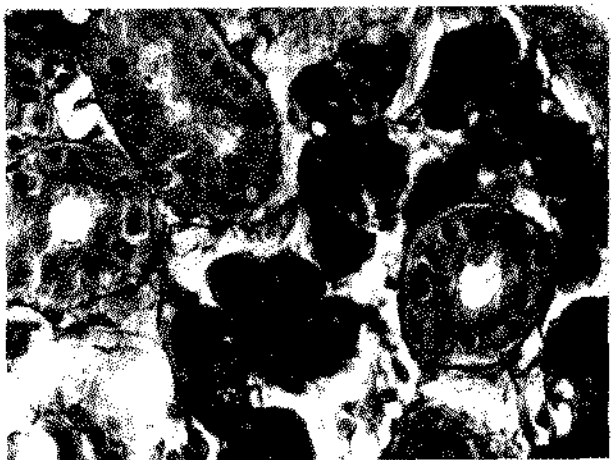
3e



3e'

Fig. 3f e 3f' - Glândula normal mostrando discretas fibras colágenas na região intralobular, circundando estruturas ductais e acinares. Picrosírius-polarização, 320x.

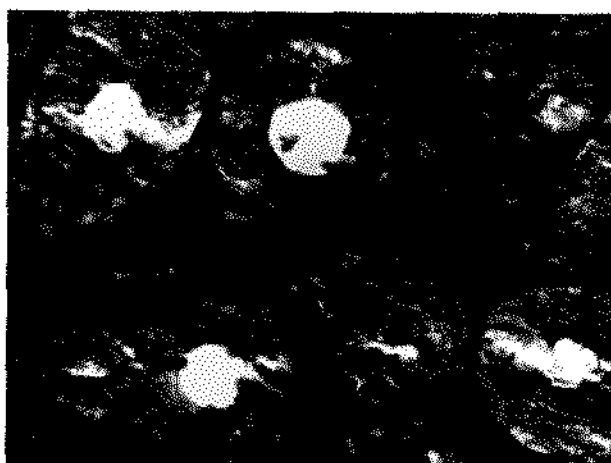
Fig. 3g e 3g' - Glândula após 2 dias de ligadura mostrando aspecto semelhante à glândula anterior. Picrosírius-polarização, 320x.



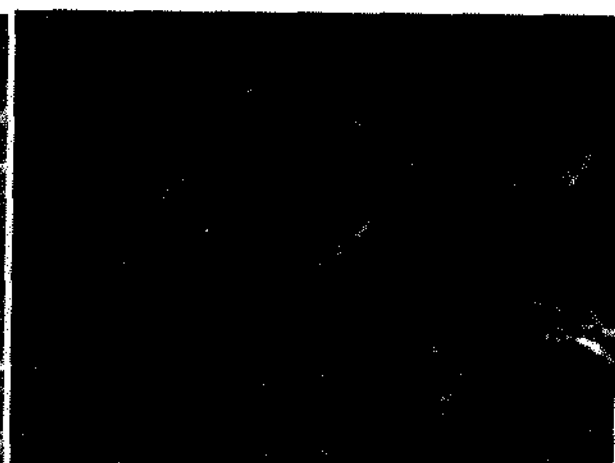
3f



3f'



3g

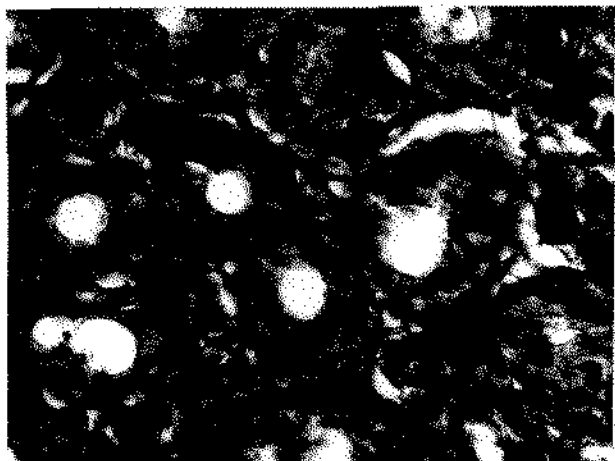


3g'

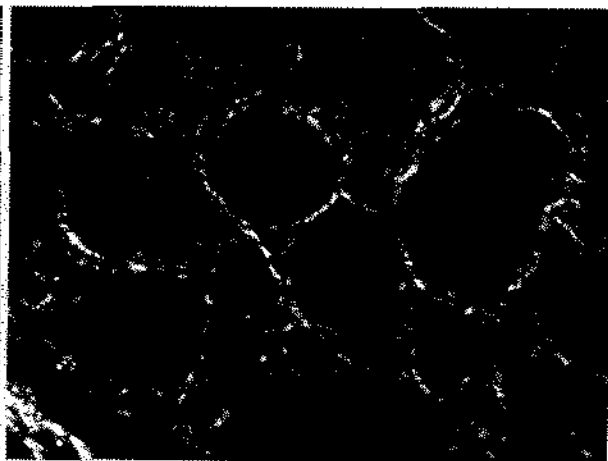
Fig. 3h e 3h' - Glândula após 8 dias de ligadura. Nota-se aumento na quantidade de fibras colágenas ao redor das estruturas ductais. Picrosírius-polarização, 320x.

