

ANDRÉA DE CASTRO DOMINGOS

*Avaliação morfológica e imunohistoquímica  
dos efeitos agudos da radiação gama em  
glândulas parótidas de ratos*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Grau de Doutor em Radiologia Odontológica. Área de Radiologia Odontológica.

Piracicaba  
2005

ANDRÉA DE CASTRO DOMINGOS

*Avaliação morfológica e imunohistoquímica  
dos efeitos agudos da radiação gama em  
glândulas parótidas de ratos*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Grau de Doutor em Radiologia Odontológica. Área de Radiologia Odontológica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Solange Maria de Almeida

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Costa

Prof. Dr. Frab Norberto Bóscolo

Prof. Dr. Mário Roberto Vizioli

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Solange Aparecida Caldeira Monteiro

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Solange Maria de Almeida

Piracicaba  
2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**  
Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

D713a Domingos, Andréa de Castro.  
Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos. / Andréa de Castro Domingos. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2005.

Orientador: Solange Maria de Almeida.  
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Glândulas salivares. 2. Laminina. 3. Radiobiologia.  
I. Almeida, Solange Maria de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em inglês: Morphological and immunohistochemical evaluation of the gamma radiation acute effects on rat parotid glands

Palavras-chave em inglês (*Keywords*): 1. Salivary glands. 2. Laminin. 3. Radiobiology

Área de concentração: Radiologia Odontológica

Titulação: Doutor em Radiologia Odontológica

Banca examinadora: Cláudio Costa, Frab Norberto Bóscolo, Mário Roberto Vizioli, Solange Aparecida Caldeira Monteiro, Solange Maria de Almeida

Data da defesa: 19/08/2005



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 19 de Agosto de 2005, considerou a candidata ANDRÉA DE CASTRO DOMINGOS aprovada.

PROFa. DRa. SOLANGE MARIA DE ALMEIDA

PROFa. DRa. SOLANGE APARECIDA CALDEIRA MONTEIRO

PROF. DR. CLÁUDIO COSTA

PROF. DR. FRAB NORBERTO BOSCOLO

PROF. DR. MARIO ROBERTO VIZIOLI

200604127

*Dedico este trabalho a Jesus Cristo, por ter me permitido realizar este grande sonho.*

*Aos meus pais, Antonio e Adelaide, e à minha irmã Fernanda, por terem suportado com alegria a dor da nossa separação, devotando-me todo amor e dedicação que a distância geográfica nunca conseguiu vencer.*

*Ao meu marido Ricardo, por sempre ter achado inadmissível aceitar as segundas opções que a vida nos oferece, incentivando-me a buscar aquilo que é melhor, mais pleno e realizador.*

## *Agradecimentos*

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Solange Maria de Almeida, por ter me dado o maior presente que alguém pode receber: confiança. Diz-se que podemos esquecer as palavras e feitos das pessoas, mas que nunca esqueceremos os sentimentos que elas nos proporcionaram. Jamais me esquecerei do voto de confiança que você, Solange, me creditou e que me permitiu realizar um grande sonho: ser professora universitária e pesquisadora. Agradeço sua amizade, sua disponibilidade, sua compreensão e seu carinho;

Ao Prof. Dr. Frab Norberto Bóscolo, pelo seu carisma, entusiasmo e espírito de liderança. É admirável sua capacidade de conciliar rigidez e amizade. Serei eternamente grata pela oportunidade recebida;

Ao Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, por ter me ensinado que o desenvolvimento profissional exige disciplina, dedicação e persistência. Sua conduta profissional representa um exemplo a ser seguido. Admiro profundamente seu comportamento ético e seu senso de justiça;

Ao Prof. Dr. Mário Roberto Vizioli, a quem incomodei tantas vezes com minhas inúmeras dúvidas a respeito da análise de minhas lâminas. Obrigada por sempre me atender com serenidade, dedicação e disponibilidade. Sua cultura e sabedoria são admiráveis;

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gláucia, por ser extremamente solícita e prestativa. Obrigada por seu envolvimento sincero com as dificuldades apresentadas por todos nós que decidimos ingressar no árduo caminho do aprendizado da Bioestatística;

Aos professores Ronaldo Luiz Vitório, Paulo Cobellis Gomes, Gilberto Tadeu Reis da Silva, à querida irmã Luíza e a todos os alunos e funcionários da Faculdade Santa Marcelina, por terem me acolhido de braços abertos;

À Silvana Pasetto, amiga imprescindível na realização deste trabalho. Agradeço sua gratuidade, que te levou tantas vezes a deixar de realizar o seu trabalho para que o meu pudesse ser finalizado. Seu coração é imenso e foi uma honra ter aprendido tanto contigo;

À minha grande amiga Maria Luíza dos Anjos Pontual, por ter realizado ao meu lado cada etapa deste trabalho. Trabalhamos muitas vezes à noite e nos finais de semana, sofremos juntas a perda de muitas lâminas e a agonia inicial por não conseguir uma padronização adequada para as reações de imunohistoquímica. Nossos laços de amizade foram se estreitando a cada

dia e, juntamente com a finalização desta tese, podemos celebrar o surgimento de uma amizade verdadeira e duradoura;

Ao meus fiéis amigos Nilson Pena Neto Segundo e Flávio Luiz Viero, “baiano e candango”, de quem tenho tantas lembranças maravilhosas: os regimes malucos, as churrascarias, o restaurante japonês, as infindáveis conversas, as risadas escandalosas. Vocês são amigos para toda a vida;

Às minhas queridas amigas Juliana Moura, Blanca Liliana Torres León, Noeli Boscatto e Priscila Serrano, por dividirem comigo uma casa abençoada, na qual vivenciamos tantos momentos maravilhosos;

Aos meus inesquecíveis amigos Janaína Dantas, Karina Devito, Deborah Queiroz de Freitas, Patrícia Vizioli, Márcia Spinelli, Sérgio Lúcio Pereira de Castro Lopes, Flávia Maria de Moraes Ramos e Andréa dos Anjos Pontual, que com suas diferentes personalidades, entraram sorrateiramente em minha vida e se instalaram definitivamente;

Ao meus amigos Rosana Aramaki Tanaka, Ana Isabel Ortega, Laura Ojeda, André, Mauro Martins, Rafael Navarro, Fabrício Tuji, Mariliani Chicarelli, Ana Sílvia Ganzerli, Melissa Damian, Fábio Guedes, Juliana Araújo Bittar, Adriana Dibo, Etienne Romanelli, Lúcio Mitsuo Kurita, João Batista Sobrinho do Nascimento Neto, Luciane Farias de Araújo, Ricardo Matheus, Rívea Inês Ferreira, Cláudia Haiter e Osmar Vasconcelos, por dividirem .comigo esta caminhada em direção a um sonho que temos em

comum. Finalizo, agora, esta etapa, mas nossa amizade e lembranças serão eternas;

Às queridas amigas do laboratório de histologia Eliene, Cidinha e Ivani, que nunca mediram esforços para me ajudar;

Aos amigos da radiologia Raquel, Waldeck, Antônio, Fernando, Giselda, Bruna e Roberta, pela amizade e cooperação;

A todos os funcionários e alunos da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, por terem contribuído direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

*Se um dia tiveres que escolher  
entre o mundo e o amor...  
Lembre-se: se escolheres o  
mundo ficarás sem o amor, mas  
se escolheres o amor, com ele  
conquistarás o mundo."*

*Albert Einstein*

# SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	3
2 REVISÃO DA LITERATURA	6
3 PROPOSIÇÃO	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
5 RESULTADOS	45
6 DISCUSSÃO	67
7 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS	79
ANEXO	87

## **RESUMO**

O objetivo do presente trabalho foi avaliar morfológica e imunohistoquimicamente os efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos. Vinte e um animais foram divididos em 2 grupos experimentais, controle e irradiado, sendo o primeiro grupo composto por animais não expostos à radiação e o segundo formado por animais que tiveram a região de cabeça e pescoço irradiada com uma dose única de 15 Gy. As glândulas parótidas dos animais irradiados foram removidas nos tempos 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após sua exposição e, posteriormente, submetidas ao processamento tecidual por meio de métodos imunohistoquímicos, para a avaliação da proteína laminina, e pela coloração por hematoxilina-eosina, para avaliação morfológica. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre a intensidade de marcação da laminina do grupo controle e do grupo irradiado. Por outro lado, verificou-se o espessamento e a presença de conglomerados de laminina nas membranas basais acinares dos subgrupos irradiados, tendo sido detectadas diferenças significativas entre o grupo controle e o subgrupo 72 horas ( $p = 0,0315$ ). A análise morfológica revelou a presença de figuras de necrose nuclear, vacuolizações e severa atrofia dos ácinos, especialmente nos grupos 8 e 12 horas. O início do processo de reparo se deu no tempo 24 horas, mas não foi observada recuperação completa nos últimos tempos avaliados. Os resultados sugeriram que os efeitos deletérios da radiação ionizante podem ser um dos fatores responsáveis pelo remodelamento da matriz extracelular.

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to evaluate the morphological and immunohistochemical characteristics of gamma radiation acute effects on rat parotid glands. Twenty-one animals were divided into two groups: control and irradiated ones. The former was composed by non-exposed animals, while the latter was formed by rats which had their necks and heads irradiated with 15 Gy. The parotid glands were excised at 4, 8, 12, 24, 48 and 72 hours after irradiation and, then, were submitted to immunohistochemical methods, for the evaluation of the laminin, and to hematoxylin-eosin staining, for the analysis of the morphology. Laminin staining intensities between irradiated and non-irradiated salivary glands showed no statistically significant differences. Nevertheless, it was observed that laminin thickening and laminin-positive conglomerations demonstrated significant differences between the control and the 72-hour-subgroup ( $p= 0,0315$ ). The morphological analysis revealed the presence of vacuolation, acinar atrophy and necrosis, especially by 8 and 12 hours after irradiation. Regeneration of the tissue started by 24 hours, but it was not complete at 48 and 72 hours after exposure. The results showed that radiation may be one of the factors that induce extracellular matrix remodeling.

## **1 INTRODUÇÃO**

A radioterapia de tumores que acometem a região de cabeça e pescoço pode provocar sérias alterações morfológicas e funcionais nas estruturas presentes no campo irradiado. Mesmo quando as neoplasias não envolvem diretamente as glândulas salivares maiores, seu tamanho e localização bilateral tornam inevitável sua inclusão na área a ser irradiada. Conseqüentemente, estas glândulas tornam-se sujeitas aos mais diversos efeitos deletérios das radiações ionizantes, sendo possível observar a presença de edema, sensibilidade e redução do fluxo salivar logo após as primeiras sessões do tratamento.

Os efeitos colaterais da radioterapia comumente são transitórios. Contudo, se um grande volume de tecido glandular for irradiado, uma quantidade significativa de pacientes apresentará xerostomia permanente. Após uma dose de 1000 rad, a saliva torna-se viscosa e aderente à mucosa e aos dentes, perdendo sua propriedade de lubrificação. Este fato decorre da perda de atividade da secreção serosa (Baker, 1982).

Dentre as glândulas salivares maiores, as glândulas parótidas são as mais radiosensíveis, enquanto as submandibulares e as sublinguais são relativamente radorresistentes. A maior radiosensibilidade das parótidas pode estar relacionada ao fato de estas glândulas serem constituídas exclusivamente por células serosas, ao passo que as submandibulares são mistas (células

## *Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

---

serosas e células mucosas) e as sublinguais são formadas quase unicamente por células mucosas (Stephens *et al.*, 1989a)

As rápidas respostas clínicas decorrentes da irradiação de glândulas salivares indicam a crescente necessidade de se compreender mais profundamente os mecanismos de injúria das mesmas. Enquanto as alterações morfológicas, funcionais e ultra-estruturais estão relativamente bem documentadas, o conhecimento a respeito dos efeitos das radiações ionizantes na membrana basal permanece escasso.

A membrana basal é uma estrutura especializada da matriz extracelular. Ela é encontrada subepitelialmente, formando uma camada entre as células epiteliais e o tecido conjuntivo, subendotelialmente e ao redor de algumas células mesenquimais. Como funções da membrana basal, têm-se a participação na manutenção da estrutura tecidual, no controle das trocas de fluidos e substratos, assim como na regulação do crescimento e diferenciação celulares. Por meio da microscopia eletrônica, três camadas podem ser diferenciadas: a lâmina lúcida, a lâmina densa e, adjacente às duas primeiras, um fino filamento fibrorreticular que, além de pertencer à membrana basal, também apresenta outras estruturas da matriz extracelular como o colágeno intersticial (Bartel-Friedrich *et al.*, 1999).

A heterogeneidade da membrana basal é indiscutível. É composta por diversas glicoproteínas, sendo seus principais componentes representados pela laminina, pelo colágeno tipo IV, que provê estabilidade à membrana, e pela proteoglicana sulfato de heparana. Esta última desempenha um papel importante na interação entre a matriz extracelular e as células, promovendo o controle da

## *Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

filtração de fluidos. A laminina, por sua vez, é o componente mais abundante da membrana basal, atuando de maneira significativa na migração, adesão e diferenciação das células (Bartel-Friedrich *et al.*, 1999).

A destruição da membrana basal pode ser sinal de um crescimento tumoral invasivo (D' Ardenne, 1989). Por este motivo, um número crescente de estudos a respeito dos efeitos deletérios das radiações ionizantes sobre esta estrutura têm sido realizados. Entretanto, existe uma escassez de trabalhos abordando particularmente as alterações apresentadas pelas membranas basais de glândulas salivares irradiadas. Em decorrência deste fato, decidiu-se avaliar imunohistoquimicamente os efeitos da radiação gama sobre a laminina das membranas basais de ácinos, ductos, arteríolas, vênulas, capilares e fibras nervosas de glândulas parótidas de ratos. Somando-se a esta análise, também foram verificadas as alterações morfológicas apresentadas por estas estruturas 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após a irradiação.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Glândulas salivares**

As glândulas salivares são glândulas exócrinas cujas secreções fluem para a cavidade bucal. Há três pares de glândulas salivares grandes, localizadas extraoralmente, conhecidas como glândulas salivares maiores e numerosas glândulas menores, largamente distribuídas na mucosa e submucosa da cavidade bucal. Tanto as glândulas maiores como as menores são constituídas por elementos parenquimatosos, revestidos e suportados por tecido conjuntivo. Este forma a cápsula em torno das glândulas, divide os ácinos e ductos em lobos e lóbulos e é repleto de nervos, vasos sanguíneos e linfáticos, responsáveis pelo suprimento glandular (Hand, 1989).

As unidades secretoras terminais são constituídas por um arranjo de células serosas, mucosas e mioepiteliais arranjadas em ácinos e ductos. As células serosas são especializadas na síntese, no armazenamento e na secreção de proteínas. As células mucosas, à semelhança das primeiras, também sintetizam, armazenam e secretam proteínas. Entretanto, suas secreções possuem pouca ou nenhuma atividade enzimática, servindo principalmente para a lubrificação e proteção dos tecidos bucais. As células mioepiteliais, por sua vez,

são consideradas células contráteis que ajudam no esvaziamento da secreção contida nos ácinos e ductos (Hand, 1989).

O sistema de ductos das glândulas é formado pela confluência de pequenos ductos (intercalares) para aqueles de calibre progressivamente maior (estriados e excretorios). Sua principal função é transportar a saliva primária, secretada pelos ácinos, para a cavidade bucal. Os ductos, porém, não são apenas condutores passivos, uma vez que secretam e reabsorvem eletrólitos e proteínas, participando, portanto, ativamente da produção e modulação da saliva (Hand, 1989).

## **2.2 Radiossensibilidade das glândulas salivares**

Em 1968, Rubin & Casarett dividiram os tecidos em cinco categorias, de acordo com sua radiossensibilidade: tecidos vegetativos intermitóticos, tecidos intermitóticos em diferenciação, tecidos conjuntivos multipotenciais, tecidos pós-mitóticos reversíveis e tecidos pós-mitóticos fixos. As células acinares e os ductos das glândulas salivares foram posicionados na categoria dos tecidos pós-mitóticos reversíveis, constituindo, portanto, o segundo grupo mais radiorresistente da classificação. Segundo os autores, suas células realizam mitose em condições anormais, quando devidamente estimuladas por algum dano ou destruição.

A radiossensibilidade de glândulas submandibulares foi objeto de estudo de Abok *et al.* (1984), que se mostraram interessados por sua composição mista. Os autores observaram que 96 horas após serem irradiadas com 50 Gy de

## *Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

radiação X, as células serosas apresentavam-se degeneradas e mortas, ao passo que as células mucosas mostravam-se normais. Com base nesta observação, os autores sugeriram que os metais presentes nos grânulos das células serosas potencializavam os efeitos da radiação, provocando ruptura das membranas destes grânulos e um conseqüente extravasamento de enzimas proteolíticas. Estas, por sua vez, eram diretamente responsáveis pela autólise e morte celular. Esta afirmação foi reforçada pela constatação de que as células serosas tornavam-se mais radiorresistentes aos serem desgranuladas pela ação de agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos e mais radiosensíveis sob a ação da atropina, antagonista colinérgico que aumenta a quantidade de grânulos. Diante dos resultados verificados, foi estabelecida uma relação direta entre a maior radiosensibilidade das células serosas e a presença dos grânulos de secreção.

Stephens *et al.* (1989a) realizaram uma revisão da literatura a respeito da patogênese das injúrias causadas pela radiação às glândulas salivares. Relataram que as células serosas apresentam grande radiosensibilidade e que a morte destas células é decorrente da peroxidação lipídica de suas membranas. Mencionaram também, que as figuras de necrose nuclear presentes em células irradiadas, como picnoses, cariólises e cariorrexes, são características de morte celular por apoptose.