Fig. 3i e 3i' - Glândula após 14 dias de ligadura mostrando aumento maior na quantidade e na intensidade da birrefringência das fibras colágenas. Picrosírius-polarização, 320x.

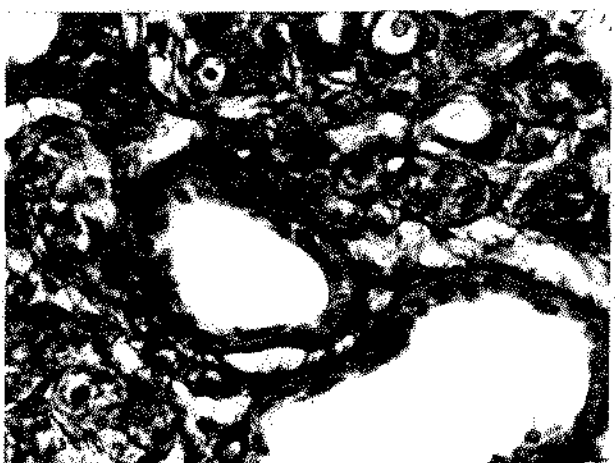
Fig. 3j e 3j' - Glândula após 28 dias de ligadura onde nota-se aumento na quantidade e birrefringência das fibras colágenas em relação à glândulas anterior. Picrosírius-polarização, 320x.



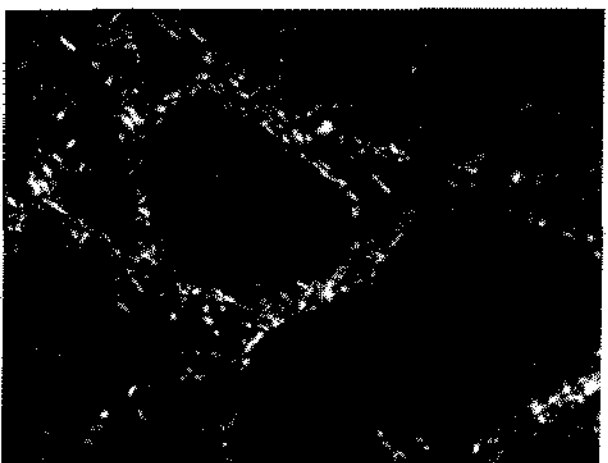
3h



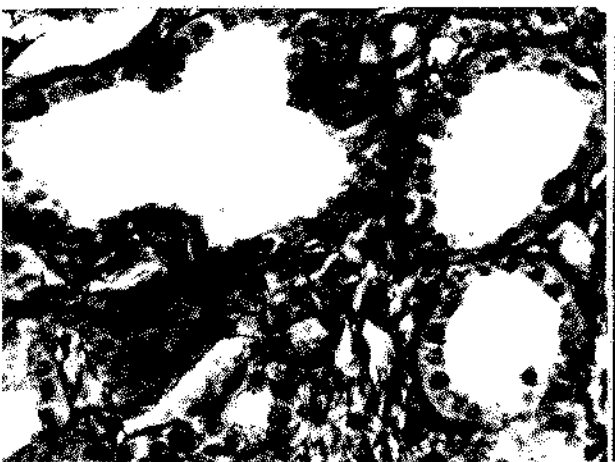
3h'



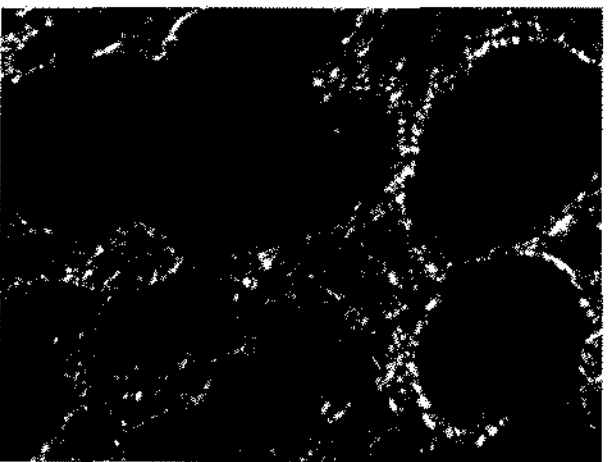
3i



3i'



3j

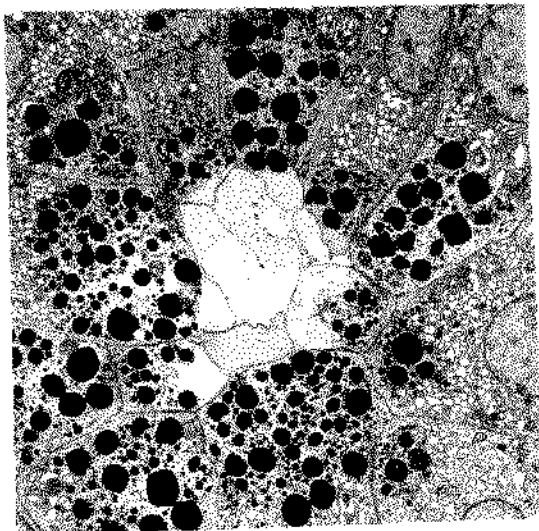


3j'

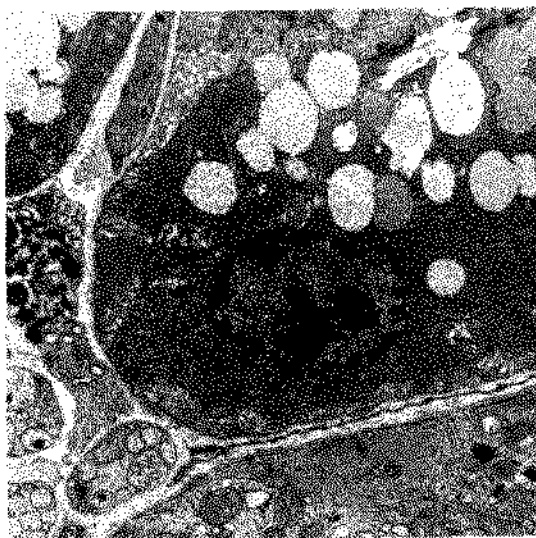
Fig. 4a - Micrografia Eletrônica (ME) de glândula submandibular normal de camundongo mostrando um ducto granuloso cujas células são ricas em grânulos eletrôn-densos. 2500x.

Fig. 4b - ME de glândula submandibular normal mostrando uma célula acinar com grânulos de secreção. Ao redor do núcleo há grande concentração de RER. 7500x.

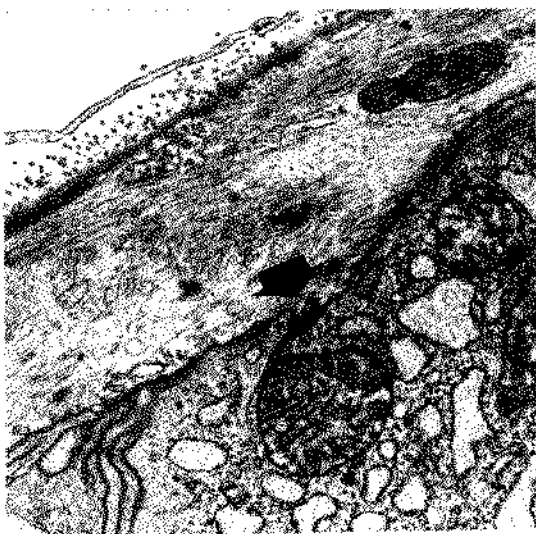
Fig. 4c - ME de glândula submandibular normal onde se observa um prolongamento da célula mioepitelial unida à superfície de uma célula ductal por desmosomo (seta). 24500x.



4a



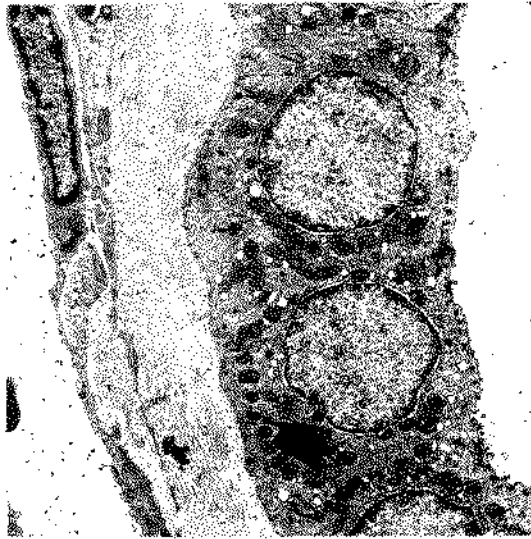
4b



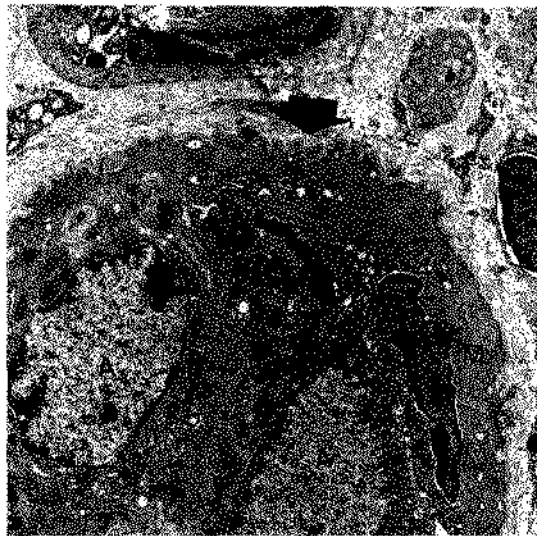
4c

Fig. 5a - ME de glândula após 30 dias de ligadura mostrando células ductais atroficas. É grande o número de mitocôndrias espalhadas pelo citoplasma. Corpos de lipofuscina ser observados (seta). Notar a presença de fibroblastos na matriz extracelular (F). 4700x.