Um estudo utilizando culturas de células de glândulas parótidas de macacos foi realizado por Stephens *et al.* (1989b), com a finalidade de testar a radiosensibilidade de células serosas *in vitro*. Os autores enriqueceram o meio de cultura celular com baixas doses de isoproterenol, uma droga  $\beta$ -adrenérgica que causa a desgranulação das células serosas, e o irradiaram com doses de 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 e 15 Gy de radiação gama. Foi observada a morte de inúmeras

## *Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

---

células e um grande número de aberrações nucleares. Os autores concluíram que a semelhança entre os resultados obtidos nesse estudo *in vitro* com os de outros trabalhos realizados anteriormente *in vivo* elimina a possibilidade de as células serosas terem sido mortas em função de respostas inflamatórias ou vasculares, bem como reforça a concepção de que a radiação tem efeito direto sobre as células serosas, provocando alterações em suas membranas.

Visando compreender o processo regenerativo do tecido glandular, a atividade proliferativa de diferentes compartimentos epiteliais foi medida, em função do tempo, por Peter *et al.* (1994a). Ratos machos Wistar tiveram suas glândulas parótidas e submandibulares irradiadas com dose única de 15 Gy de radiação X. Em ambas as glândulas, a radiação causou atraso no ciclo celular ou até mesmo morte das células no 1º dia após a irradiação. Três dias após os animais terem sido irradiados, foi verificada proliferação celular nos ductos intercalares, com maior intensidade para as glândulas parótidas, ao passo que no 6º dia os ácinos também passaram a apresentá-la. O início da proliferação celular dos ductos estriados foi observado no 6º dia para as glândulas parótidas e no 10º dia para as glândulas submandibulares. Os resultados desse estudo demonstraram que após uma dose de 15 Gy de radiação X, a proliferação celular ocorre em todos os compartimentos epiteliais das glândulas salivares. Os autores concluíram que a maior intensidade da atividade proliferativa das células presentes nos ductos intercalares das glândulas parótidas pode ser explicada pela maior severidade dos danos sofridos pelas mesmas, em função de sua maior radiosensibilidade.

A hipótese de que a radiosensibilidade glandular e a presença de grânulos de secreção tivessem uma relação direta levou Peter *et al.* (1994b) a

## *Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

provocarem a desgranulação de células acinares, por meio da administração de isoproterenol, previamente à irradiação do tecido glandular. A dose local de 15 Gy de radiação X induziu alterações morfológicas comparáveis nas glândulas parótidas e submandibulares dos ratos irradiados, sendo que já no 1º dia após a irradiação foram observadas aberrações nucleares nos ácinos e ductos intercalares, assim como a depleção dos grânulos das células serosas. Os autores concluíram que a desgranulação promovida pelo isoproterenol não se mostrou eficaz na proteção do tecido glandular e negaram uma relação direta entre a presença dos grânulos de secreção e a maior radiosensibilidade das glândulas salivares.

Ainda intrigados a respeito do papel desempenhado pelos grânulos de secreção em glândulas salivares irradiadas, Peter *et al.*, em 1995, administraram 5 mg/ kg de isoproterenol em ratos, previamente à sua irradiação com dose única de 15 Gy de radiação X. As salivas de suas glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais foram coletadas antes e de 1 a 10 dias após os animais terem sido irradiados. Foi observado que as glândulas parótidas, ao contrário das glândulas submandibulares e sublinguais, apresentaram-se funcionalmente melhores após o pré-tratamento com isoproterenol. Os autores sugeriram que a melhora do fluxo salivar das glândulas parótidas ocorreu devido ao estímulo proliferativo provocado pelo isoproterenol nas células acinares serosas, não podendo ser atribuída aos efeitos da desgranulação. Foi sugerido também, que a falta de proteção apresentada pelas glândulas submandibulares e sublinguais provavelmente estivesse relacionada à menor intensidade de proliferação de células mucosas estimuladas por isoproterenol.

## *Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

Sabendo que as alterações funcionais produzidas pela radiação em glândulas salivares irradiadas possuíam um mecanismo ainda desconhecido, Nagler *et al.*, em 1997, decidiram estudar o papel dos íons ferro e cobre presentes nos grânulos de secreção. Ratos machos tiveram suas cabeças e pescoços irradiados com uma dose única de 15 Gy de radiação X e foram sacrificados 2 meses após a irradiação. O tratamento com ciclotidina, administrado 90 minutos antes da irradiação, provocou a desgranulação completa das glândulas parótidas e promoveu intensa proteção contra os efeitos deletérios da radiação. Por outro lado, a pilocarpina promoveu a desgranulação parcial das glândulas parótidas e apenas 13% de proteção. Nenhuma das drogas foi capaz de causar desgranulação das células mucosas das glândulas submandibulares e estas apresentaram severos danos funcionais. Foi observado um aumento significativo na quantidade de íons ferro e cobre na saliva produzida pelas glândulas parótidas, uma vez que a desgranulação fez com que estes íons migrassem dos grânulos de secreção para a saliva. De acordo com os autores, ao contrário do zinco e do manganês, o ferro e o cobre são metais capazes de promover reações de oxirredução e catalizar a formação de radicais livres, estando, portanto, diretamente relacionados à radissensibilidade das células serosas.

O enigmático mecanismo da formação de injúrias em glândulas salivares irradiadas foi revisado por Nagler, em 2002. O autor afirmou que os íons cobre e ferro, que acreditava-se estarem contidos no interior dos grânulos de secreção, podem estar presentes em regiões próximas ao DNA. Ao promoverem reações de oxirredução, estes íons produzem radicais livres que, por sua vez, lesam as membranas celulares (por meio da peroxidação de seus lipídios) ou provocam danos ao DNA. Desta forma, quando as células acinares precisam entrar em mitose para promover a reparação do parênquima glandular, sua morte

torna-se inevitável. O autor concluiu que o DNA é um alvo muito radiosensível em glândulas salivares irradiadas.

## **2.3 Alterações provocadas pela radiação ionizante nas glândulas salivares**

### **2.3.1 Alterações morfológicas e ultra-estruturais**

Berdjis, em 1960, ao estudar 25 ratos fêmeas e 25 ratos machos expostos a uma dose de 500 rad de radiação X de corpo todo, afirmou que a radiação afeta ambos os componentes das glândulas submandibulares, ácinos e ductos. Em seu estudo, foi observado que os ductos presentes nas glândulas dos ratos do sexo feminino sofreram um aumento de diâmetro e suas células epiteliais tornaram-se hipertrofiadas. Além disto, foi verificada a presença de atrofia acinar em ambos os sexos. Este autor afirmou acreditar que os ratos do sexo feminino apresentaram um maior número de alterações devido a um desequilíbrio hormonal provocado pela irradiação de seus ovários.

Em 1970, Phillips submeteu 31 ratos a uma dose única de 21 Gy de radiação X e os sacrificou após 5 minutos e 1, 2, 4, 8, 16 e 42 dias depois de sua irradiação. Uma redução no tamanho das células acinares (atrofia), sua necrose e a presença de alterações nucleares foram observadas já no 1º dia após os animais

## *Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

terem sido irradiados, tendo atingido sua expressão máxima no 4º dia após a irradiação. No 8º e 16º dias, muitas células acinares readquiriram seu tamanho normal e outras tornaram-se hipertrofiadas, embora as degenerações nucleares continuassem presentes. Após o 42º dia, no entanto, as células acinares tornaram-se novamente atróficas e seus contornos ficaram tão mal delimitados que causavam a impressão de que somente os núcleos, os quais continuavam apresentando alterações degenerativas, haviam permanecido. O autor concluiu que as alterações morfológicas sofridas por glândulas salivares irradiadas poderiam ser divididas em três fases: uma fase aguda de atrofia e necrose (1º ao 7º dia), seguida por uma fase de reparação (8º ao 16º dia) e finalizada por uma nova fase de atrofia (após o 16º dia), contudo com danos menos severos que os encontrados na primeira fase.

Em 1974, Sholley *et al.* realizaram um estudo com a intenção de estabelecer uma possível relação entre as alterações microvasculares provocadas pela radiação X e o desenvolvimento de danos nos parênquimas de glândulas parótidas irradiadas. Vinte e quatro ratos foram irradiados com 1600 R e sacrificados imediatamente e 6 horas, assim como nos dias 1, 2, 3, 5, 6 e 8 seguintes à irradiação. Foram administrados marcadores vasculares em 13 destes animais, de 15 a 60 minutos antes do sacrifício. Quarenta e oito animais foram expostos a 6400 R e sacrificados imediatamente, 6, 18 horas e 1, 2, 3, 4, 6 e 8 dias após terem sido irradiados. Os marcadores foram injetados nos animais deste último grupo de 10 a 90 minutos antes de sua morte. Ambas as doses utilizadas não causaram injúrias severas na microvascularização, embora tenha sido verificada, ultra-estruturalmente, a presença de degeneração citoplasmática e necrose das células acinares. Os ductos estriados e intercalares, por sua vez, permaneceram inalterados durante todas as fases do estudo, ao passo que os

## *Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

ácinos apresentaram tamanho reduzido na microscopia de luz. Os autores concluíram que as injúrias microvasculares não são responsáveis pelo surgimento de alterações nos ácinos de glândulas parótidas irradiadas.

Em 1976, Sasaki realizou um estudo em glândulas salivares de ratos estimuladas por isoproterenol e a droga foi administrada 10 dias, 1 e 3 meses após a exposição dos animais a uma dose única de 1000 rad de radiação gama. O grupo controle não foi irradiado, recebendo somente isoproterenol. Todos os animais foram submetidos a três injeções de timidina tritiada, com intervalos de 4 horas entre elas e início 22 horas após a administração do isoproterenol, e foram sacrificados em tempos diferentes após a terceira injeção. As glândulas salivares do lado direito foram utilizadas para a determinação da atividade específica do DNA, enquanto as do lado esquerdo foram submetidas à autorradiografia. Para o grupo que recebeu isoproterenol 10 dias após a irradiação, os resultados indicaram que a atividade específica do DNA das glândulas parótidas era idêntica à do grupo controle 30 minutos após a última injeção de timidina tritiada, mas decresceu cerca de 75% em 5 dias e após este período, permaneceu tão estável quanto a do controle. A redução da atividade do DNA em glândulas submandibulares apresentou-se semelhante à observada nas glândulas parótidas. O autor afirmou que esta redução decorreu da degradação do novo DNA sintetizado. A autorradiografia revelou que somente 50% das células inicialmente marcadas permaneceram por vários dias nas glândulas parótidas irradiadas. Quando o isoproterenol foi administrado de 1 a 3 meses após a irradiação, não foi observado um decréscimo de atividade do DNA que diferisse estatisticamente do grupo controle, apesar da visível degeneração apresentada pelas células acinares. A partir dos resultados desse trabalho, foi possível concluir que 1000 rad de radiação gama são capazes de produzir um dano latente letal em metade das

## *Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

células acinares, sendo que este dano só se manifesta quando estas células são estimuladas a sintetizar DNA ou realizar mitose.

Ratos machos Wistar receberam uma dose única de 2000, 2500 ou 3000 rad de radiação gama na região de suas glândulas submandibulares, em um trabalho realizado por Chomette *et al.*, em 1981. As alterações induzidas pela radiação atingiram sua intensidade máxima no 6º dia e incluíram a presença de autofagossomos e edema das mitocôndrias. A microscopia de luz mostrou a presença de pequenas áreas de necrose na região dos ductos estriados e infiltrado inflamatório intersticial moderado. Foi observado que 45 dias após a irradiação, as células acinares e os ductos ainda não haviam recuperado sua estrutura normal. As terminações nervosas também mantinham-se alteradas, podendo ser identificados edema dos axônios, lise dos neurofilamentos e um decréscimo no número de vesículas sinápticas. Os autores sugeriram que esta disfunção neurosecretória provavelmente tenha sido responsável pela persistência dessas anomalias quase dois meses após a irradiação.

Alterações agudas apresentadas por glândulas salivares irradiadas foram investigadas por El-Mofty & Kahn, em 1981. Ratos fêmeas Wistar foram irradiados com uma dose única de radiação X variando de 200 a 2000 rad. Foi verificado que as células serosas das glândulas parótidas mostraram-se sensíveis a todas as dose utilizadas e apresentaram uma quantidade significativa de células necrosadas entre 12 e 24 horas após a irradiação. Por outro lado, os ductos e as células mucosas presentes nas glândulas submandibulares e sublinguais mostraram-se resistentes em todos os tempos e doses utilizadas nesse estudo. As membranas celulares apresentaram-se danificadas nas primeiras 2 horas após a irradiação e os autores concluíram que elas possam constituir o alvo primário das

## *Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

radiações ionizantes, seja por meio da peroxidação de seus lipídios ou pela ação direta da radiação sobre suas proteínas.

Stephens *et al.*, em 1986, afirmaram que ao contrário das alterações crônicas, a histomorfologia das alterações agudas apresentadas por glândulas salivares irradiadas não era bem conhecida. Por conseguinte, decidiram avaliar biópsias de glândulas parótidas de 18 macacos rhesus adultos, submetidos a doses únicas de radiação gama que variaram de 2,5 a 15 Gy, visando determinar suas alterações iniciais. Nas primeiras 6 horas após os animais terem sido expostos, os autores verificaram perda de contato entre os ácinos, presença de intenso exsudado inflamatório neutrofílico e o deslocamento dos núcleos da região apical para o centro das células. A presença de figuras de necrose nuclear (picnoses, cariólises e cariorrexes) e de vacúolos nas células serosas foi observada nos tempos 12 e 24 horas, ao passo que a necrose do epitélio dos ductos pôde ser constatada 24 e 48 horas após os animais terem sido irradiados com doses de 10; 12,5 e 15 Gy. A expressão máxima das alterações radioinduzidas ocorreu no tempo 24 horas. Os autores concluíram que apesar de as células acinares e ductais das glândulas parótidas serem bem diferenciadas, podem expressar danos letais poucas horas após sua irradiação.

Em 1991, uma dose única de 15 Gy de radiação X foi utilizada por Vissink *et al.* com o objetivo de verificar alterações morfológicas e ultra-estruturais em glândulas submandibulares de ratos. A microscopia de luz revelou a presença de núcleos picnóticos e vacuolizações das células mucosas no 3<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> dias após a irradiação. A microscopia eletrônica, por sua vez, mostrou a desgranulação das células dos ductos convolutos 3 horas e 1 dia após a irradiação, assim como distensão das cisternas dos retículos endoplasmáticos rugosos, degeneração das

## *Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

mitocôndrias e vacuolizações citoplasmáticas nas células serosas e mucosas no 3º dia após os animais terem sido expostos à radiação. A presença de infiltrado inflamatório era quase inexistente. Os autores concluíram que a expressão máxima dos efeitos deletérios da radiação se deu no 3º dia, sendo que no 10º dia já era possível observar-se uma reparação parcial do tecido glandular irradiado.

Um estudo visando correlacionar a apoptose provocada pela radiação em glândulas salivares e suas alterações funcionais foi realizado por Paardekooper *et al.*, em 1998. Glândulas parótidas e submandibulares de ratos foram irradiadas com doses de até 25 Gy de radiação X e as alterações morfológicas foram verificadas até o 6º dia após os animais terem sido irradiados. Nas primeiras 5 a 7 horas após a irradiação, foi observada a presença de células apoptóticas, ou seja, células atróficas e apresentando condensação de cromatina. Em um segundo momento, de 12 a 18 horas após a irradiação, houve um decréscimo no número de células com apoptose, sendo que sua quantidade voltou a aumentar no tempo 24 horas. O declínio do segundo pico de células apoptóticas se deu no tempo 36 horas e no 6º dia elas já estavam praticamente ausentes. Durante os 6 dias de realização do experimento, não foi verificada a presença de infiltrado inflamatório neutrofílico. Os autores concluíram que a apoptose provocada pela radiação não pode ser considerada a causa das alterações funcionais apresentadas por glândulas salivares irradiadas.

Tuji, em 2004, realizou um estudo com a finalidade de avaliar a ação radioprotetora do selenito de sódio, por meio da análise ultra-estrutural de células acinares de glândulas parótidas de ratos. Para isto, 57 ratos foram divididos em quatro grupos: controle; irradiado, cujos animais foram submetidos a 15 Gy de radiação gama em dose única; selênio irradiado, no qual administrou-se o selenito

## *Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

de sódio 24 horas antes da irradiação e o grupo selênio, no qual foi administrado 0,5 mg/kg de peso corpóreo da referida substância. Após 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas da irradiação, todos os animais foram sacrificados e tiveram suas glândulas parótidas direitas removidas. Os resultados obtidos mostraram que a radiação provocou alterações celulares desde o primeiro grupo analisado (4 horas), especialmente nas mitocôndrias e nos grânulos de secreção, sendo também observadas alterações nucleares. O início do processo de reparo foi observado 24 horas após os animais terem sido irradiados, havendo uma melhora da organização celular nos demais tempos analisados, porém sem a completa reparação até o último tempo avaliado. O autor concluiu que o selenito de sódio mostrou-se um radioprotetor eficaz, visto que todos os grupos avaliados apresentaram resultados significativamente melhores em relação ao grupo irradiado sem proteção.