Fig. 5b - ME de glândula após 30 dias de ligadura mostrando células acinares atroficas (A) "abraçadas" por uma célula mioepitelial (M). Grânulos de lipofuscina (setas menores) aparecem tanto no citoplasma de células acinares como de células mioepiteliais. Algumas áreas da superfície da célula mioepitelial encontra-se enrugada (seta maior). 5800x.



5a

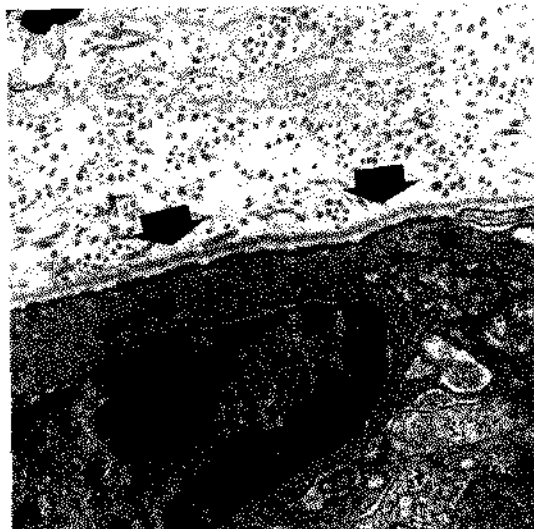


5b

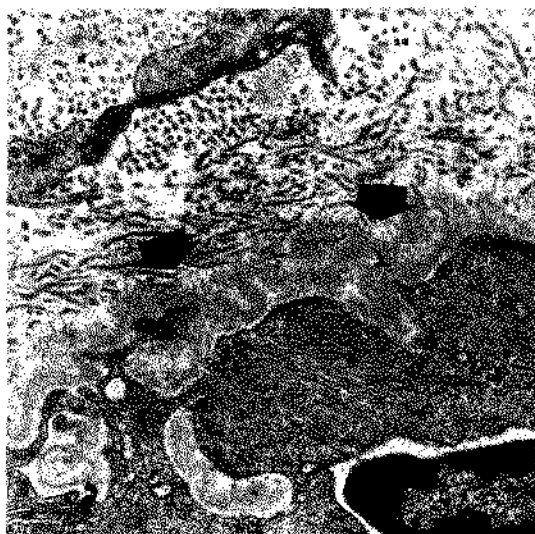
Fig. 5c - ME de glândula submandibular após 30 dias de ligadura mostrando em detalhe uma área de superfície lisa da célula mioepitelial onde a membrana basal apresenta características normais (setas). 24500x.

Fig. 5d - ME de glândula submandibular após 30 dias de ligadura mostrando um detalhe uma área de superfície enrugada da célula mioepitelial. Notar o espessamento irregular da membrana basal (setas). 24500x.

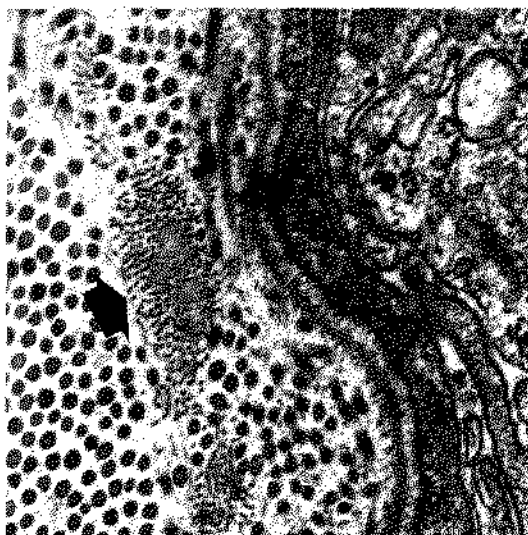
Fig. 5e - ME de glândula após 30 dias de ligadura mostrando uma fibra elástica (seta) próxima a célula ductal e circundada por fibrilas colágenas. 48000x.



5c



5d



5e

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

As alterações morfológicas ocorridas na glândula salivar durante a atrofia experimental, observadas em cortes corados por H.E., assemelham-se aos vários trabalhos já descritos na literatura (Junqueira, 1950; Bhaskar et al, 1956; Standish and Shafer, 1957; Shiba et al, 1972; Martinez et al, 1982). O aumento na expressão do colágeno durante os diversos períodos de atrofia pôde ser bem evidenciado pelo método de Picrosírius associado a microscopia de polarização, preconizado por Junqueira et al (1979). O aumento do colágeno foi evidente tanto nos espaços septais, como nas regiões intralobulares. O método Picrosírius-polarização, usado neste trabalho para identificação do colágeno, não permite distinguir os diferentes tipos secretados durante a atrofia da glândula.