Em 2005, Pontual realizou um estudo que também teve a finalidade de avaliar a ação radioprotetora do selenito de sódio, contudo em células secretoras de glândulas submandibulares de ratos. Foram utilizados 57 animais subdivididos em quatro grupos experimentais: controle, irradiado, selênio e selênio irradiado. Os animais pertencentes aos grupos irradiado e selênio/irradiado foram submetidos a 15 Gy de radiação gama, na região de cabeça e pescoço. Nos animais correspondentes aos grupos selênio e selênio/irradiado foi administrado 0,5 mg/kg de peso de selenito de sódio, por via intraperitoneal, 24 horas antes da irradiação e nos grupos controle e irradiado injetou-se solução salina. As glândulas submandibulares foram removidas 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após a irradiação para a análise ultra-estrutural das células acinares. Os resultados mostraram que a radiação causou danos a partir do tempo 4 horas, especialmente às células secretoras serosas. Os danos intensificaram-se até o período de 12 horas,

havendo início do processo de reparo nas 24 horas após a irradiação e melhor organização com 48 e 72 horas, sem reparação completa, entretanto, mesmo no último tempo avaliado. Foram observadas vacuolizações, lise de inclusões citoplasmáticas e alterações nucleares. O grupo selênio/irradiado apresentou maior semelhança com o grupo controle que os demais grupos tratados em todos os tempos estudados, o que levou a autora a concluir que o selenito de sódio possui ação radioprotetora nas células secretoras das glândulas submandibulares.

### **2.3.2 Alterações fisiológicas**

Sodicoff *et al.*, em 1977, mostraram-se preocupados com os efeitos da radiação X na amilase salivar, importante enzima responsável pela digestão do amido e outros polissacarídeos. Visando comprovar possíveis alterações nesta enzima, os autores expuseram cabeças de ratos a 400, 800, 1600 e 6400 R. A concentração de amilase não diferiu significativamente da apresentada pelo grupo controle para os grupos 400 e 800 R. Contudo, sua redução foi significativa para o grupo 1600 R no 4º dia após a irradiação, sendo ainda mais evidente no 7º dia. O grupo 6400 R, por outro lado, apresentou um decréscimo acentuado de amilase já no 2º dia, embora no 7º dia sua concentração fosse semelhante a do grupo 1600 R. No 8º dia após a irradiação, o índice de amilase era normal em todos os grupos irradiados. É de extrema importância salientar que os animais irradiados apresentaram diminuição no tamanho e peso de suas glândulas parótidas, assim como alterações de seus hábitos alimentares. Este fato levou os autores a submeterem um grupo de animais não-irradiados a uma alimentação mais restrita, com o intuito de saber se a redução na concentração de amilase salivar era

## *Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

resultante da menor quantidade de alimentos ingerida pelos ratos irradiados. Os animais não-irradiados também apresentaram um decréscimo nos níveis de amilase e os autores concluíram que este decréscimo era decorrente de uma ação combinada dos efeitos diretos (sobre a enzima) e indiretos (causando alterações nos hábitos alimentares) da radiação.

Os efeitos da radiação na amilase salivar de glândulas parótidas também foram abordados em um estudo realizado por Balzi *et al.*, em 1979, utilizando 139 ratos fêmeas expostos a 800 rad de radiação gama de corpo todo. Foi observada uma redução na quantidade desta enzima nos intervalos iniciais após a irradiação, seu aumento após 24 horas e a ocorrência de sua expressão máxima no tempo 74 horas. Os autores sugeriram que esses resultados possam ter sido provocados pelo efeito direto da radiação nas glândulas parótidas. Outra possível explicação corresponde ao provável surgimento de uma síndrome gastrointestinal que, por sua vez, pode ter acarretado uma ingestão reduzida de alimentos e ter sido responsável pela grande quantidade de amilase armazenada nas parótidas.

Anderson *et al.*, em 1981, realizaram um estudo com a finalidade de determinar a patofisiologia das glândulas parótidas de pacientes submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço. Durante seis semanas, 6 pacientes receberam radiação de nêutrons duas vezes por semana e radiação gama ( $\text{Co}^{60}$ ) três vezes por semana. Suas salivas foram coletadas semanalmente, desde um período prévio ao tratamento até o seu término. Foi verificado um decréscimo do fluxo salivar, juntamente com uma redução do pH e da concentração dos íons bicarbonatos. Por outro lado, a radiação não produziu alterações significativas nas proteínas e na concentração da amilase salivar. A concentração de cloreto de

## *Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

sódio, por sua vez, aumentou transitoriamente logo após a irradiação, mas rapidamente decresceu aos níveis encontrados antes de os animais terem sido irradiados, uma vez que o mecanismo de reabsorção de sódio realizado pelos ductos permaneceu inalterado. Os autores enfatizaram a radiorresistência dos ductos em detrimento da alta radiosensibilidade dos ácinos.

Akita *et al.*, em 1984, decidiram avaliar o efeito da radiação gama na atividade enzimática da superóxido dismutase e nos níveis de peróxidos de lipídio de glândulas salivares de ratos. Estes animais foram irradiados na região de cabeça e pescoço com doses únicas variando de 3 a 24 Gy de radiação gama. A atividade da superóxido dismutase apresentou-se reduzida nas glândulas parótidas e submandibulares no 3º dia após a irradiação, tornando-se ainda menor no 7º dia, recuperando-se, contudo, a partir do 14º dia. Foi observado que a atividade enzimática cresceu gradualmente no plasma sangüíneo e atingiu um valor constante com a dose de 6 Gy. Este resultado indicou que houve o extravasamento da superóxido dismutase dos tecidos para o plasma, uma vez que, sob condições normais, não se detecta nenhuma atividade enzimática no plasma sangüíneo. Os autores sugeriram que a peroxidação lipídica das membranas glandulares, causada pelos efeitos deletérios da radiação, pode ter sido a grande responsável pelo extravasamento da superóxido dismutase.

A composição e taxa de secreção de amostras de saliva produzidas por glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais de ratos irradiados foram objetos de estudo de Vissink *et al.*, em 1990. Os animais foram expostos a doses únicas de raios X, variando de 5 a 20 Gy, e sua salivação foi estimulada pela administração de pilocarpina antes e de 1 a 30 dias após a irradiação. As concentrações de sódio, potássio, fosfato e amilase foram medidas, assim como o

## *Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

fluxo salivar e a fase lag (período entre a injeção de pilocarpina e o começo da produção de secreção). Doses maiores provocaram redução do fluxo salivar e da concentração de íons sódio, ao passo que as concentrações de íons potássio e cálcio não mostraram relação direta com a dose absorvida. As alterações na fase lag e quantidade de amilase foram máximas no 3<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dias, respectivamente, após a irradiação. Mudanças irreversíveis em relação ao fluxo salivar, à fase lag e às concentrações de potássio e sódio foram causadas por doses iguais ou superiores a 10 Gy, sendo que a expressão máxima destas alterações se deu a partir de 15 Gy. Os autores concluíram que as três glândulas salivares maiores demonstraram grande sensibilidade aos efeitos deletérios da radiação, não diferindo significativamente em relação às alterações funcionais apresentadas.

Ramos, em 2005, realizou um estudo com o objetivo de avaliar o efeito radioprotetor da vitamina E na função das glândulas salivares. Foram utilizados 90 ratos machos, os quais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos experimentais: controle, que correspondeu ao grupo em que os animais receberam óleo de oliva; óleo/irradiado, grupo no qual os animais receberam óleo de oliva e foram irradiados com dose única de 15 Gy de radiação gama na região de cabeça e pescoço; irradiado, grupo em que os animais foram apenas irradiados com dose única de 15 Gy de radiação gama; vitamina E, grupo composto por animais que receberam solução de acetato de alfa-tocoferol (vitamina E) mas não foram irradiados e vitamina E/irradiado, no qual os animais receberam solução de acetato de alfa-tocoferol (vitamina E) antes de serem irradiados com dose única de 15 Gy. Os animais foram sacrificados nos tempos 4 horas, 8 horas e 30 dias após a irradiação. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos tempos 4 e 8 horas. Aos 30 dias, o volume salivar dos animais do grupo óleo irradiado estava significativamente diminuído em relação ao grupo controle. Os

animais do grupo irradiado apresentaram uma redução significativa do volume de saliva quando comparados aos animais dos grupos controle, vitamina E e vitamina E/irradiado, os quais apresentaram volumes de saliva similares. Em relação à composição da saliva, não houve diferenças significativas no conteúdo de proteínas total entre os grupos estudados. Os constituintes medidos mostraram decréscimos significativos apenas 4 horas após a irradiação para todos os grupos examinados. A autora concluiu que a radiação não exerceu nenhum efeito no conteúdo de proteína total da saliva dos ratos irradiados e que a vitamina E protegeu a função salivar 30 dias após a irradiação.

## **2.4 Membranas basais**

As membranas basais são estruturas especializadas da matriz extracelular que atuam como uma interface entre as células parenquimatosas e os tecidos de sustentação. Seus componentes principais são o colágeno tipo IV, as glicoproteínas laminina, entactina e fibronectina, assim como a proteoglicana sulfato de heparana. São encontradas circundando as células epiteliais, musculares e de Schwann, bem como formando uma membrana limitante no sistema nervoso central (Stevens & Lowe, 2001).

Uma interface de adesão entre as células do parênquima e a matriz extracelular subjacente é formada pelas membranas basais, sendo que as células possuem mecanismos para ancorarem-se às membranas (hemidesmossomos, receptores de laminina), ao passo que estas estão fortemente aderidas à matriz

extracelular dos tecidos de sustentação, particularmente ao colágeno VII (Stevens & Lowe, 2001).

As membranas basais atuam também como barreiras permeáveis cujos poros têm seus tamanhos determinados pela disposição espacial das glicoproteínas que as compõem. Assim, as membranas basais dos vasos sanguíneos impedem o extravasamento de proteínas grandes para os tecidos, as dos rins permitem a produção da urina, mas evitam a perda de proteínas do sangue filtrado, e as dos pulmões permitem a difusão gasosa (Stevens & Lowe, 2001).

Por fim, uma outra função desempenhada por essas membranas corresponde a controlar a organização e diferenciação celular por meio da interação mútua dos receptores da superfície celular e das moléculas da matriz extracelular. Estas interações são objetos de intensa pesquisa, especialmente na investigação de mecanismos que possam impedir a disseminação e proliferação de células cancerígenas (Stevens & Lowe, 2001).

### **2.4.1 Laminina**

A laminina é uma glicoproteína formada por três cadeias, denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , que podem ser visualizadas microscopicamente como uma cruz assimétrica. É o componente mais abundante da membrana basal e sua principal

função é aderi-la às células epiteliais. Apresenta porções que se ligam ao colágeno IV, ao sulfato de heparana e a receptores celulares, formando, desta forma, pontes de ligação entre as células e a matriz extracelular (Junqueira & Carneiro, 2000).

Sob o ponto de vista da anatomia patológica, as membranas basais podem ser consideradas barreiras estruturais para a invasão e o comportamento metastático das células malignas. Ao separarem o epitélio e o endotélio do estroma circundante, elas passam a representar obstáculos para a invasão tumoral. Preocupados com a sua destruição nos tumores, Caselitz *et al.* (1988) decidiram avaliar tecidos normais de glândulas salivares humanas, assim como tecidos tumorais, compará-los e estabelecer as diferenças entre o padrão e a distribuição de laminina e de colágeno IV nos mesmos. Observaram que tanto a laminina quanto o colágeno IV apresentaram uma marcação linear e contínua ao redor dos ácinos e ductos de glândulas parótidas e submandibulares normais. Nos tumores, contudo, foi verificada uma marcação mais intensa ao redor das células tumorais e um aumento na quantidade de laminina e colágeno IV, especialmente na vizinhança das células mioepiteliais. Adicionalmente, as membranas basais perderam seu aspecto contínuo e apresentaram-se interrompidas.

D'Ardenne, em 1989, realizou uma revisão da literatura a respeito da utilização de marcadores nas membranas basais com a finalidade de facilitar o diagnóstico de tumores. Relatou que a maioria dos tumores e das displasias apresenta membranas basais alteradas e que a manutenção da integridade das membranas é fundamental para que a arquitetura do tecido seja considerada normal. O autor mencionou também que somente as alterações apresentadas

pelas membranas basais não poderiam ser consideradas um critério absoluto e único na determinação do potencial invasivo dos tumores e displasias.

Sabe-se que a laminina exerce um papel fundamental na diferenciação e sobrevivência de neurônios *in vitro*. Embora na idade adulta esteja confinada exclusivamente à membrana basal, no período de formação e desenvolvimento das células do sistema nervoso, esta proteína pode ser encontrada na matriz extracelular intersticial e nas membranas celulares. Com o intuito de investigar as causas da existência de laminina fora das membranas basais, Edgar (1991) decidiu avaliar, em diferentes períodos de desenvolvimento pós-natal, a expressão de seus genes em nervos ciáticos de ratos. Foi constatado que a expressão gênica da proteína em estudo é muito maior ao nascimento que na idade adulta. Conseqüentemente, a quantidade de laminina sintetizada no período de desenvolvimento do sistema nervoso excede a necessária para ser incorporada às membranas basais. O autor concluiu que os diversos padrões de distribuição da laminina, nos diferentes períodos de desenvolvimento pós-natal, provavelmente sejam um reflexo da regulação de sua expressão gênica.

Em sua revisão da literatura feita em 1993, Tryggvason declarou que a laminina é o componente mais complexo e interessante da matriz extracelular, sendo responsável por inúmeras funções celulares como a diferenciação, a adesão, a migração e a proliferação. Segundo o autor, devido às suas várias isoformas, ela consegue desempenhar diversas funções, em tecidos distintos e em diferentes estágios de desenvolvimento. Contudo, o papel das diferentes isoformas de laminina ainda permanece desconhecido e representa um enigma para a ciência.

As diferentes expressões das proteínas laminina, fibronectina e tubulina (proteína citoesquelética) foram avaliadas por McArthur *et al.* (1993) em glândulas salivares labiais de pacientes com Síndrome de Sjögren. No que diz respeito às proteínas fibronectina e tubulina, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo sintomático e o grupo controle. Entretanto, foi verificado um aumento considerável na intensidade de marcação da laminina presente nas glândulas salivares dos pacientes com Síndrome de Sjögren, não somente na região das membranas basais, como também envolvendo todo o epitélio de revestimento dos ductos. Os autores sugeriram que esta proteína possa ser mediadora do processo inflamatório linfocítico envolvendo glândulas salivares de pacientes com Síndrome de Sjögren.

Os componentes das membranas basais e seus receptores também estão envolvidos na regulação da morfogênese epitelial, conforme relatado por Durbeej & Ekblom, em 1997. Os autores sugeriram que as interações entre a laminina-1 (formada pelas cadeias  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  e  $\gamma 1$ ), os demais componentes da membrana basal e a superfície celular são importantes na morfogênese epitelial dos rins, dos pulmões e das glândulas salivares. Foi concluído que a glicoproteína nidogênio é a grande responsável pela ligação da laminina aos outros componentes da membrana basal, ao passo que sua adesão às células epiteliais provavelmente seja realizada por dois sistemas de receptores denominados integrina  $\alpha 6\beta 1$  e distroglicano.

Um estudo envolvendo 13 pacientes com síndrome de Sjögren, 11 pacientes normais e 12 pacientes com sialoadenite não-específica foi realizado por McArthur *et al.*, em 1997. Após a avaliação do colágeno IV, da fibronectina e da laminina, os autores perceberam que somente esta última apresentava uma

marcação mais intensa nos pacientes sindrômicos, especialmente na região das células epiteliais dos ductos. Somando-se a este fato, foi verificado um acúmulo anormal de laminina no citoplasma, levando os autores a ressaltarem o envolvimento direto desta proteína na patogênese das lesões de glândulas salivares apresentadas por pacientes com Síndrome de Sjögren.

A heterogeneidade da molécula de laminina levou Strassburger *et al.* (1998) a determinarem, imunohistoquimicamente, suas diferentes isoformas em glândulas salivares maiores de humanos em idade adulta. Sua distribuição foi analisada nos ácinos, ductos e nervos presentes nas glândulas avaliadas. Foi observado um predomínio das cadeias  $\beta 2$  e  $\gamma 2$  nas membranas basais dos ductos, uma maior quantidade de cadeias  $\beta 1$  e  $\gamma 1$  nas membranas basais dos ácinos, ao passo que nos pequenos nervos periféricos do estroma glandular houve uma maior incidência de  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\gamma 1$ . A distribuição das cadeias de laminina manteve o mesmo padrão para as glândulas parótidas e submandibulares. Os resultados encontrados sugerem que as diferentes isoformas de laminina estão intimamente relacionadas ao grau de diferenciação e função celulares.

## **2.5 Efeitos da radiação ionizante nas membranas basais**

### **2.5.1 De diversos órgãos**

## *Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

Em 1984, Penney & Rosenkrans irradiaram pulmões de ratos com dose única de radiação gama variando de 5 a 13 Gy. Os animais foram sacrificados 1 hora, 1 dia, assim como 1, 4 e 12 semanas após a irradiação. Por meio da análise ultra-estrutural, foram verificadas alterações no sítios aniônicos das membranas basais, que correspondem aos carboidratos de suas glicoproteínas, presentes nos alvéolos e capilares pulmonares. Uma redução significativa no número de sítios aniônicos foi observada na 1<sup>a</sup> hora após a irradiação, para todas as doses utilizadas nesse estudo, e seu aumento foi verificado somente a partir da 4<sup>a</sup> semana. Na 12<sup>a</sup> semana, os animais que receberam doses mais baixas, de 5 e 9 Gy, ainda apresentavam perda de sítios aniônicos, ao passo que os que haviam recebido 13 Gy já demonstravam reparação quase completa. Os autores concluíram que o decréscimo dos sítios aniônicos das membranas basais irradiadas ocorre devido à perda de suas glicoproteínas. Esta perda, por sua vez, aumenta a porosidade das membranas basais e estimula a proliferação de seus componentes, resultando no seu espessamento.