Em circunstâncias normais o estroma das glândulas salivares apresentam equilíbrio entre o colágeno sintetizado pelos fibroblastos e a quantidade removida desse tecido. O aumento significativo do colágeno durante a atrofia glandular pode ocorrer devido a alterações na secreção de fatores de crescimento pelas células epiteliais da glândula salivar atrófica. Esses fatores estimulariam a migração e proliferação de fibroblastos, e aumentariam a síntese de colágeno. Estudos têm mostrado que células

dos ductos granulosos de roedores, presentes nas glândulas submandibulares, contém uma ampla variedade de polipeptídeos biologicamente ativos tais como NGF (Murphy, 1980; Takai et al, 1985; Olson et al, 1987), EGF (Murphy, 1980; Takai et al, 1985) e TGF- β 1 (Amano et al, 1991). Reações imunohistoquímicas mostraram que esses fatores de crescimento são localizados nos grânulos secretores das células dos ductos granulosos, cujo conteúdo é liberado na saliva através de estimulação nervosa e hormonal (Takai et al 1985; Garret et al, 1991).

Fatores de Crescimento de Fibroblastos básicos também foram identificados nas glândulas salivares, entretanto, sua localização foi diferente dos outros fatores. Os bFGF foram observados nas células dos ductos estriados e excretores nos três pares de glândulas salivares de ratos, enquanto que, nas células dos ductos granulosos, a imunoreação para estes fatores de crescimento foi discreta ou mesmo ausente (Amano et al, 1993). Os bFGF atuam como mitógenos fibroblásticos, estimulando a proliferação e diferenciação destas células (Gospodarowics, 1990; Robbins, 1991). Os FGFs existem em duas formas muito parecidas, o básico (bFGF) e o ácido (aFGF), os quais apresentam homologia de 50% na sequência de seus aminoácidos e interagem com receptores de superfície celular comuns (Neufeld and Gospodarowics, 1986). O gene humano do bFGF está localizado no cromossomo 4, enquanto que, o gene do aFGF encontra-se no cromossomo 5 (Jaye et al, 1986). Além de fibroblastos, os bFGF estimulam também a proliferação de outros tipos de células envolvidas no processo de cicatrização de feridas,

como células endoteliais e células de músculo liso (Gospodarowicz, 1990).

O TGF- β é um polipeptídeo que possui características multifuncionais, podendo estimular ou inibir a diferenciação, proliferação ou outros processos críticos das funções celulares (Sporn et al, 1986). Já foram identificados 5 tipos de TGF- β , sendo que, na maioria dos ensaios biológicos esses peptídeos foram equipotentes. Entretanto, há indicações de que em sistemas mais complexos onde ocorrem interações entre diferentes tipos celulares, as variantes do TGF- β podem diferir em suas atividades (Narayanan et al, 1989; Wakefield et al, 1990).

Estudos recentes têm mostrado que a presença de TGF- β 1 em culturas de fibroblastos atua como excelente ativador da secreção e acumulação de colágeno, principalmente, dos tipos I e III na matriz extracelular (Fine and Goldstein, 1987; Varga et al 1987; Narayanan et al, 1989). Aumento na biosíntese de fibronectina e colágeno IV também foi observado em culturas de células do tipo HT-1080 derivadas de fibrosarcoma humano (Kahari et al, 1991) e células NIH-3T3 (Grande et al, 1993) devido a influência do TGF- β 1.

Acreditamos que na atrofia de glândulas submandibulares vários destes fatores estejam agindo sinergicamente contribuindo para o aumento da matriz extracelular. Sabe-se, por exemplo, que o TGF- β aumenta a transcrição do gene responsável pelo receptor do EGF aumentando o número desses receptores de membrana em culturas de fibroblastos renais de ratos (Fine and Goldstein, 1987; Thompson et al, 1988). Nossos resultados sugerem que a atrofia experimental da

glândula salivar pode ser usada como modelo "in vivo" para mostrar a influência dos fatores de crescimento sobre a síntese de componentes da matriz extracelular.

O surgimento do tecido elástico nas regiões intralobulares foi notado a partir do 8º dia de atrofia da glândula. Com a evolução da atrofia, houve um aumento tanto na espessura como no número de ramificações das fibras. Porém, diferente do colágeno, o tecido elástico concentrava-se principalmente ao redor das estruturas ductais dilatadas no interior dos lóbulos. A expressão e localização distintas dos tecidos colágeno e elástico sugere que processos distintos estejam estimulando fibroblastos a produzirem estes tecidos.

David and Buchner (1980), estudando a expressão do tecido elástico em adenomas pleomórficos e carcinomas adenóides císticos sugeriram que a grande quantidade de tecido elástico presente ao redor de estruturas ductais dilatadas seria produzida pelas células mioepiteliais tumorais. Esta segunda hipótese nos parece ser mais adequada para explicar a íntima relação entre o tecido elástico e as estruturas ductiformes nas glândulas atróficas observadas nos cortes de microscopia eletrônica.

Em condições normais, o tecido elástico é sintetizado principalmente por fibroblastos e células musculares lisas em tecidos submetidos à forças de tração ou pressão como ductos excretores de glândulas salivares e artérias (Lorber, 1992). Deste modo, é possível que a dilatação das estruturas ductais que ocorre durante a atrofia das glândulas salivares atue como estímulo

mecânico para a síntese de tecido elástico pelas células mioepiteliais.

Nossos resultados mostraram que o desaparecimento dos grânulos de secreção das células dos ductos granulosos não foi completa, possivelmente devido a obstrução parcial do ducto excretor. Emmelin et al (1974), usando fios de seda para ligar ductos de glândulas parótidas e submandibulares mostraram que mesmo em condições de atrofia intensa a glândula ainda produz e secreta uma pequena quantidade de saliva. A obstrução parcial da glândula pode explicar o grande número de mitocôndrias observadas nos ductos granulosos após 30 dias de atrofia, quando comparada com o estudo de Tamarin (1971). Este autor usou tubos de polietileno atados por fios de aço inoxidável, método que possivelmente produz obstrução completa do ducto, induzindo uma atrofia glandular mais profunda do que a produzida pela ligadura de algodão.

Alguns autores (Shiba et al, 1972; Tamarin, 1971), não observaram modificações nas células mioepiteliais durante a atrofia experimental. Nossos resultados mostram que apesar de menos significativas do que as células ductais e acinares, as células mioepiteliais também sofreram modificações. Corpos de lipofuscina, fenômeno indicativo de alterações degenerativas, foram frequentemente observados no citoplasma das células mioepiteliais. Estas figuras também foram observadas em glândulas submandibulares de humanos com lesões obstrutivas (Shinohara et al, 1992).

Observou-se também nas células mioepiteliais, espessamento irregular da membrana basal adjacente as regiões em

que a superfície da célula aparecia enrugada. Emmelin et al (1974), notaram espessamento semelhante da membrana basal de células mioepiteliais em glândulas submandibulares de gatos após ligadura de seu ducto. O espessamento da membrana basal também foi observado durante a involução de glândulas mamárias de ratas (Radnor, 1972). Emmelin et al (1974), sugeriram que a intensa atrofia sofrida pelas células acinares e ductais, produz enrugamento de algumas áreas da superfície das células mioepiteliais cujas modificações morfológicas foram menos intensas. A diminuição da superfície celular provocaria acúmulo da membrana basal nas áreas adjacentes ao enrugamento. Existe também a possibilidade de que o aumento na espessura ocorra devido a alterações na síntese ou degradação dos componentes da membrana basal, a exemplo do que ocorre em outros processos patológicos como o diabetes mellitus (Martinez-Hernandez and Amenta, 1983), e processos neoplásicos, incluindo o adenoma pleomórfico de parótida (Line, 1989).

CONCLUSÃO

CONCLUSÕES

1. A obstrução do ducto excretor de glândulas submandibulares de camundongos produz atrofia progressiva e intensa alteração morfológica das células do parênquima glandular.

2. A atrofia glandular é acompanhada por intensa deposição de colágeno no meio extracelular.

3. A deposição do colágeno é mais intensa nos espaços septais, porém também ocorre ao redor dos ductos dilatados dentro dos lóbulos glandulares.

4. A expressão do tecido elástico segue padrão distinto do colágeno. Além de discreta, a expressão do tecido elástico se restringiu a uma fina camada circundando as estruturas ductais dilatadas no interior dos lóbulos glandulares.

RESUMO

RESUMO

Durante a atrofia da glândula submandibular de camundongos, produzida por obstrução de seu ducto excretor principal, observou-se aumento progressivo das fibras colágenas tanto nos espaços extra-celulares como intra-lobulares. Fibras elásticas, ausentes nas regiões intra-lobulares de glândulas normais, puderam ser observadas após 8 dias de atrofia circundando estruturas ductiformes que apresentavam acentuada dilatação luminal. Microscopia eletrônica de transmissão mostrou intensa modificação morfológica das células acinares e ductais. As células mioepiteliais apresentaram um "enrugamento" de sua superfície com acúmulo da membrana basal adjacente. Fibras elásticas foram observadas somente em glândulas atróficas localizadas adjacentes às células ductais. O aumento na deposição dos tecidos colágenos e elástico se deve provavelmente a alterações na síntese de hormônios e fatores de crescimento que ocorrem nas células do parênquima glandular durante a atrofia.