Os importantes papéis biológicos desempenhados pelas proteínas da matriz extracelular levaram Rosenkrans & Penney, em 1987, a irradiarem ratos com doses localizadas de 5, 9 e 13 Gy de radiação gama, visando detectar alterações em suas fibronectinas e lamininas pulmonares. Os animais apresentaram um aumento na quantidade de fibronectina solúvel uma semana após a irradiação, tendo esta atingido seu pico na 28<sup>a</sup> semana e sofrido um posterior decréscimo na 63<sup>a</sup> semana. A quantidade de fibronectina insolúvel, por outro lado, permaneceu próxima aos valores encontrados para o grupo controle durante as 13 primeiras semanas, aumentando após 41 semanas e sofrendo uma redução 63 semanas após a irradiação. A laminina solúvel cresceu levemente ao longo do trabalho, retornando à sua quantidade normal na 63<sup>a</sup> semana. A laminina

## *Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

insolúvel, por sua vez, apresentou um aumento dependente da dose nas quatro primeiras semanas, tendo este sido estendido até a 63<sup>a</sup> semana após a irradiação. De acordo com os autores, as alterações apresentadas por estas duas proteínas da matriz, juntamente com outras mudanças ocorridas na membrana basal, podem estar diretamente relacionadas ao início e manutenção da fibrose pulmonar induzida pela radiação.

Barcellos-Hoff, em 1993, avaliou glândulas mamárias de ratos irradiados com doses de 5 e 10 Gy de radiação gama de corpo todo. Foi observada uma rápida indução do fator de crescimento beta (TGF  $\beta$ ) já na 1<sup>a</sup> hora após a irradiação, sendo que sua superexpressão permaneceu durante os 7 primeiros dias após os animais terem sido irradiados. Estando este fator de crescimento intimamente relacionado à regulação da deposição dos componentes da matriz extracelular, à reparação tecidual e ao crescimento celular, o autor concluiu que o TGF  $\beta$  provavelmente seja um importante mediador no processo de remodelação da matriz extracelular de glândulas mamárias irradiadas.

Alegando que não havia na literatura muitos dados sobre a influência da radiação altamente ionizante no padrão da matriz extracelular, Ehrhart *et al.*, em 1996, irradiaram ratos adultos com 0,8 Gy de íons Fe<sup>56</sup> de alta energia (600 MeV). Os animais foram sacrificados 1 hora, assim como 1, 5, 9 e 14 dias após a irradiação e suas glândulas mamárias foram removidas para análise imunohistoquímica. Foi observado que a imunorreatividade da laminina mostrou-se irregular 1 hora após a irradiação e esta proteína apresentou descontinuidade e espessamento do 1<sup>o</sup> ao 9<sup>o</sup> dias após os animais terem sido irradiados. Sua continuidade foi restabelecida, no entanto, no 14<sup>o</sup> dia. Os autores sugeriram que a radiação ativa o fator de crescimento beta (TGF  $\beta$ ), responsável por regular a

## *Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

deposição dos componentes da matriz, já na 1<sup>a</sup> hora após a irradiação, promovendo, desta forma, um remodelamento da matriz extracelular.

Com o intuito de entender o papel desempenhado pela matriz extracelular na regulação do endotélio, Rose *et al.* (1999) resolveram investigar os efeitos da radiação na angiogênese da aorta de ratos e na proliferação, adesão e diferenciação de células endoteliais. Foi observado que a radiação gama inibiu a formação dos brotos capilares da aorta, mesmo com uma dose de apenas 2 Gy. Um fato interessante a ser relatado é que a presença da laminina-1 ( $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  e  $\gamma 1$ ), que representa de 60 a 70% da membrana basal vascular, desempenhou um papel protetor, possivelmente por promover a regulação da síntese de DNA. Os autores afirmaram que as moléculas da matriz extracelular são responsáveis por induzir a diferenciação e manter o estado fisiológico normal das células endoteliais *in vitro* e *in vivo*.

Apesar de os íons pesados serem pouco abundantes na radiação cósmica (1%), eles são extremamente efetivos em termos radiobiológicos. Visando determinar sua influência sobre as proteínas da membrana basal, Costes *et al.*, em 2000, decidiram analisar as alterações apresentadas pela membrana basal da epiderme de ratos irradiados. Uma hora após a exposição a 1 GeV/núcleo de íons de ferro, com doses variando de 0,03 a 1,6 Gy, não foi verificada nenhuma alteração na intensidade de marcação da laminina do grupo irradiado. Contudo, análises computacionais revelaram que a média dos pixels das áreas de marcação da laminina apresentou-se significativamente menor 48 e 96 horas após a exposição a 0,8 Gy. Esse estudo demonstrou quantitativamente, ou seja, por meio da mensuração da imunorreatividade da laminina, que radiações altamente ionizantes promovem severas modificações na matriz extracelular.

Sabendo que a radioterapia inibe a angiogênese por meio de danos provocados ao endotélio e que o processo de formação e maturação de novos capilares está diretamente ligado à remodelação das proteínas da matriz extracelular, Giannopoulou *et al.* (2001) resolveram estudar a influência da radiação X na expressão e deposição dessas proteínas em embriões de aves irradiados com doses únicas de 10 Gy. Foi verificado, 6 horas após a irradiação, que todas as proteínas estudadas (fibronectina, laminina, colágeno I, integrina) apresentavam-se reduzidas, tendo suas quantidades normais sido restabelecidas somente no tempo 48 horas. Os autores concluíram que o decréscimo na produção e desenvolvimento das proteínas da matriz está diretamente associado à diminuição da formação neovascular.

### **2.5.1 Das glândulas salivares**

Em 1998, Gustafsson *et al.* mostraram interesse pelos efeitos agudos (10 dias após a irradiação) e tardios (180 dias após a irradiação) da radiação X sobre algumas proteínas da matriz extracelular. Vinte ratos tiveram suas glândulas parótidas irradiadas com doses fracionadas de 6 ou 9 Gy administradas em 5 dias consecutivos, o que resultou em doses totais de 30 ou 45 Gy. Dez dias após a irradiação, as proteínas laminina e fibronectina mantiveram-se inalteradas. Contudo, alterações significativas puderam ser observadas 6 meses após a irradiação: depósitos de laminina foram verificados nas regiões onde os ácinos haviam sofrido degeneração e sido substituídos por fibrose, ao mesmo tempo que um aumento da expressão de fibronectina também pôde ser visualizado no

## *Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

estroma. Nas regiões nas quais os ácinos não haviam sofrido degeneração, por outro lado, a espessura da laminina permaneceu igual a do grupo controle, apesar de os ácinos terem sofrido um aumento de diâmetro. Os autores afirmaram que as alterações da membrana basal refletiram um processo de reestruturação do parênquima do tecido glandular.

No trabalho desenvolvido por Bartel-Friedrich *et al.*, em 1999, glândulas submandibulares de ratos foram irradiadas com doses diárias e fracionadas de 2 Gy de radiação X, 5 vezes por semana, o que resultou em um total de 60 Gy. As glândulas foram retiradas menos de 4 meses, de 4 a 6 meses e mais de 6 meses após a irradiação. A análise imunohistoquímica revelou a presença de imunorreatividade nos ácinos, nos ductos, nas paredes vasculares, no tecido nervoso e no tecido conjuntivo intersticial. As diferentes proteínas constituintes da matriz extracelular mostraram diferentes padrões de marcação. O tecido nervoso e os ductos estriados mostraram-se significativamente marcados nas regiões onde foi aplicado o anticorpo anti-laminina, ao passo que os ductos excretores apresentaram-se intensamente positivos para o anti-fibronectina. O aumento de marcação da laminina foi verificado até 6 meses após a irradiação e sofreu um decréscimo a partir desta data. Os autores concluíram que a radiação causa aumento na marcação ( $p= 0,0001$ ) das proteínas da matriz extracelular.

Foi realizado um novo estudo por Bartel-Friedrich *et al.*, em 2000, avaliando a relação existente entre a dose de radiação, a idade, o período de latência e a expressão da laminina em glândulas submandibulares de ratos irradiados. Foi observado que as glândulas irradiadas apresentaram uma marcação significativamente mais forte e maior espessamento que o grupo controle e que o aumento da dose de 20 para 60 Gy esteve diretamente

## *Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

relacionado à elevação da marcação. Somando-se a este fato, depósitos de laminina foram verificados em regiões de destruição acinar presentes nas glândulas expostas a 60 Gy. A distribuição da laminina em glândulas irradiadas com doses de até 20 Gy não foi uniforme e não diferiu significativamente do grupo controle. A idade (1 ano x 1 ano e meio) e o período de latência (6 meses x 12 meses após a irradiação), ao contrário da dose, não influíram na intensidade de marcação da proteína estudada.