SUMMARY

SUMMARY

Histochemical detection of collagen and elastic fibers was carried out in duct-ligated submandibular glands of mice. A progressive increase of collagens fibers was observed both in extra-lobular and intra-lobular space. Elastic fibers were not found in the intra-lobular region of normal submandibular glands. This tissue was only found around dilated duct-like structures, 8 days after ligation. Electron microscopy showed extensive morphologic changes for acinar, ductal cells. Myoepithelial cells showed extensive "wrinkling" of outer plasma membrane leading to a thickening of the associated basement membrane. We believe that changes in the synthesis of growth hormones and other biologically active peptides that occur in the acinar and ductal cells during atrophy may influence mesenchymal cells to proliferate and to deposit large amounts of extracellular components.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON JD. Molecular Biology of the Cell. 2a Ed. New York & London: Garland Publishing Inc, 1989, cap 14.

AMANO O, TSUJI T, NAKAMURA T, ISEKI S. Expression of transforming growth factor β 1 in the submandibular gland of the rat. J Histochem Cytochem 1991: 39, 1707-1711.

AMANO O, YOSHITAKE Y, NISHIKAWA K, ISEKI S. Basic Fibroblast growth factor in rat salivary glands. Cell Tissue Res 1993: 273, 467-474.

ARAUJO NS, TOMICH CE. Experimental production of mucus-retention phenomenon in animals treated with isoproterenol. Oral Surg 1971: 31, 849-860.

BARNES L. Surgical Pathology of the Head and Neck. New York: Marcel Dekker Inc, 1985, cap 13.

- BECKER U, NOWACK H, GAY S, TIMPL R. Production and specificity of antibodies against the aminoterminal region in type III collagen. Immunology 1986: 31, 57-65.
- BHASKAR SN, BOLDEN TE, WEINMANN JP. Experimental obstructive adenitis in the mouse. J Dent Res 1956: 6, 852-862.
- BHASKAR SN, LILLY GE, BHUSSRY B. Regeneration of the salivary glands in the rabbit. J Dent Res 1963: 45, 37-41.
- DAVID R, BUCHNER A. Elastosis in benign and malignant salivary gland tumors. A histochemical and ultrastructural study. Cancer 1980: 45, 2301-2310.
- EMMELIN N, GARRET JR, OHLIN P. Secretory activity and the myoepithelial cells salivary glands after ducto ligation in cats. Arch Oral Biol 1974: 19, 275-283.
- FINE A, GOLDSTEIN RA. The effect of transforming growth factor- β on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts. J Biol Chem 1987: 262, 3897-3902.
- GARRETT JR, SULEIMN AM, ANDERSON LC, PROCTOR GB. Secretory responses in granular ducts and acini of submandibular glands in vivo to parasympathetic or sympathetic nerve stimulation in rats. Cell Tissue Res 1991: 264, 117-126.

GRANDE J, MELDER D, ZINSMEISTER A, KILLEN P. Transforming growth factor- β 1 induces collagen IV gene expression in NIH-373 cells. Lab Invest 1993: 69, 387-395.

GOSPODAROWICS D. Fibroblast growth factor and its involvement in developmental processes. Curr Top Dev Biol 1990: 24, cap 3.

HASHIMOTO J, YAMADA K, OGATA K, TAKAI Y, MORI M. Immunoreaction of keratin, actin, S-100 protein and rat-EGF in duct-ligated rat salivary glands. J Oral Pathol Med 1992: 21, 214-220.

IKENO K, SAIKATSU S, UNO T, IKENO T. Effects of prolonged duct ligation of the rat salivary glands on the activity of trypsin-like protease. Archs Oral Biol 1988: 33, 613-615.

JAYE M, HOWK R, BURGESS W, RICCA GA, CHIU IM, RAVERA MW, O'BRIEN SJ, MODI WS, MAIAG T, DROHAN WN. Human endothelial cell growth factor: cloning, nucleotide sequence and chromosome localization. Science 1986: 233, 541-545.

JUNQUEIRA LC. Cytological, cytochemical and biochemical observations on secreting and resting salivary glands. Exp Cell Res 1950: 2, 327-338.

JUNQUEIRA LC, BIGNOLAS G, BRENTANI RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. Histochem J 1979: 11, 447-455.

JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. Histologia Básica. 4a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986, cap 12.

JUNQUEIRA LC, RABINOVITCH M. Reversibility of the phenomena induced by excretory duct ligation in the rat submaxillary gland. Texas Rep Biol Med 1954: 12, 94-97.

KAHARI VM, PELTONEN J, CHEN YQ, Uitto J. Differential modulation of basement membrane gene expression in human fibrosarcoma HT-1080 cells by transforming growth factor- β 1. Lab Invest 1991: 64, 807-818.

LINE SRP. Diversidade da expressão dos componentes da matriz extracelular do adenoma pleomórfico da parótida. São Paulo, 1989 (Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP).

LORBER M. Elastic fibers in the duct system of the rat submandibular salivary gland. Anat Rec 1992: 234, 335-347.

MARTINEZ-HERNANDEZ A, AMENTA PS. The basement membrane in pathology. Lab Invest 1983: 48, 656-677.

MARTINEZ IM, BYLUND DB, CASSITY N. Progressive secretory dysfunction in the rat submandibular gland after excretory duct ligation. Archs Oral Biol 1982: 27, 443-450.

MARTIN GR, TIMPL R. Laminin and other basement membrane components. Ann Rev Cell Biol 1987: 3, 57-85.

MONTES GS, JUNQUEIRA LCU. Biology of collagen. Rev Can Biol Exp 1982: 41, 143-156.

MURPHY RA, WATSON AY, METZ J, FORSSMANN WG. The mouse submandibular gland: an exocrine organ for growth factors. J Histochem Cytochem 1980: 28, 890-902.

NAGATO T, YOSHIDA H, YOSHIDA A, UEHARA Y. A scanning electron microscope study of myoepithelial cells in exocrine glands. Cell Tissue Res 1980: 209, 1-10.

NARAYANAN AS, PAGE RC, SWANSON J. Regulation by transforming growth factor- β in the presence of other inflammatory mediators. Biochem J 1989: 260, 463-469.

NEUFELD G, GOSPODAROWICS D. Basic and acidic fibroblast growth factors interact with the same cell surface receptors. J Biol Chem 1986: 261, 5631-5637.

OLSON L, AYER-LIEVRE C, EBENDAL T, SERGER A. Nerve growth factor-like immunoreactivities in rodent salivary glands and testis. Cell Tissue Res 1987: 248, 275-286.

PAULSSON M. Noncollagenous proteins of basement membranes. Coll Rel Res 1987: 7, 443-461.

PEARSE AGE. Histochemistry Theoretical and Applied. 4a Ed. New York: Churchill Livingstone, 1985, vol 2.

RADNOR CJP. Myoepithelium in the involuting mammary glands of the rats. J Anat 1972: 112, 355-365.

ROBBINS SL. Robbins Patologia Extrutural e Funcional. 4a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, cap 2.

SHAFFER WG, HYNE MK, LEVY BM. Tratado de Patologia Bucal. 4a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987, cap 3.

SHIBA R, HAMADA T, KAWAKATSU K. Histochemical and Electron microscopical studies on the effect of duct ligation of rat salivary glands. Archs Oral Biol 1972: 17, 299-309.

SHINOHARA M, OKA M, YAMADA K, HASHIMURA K, YUBA K, MORI M.
Immunohistochemical and electronmicroscopic studies of
obstrutive lesions in submandibular glands. J Oral Pathol Med
1992: 21, 370-375.

SIMSON JAV, SPICER SS, SETSER ME, MARTINEZ JR. Histochemistry and
ultrastructure of rat submandibular acinar cells. Effects of
chronic reserpine on secretion. Lab Invest 1978: 39, 157-166.

SPORN MB, ROBERTS AB, WAKEFIELD LM, ASSOIAN RK. Transforming growth
factor- β : biological function and chemical structure. Science
1986: 233, 532-534.

STANDISH SM, SHAFER WG. Serial histologic effects of rat
submaxillary and sublingual salivary glands duct and blood
vessel ligation. J Dent Res 1957: 36, 866-879.

TAKAI Y, ASANO K, CLEMENTE RP, MORI M. Lectin histochemical of
submandibular glands following duct-ligation in mice and rats.
J Oral Pathol 1985: 14, 740-749.

TAKAI Y, SUMITOMOS S, MORI M. Immunohistochemical demonstration of
keratin proteins in duct-ligated salivary glands of mice and
rats. J Oral Pathol 1986: 15, 16-20.

TAKAI Y, SUMIMOTO S, NODA Y, ASANO K, MORI M. Immunohistochemical observation of EGF and NGF in submandibular glands after duct ligation with or without testosterone administration. J Oral Pathol 1985: 14, 322-331.

TAMARIN A. Submaxillary gland recovery from obstruction. I- Overall changes and electron microscopic alterations of granular duct cells. J Ultrastruct Res 1971: 34, 276-287.

TAMARIN A. Submaxillary gland recovery from obstruction. II- Electron microscopic alterations of acinar cells. J Ultrastruct Res 1971: 34, 288-302.

TEN CATE AR. Histologia Bucal. Desenvolvimento, Estrutura e Função. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985, cap 17.

THOMPSON KL, ASSOIAN R, ROSNER MR. Transforming growth factor- β increases transcription of the genes encoding the epidermal growth factor receptor and fibronectin in normal rat kidney fibroblasts. J Biol Chemist 1988: 263, 19519-19524.

VARGA T, ROSENBLOOM J, JIMENEZ SA. Transforming growth factor- β causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNA in normal human dermal fibroblasts. Biochem J 1987: 247, 597-604.

VUORIO E, CROMBRUGGHE B. The family of collagen genes. Ann Rev Biochem 1990: 59, 837-872.

WAKEFIELD L, KIN SJ, GLICK A, WINOKUR T, COLLETTA A, SPORN M. Regulation of transforming growth factor- β subtypes by members of the steroid hormone superfamily. J Cell Sci 1990: Suppl 13, 139-148.

WATANABE I, KORIYANA Y, YAMADA E. High-resolution scanning electron microscopic study of the mouse submandibular salivary gland. Acta Anat 1992: 143, 59-66.