Em 2002, Friedrich *et al.* realizaram um trabalho visando analisar o padrão de distribuição das proteínas da matriz extracelular em glândulas submandibulares. Ratos da variedade Wistar foram irradiados com doses fracionadas de 2 Gy, perfazendo um total de 20, 40 ou 60 Gy. Suas glândulas submandibulares foram removidas 6 meses ou 1 ano após a irradiação, sendo, posteriormente, submetidas a análises histológicas e imunohistoquímicas. Foi verificado um aumento (dependente da dose) da intensidade de marcação das proteínas laminina ( $p = 0,0001$ ) e fibronectina nos grupos irradiados, assim como a presença de conglomerados de laminina nas regiões anteriormente ocupadas pelos ácinos. Os autores concluíram que a radiação provoca alterações estatisticamente significantes na quantidade e composição da matriz extracelular de glândulas salivares irradiadas.

### **3 PROPOSIÇÃO**

Esta pesquisa propõe-se a avaliar as possíveis alterações morfológicas produzidas por 15 Gy de radiação gama em glândulas parótidas de ratos. Somando-se a este propósito, serão avaliados os efeitos da radiação gama sobre a laminina das membranas basais de ácinos, ductos, arteríolas, vênulas, capilares e fibras nervosas glandulares.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

Para o desenvolvimento deste trabalho, o projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (protocolo 572-1). Foram utilizados 21 ratos machos (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar), com peso médio de 250 gramas, idade variando entre 60 e 90 dias, sendo os mesmos procedentes do Biotério Central da UNICAMP. Todos os animais foram divididos aleatoriamente e mantidos, desde as fases de pré-tratamento até o sacrifício, em gaiolas de policarbonato, que se encontravam em local de temperatura e umidade controladas, com um ciclo alternado de 12 horas claro-escuro. A alimentação dos animais constou de ração balanceada padrão e água “*ad libitum*” diariamente.

## **4.2 Grupos Experimentais**

A amostra foi dividida, aleatoriamente, em dois grupos experimentais assim denominados:

- Grupo Controle – representado por 3 animais não expostos à radiação.
- Grupo Irrradiado – constituído por 18 animais que, após terem sido irradiados, foram sacrificados em 6 tempos pré-determinados: 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após a irradiação. Cada tempo estudado passou a representar um subgrupo formado por 3 ratos irradiados.

## **4.3 Fase de Irradiação**

Os animais do Grupo Irrradiado foram anestesiados intraperitonealmente com 40 mg/kg de pentobarbital de sódio (figura 1) e tiveram a região de cabeça e pescoço irradiada por meio de fótons de radiação gama emitidos por um aparelho de  $\text{Co}^{60}$  da marca Alcion CGR II (Siemens), cujo rendimento foi de 107 Gy/min, operando com energia de 1,25 MeV e dose total aplicada de 15 Gy. Foram irradiados 8 ratos por vez e o tamanho do campo irradiado foi de 30 x 30 cm, o que correspondeu somente à região de cabeça e pescoço. Os animais foram

## *Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

irradiados a uma distância focal de 80 cm e com uma profundidade de 0,5 cm (figura 2).



Figura 1 – Anestesia com pentobarbital de sódio.



Figura 2 – Animais posicionados para a irradiação.

### **4.4 Fase de Obtenção das Peças**

Os animais foram novamente anestesiados, intraperitonealmente, com doses de 40 mg/kg de pentobarbital de sódio para a remoção de suas glândulas parótidas direitas (figuras 3 e 4). Estas foram lavadas com solução fisiológica, secas em papel absorvente e mantidas em recipientes com formol a 10% (a 4<sup>o</sup> C) até sua inclusão. Após a obtenção das peças, os animais foram sacrificados por prolongamento da anestesia.

## *Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---



Figura 3 – Incisão cirúrgica para a remoção da glândula parótida



Figura 4 – Glândula parótida

### **4.5 Preparação Tecidual**

#### **4.5.1 Métodos Histológicos**

##### ***4.5.1.1 Coloração pela Hematoxilina-Eosina***

As peças foram incluídas em Paraplasty Plus, segundo a técnica de rotina do Laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP. Após a inclusão, as peças foram levadas ao micrótomo para a obtenção de cortes de 3  $\mu\text{m}$  de espessura, a fim de ser realizada a coloração por Hematoxilina-Eosina (HE). Com esta coloração foi possível avaliar as alterações

morfológicas apresentadas pelas glândulas parótidas irradiadas nos diversos tempos estudados.

#### **4.5.1.2 Reação Imunohistoquímica**

A reação imunohistoquímica teve como finalidade avaliar a proteína laminina em diversas estruturas das glândulas parótidas (ácinos, ductos estriados, ductos intercalares, capilares, vênulas, arteríolas e fibras nervosas)

##### **4.5.1.2.1 Preparação das lâminas**

As lâminas (Knitel Glasser, fosca) foram mergulhadas em solução de HCl (Merck, Alemanha) 1N durante 20 minutos. Posteriormente, foram enxaguadas em água destilada e secas na estufa a uma temperatura de 60 °C. Finalmente, as lâminas foram imersas em uma solução 3:1 de etanol absoluto (Merck, Alemanha) e ácido acético (Merck, Alemanha) por 20 minutos e sem enxagüe, foram secas na estufa a 60 °C.

Após este pré-tratamento, as lâminas foram tratadas seguindo o seguinte protocolo:

- Quatro banhos rápidos em uma solução de 3 Aminopropyltriethoxysilano a 6% - organosilano (Sigma Chemical Co, USA);
- Quatro banhos rápidos em acetona pura (Merck, Alemanha) e
- Dois banhos rápidos em água destilada, sendo em seguida secas na estufa a 60 °C.

#### *4.5.1.2.2 Microtomia*

Cortes das glândulas parótidas com 3 µm de espessura obtidos em um micrótomo automático (RM 2155 Leica) foram coletados em lâminas silanizadas (02 cortes por lâmina). Estas foram mantidas durante 48 horas na estufa a 60 °C para perfeita adesão dos cortes.

#### *4.5.1.2.3 Reação Imunohistoquímica*

Em uma cubeta de vidro com capacidade para 8 lâminas, os cortes foram desparafinizados por meio da imersão em xilol por 40 minutos, sendo que nos primeiros 20 minutos as cubetas foram colocadas na estufa a 60° C e nos demais foram deixadas na capela, à temperatura ambiente. O próximo passo correspondeu à hidratação dos cortes por meio de uma série decrescente de álcool (absoluto, 90%, 70%, 50%) e água por 1 minuto cada. Em seguida, foram mergulhados em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 volumes (3 vezes por 5 minutos) e 20 volumes (2 vezes por 5 minutos) para inativar a atividade da peroxidase endógena existente no tecido. Após enxágüe com água destilada por 2 minutos, todos os cortes foram imersos em uma solução contendo 30 mg de pepsina para cada 70 ml de glicina e mantidos a 37° C, durante 30 minutos, para a realização da digestão. Posteriormente, foram tratados com uma solução de tampão PBS e BSA 3% (Sigma Chemical Co, USA), cuja finalidade era impedir que os cortes secassem.

Para a imunolocalização, o anticorpo primário utilizado, policlonal produzido em coelho, foi o Anti-IL-1α (Sigma Chemical Co, USA) na diluição

*Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

1:6000 µl em PBS/BSA a 1%. Os cortes foram incubados com os anticorpos primários por 16 horas a 4 °C, em seguida lavados em PBS (3 vezes por 5 minutos) e submetidos ao “Kit” LSAB - HRP (DAKO system) de amplificação. O anticorpo secundário biotinilado (reagente amarelo) foi colocado sobre cada corte e deixado por 30 minutos em uma estufa a 37° C. Após este período, as lâminas foram lavadas em PBS durante 15 minutos (3 vezes de 5 minutos). O mesmo procedimento foi realizado para a streptavidina e antiglobulina de coelho ligada à peroxidase (reagente vermelho).

Na etapa seguinte, as reações foram reveladas durante 1 minuto, a 37°C, com 60 mg de DAB (3,3 diaminobenzidina – Sigma Chemical Co, USA) e 70ml de PBS, adicionados a 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 volumes e 1ml de DMSO. A revelação se deu pela reação química entre o DAB, a peroxidase do anticorpo secundário e o peróxido de hidrogênio misturado à solução de revelação, formando um precipitado marrom, insolúvel e permanente. Após a fase de revelação, as lâminas foram exaustivamente lavadas em água destilada, contra-coradas com Hematoxilina de Meyer por 30s, desidratadas e montadas com permount. Para confirmação dos resultados, alguns cortes foram submetidos ao mesmo tratamento, omitindo-se somente os anticorpos primários. Estes cortes serviram como controle negativo das reações.

## **4.6 Análise das lâminas**

Foi feita a análise subjetiva das lâminas coradas com hematoxilina-eosina. As lâminas submetidas às reações de imunohistoquímica, por sua vez, foram avaliadas subjetivamente e objetivamente. Receberam numeração aleatória e sua análise foi realizada por três avaliadores, previamente calibrados. A imunorreatividade da laminina presente nas diferentes estruturas glandulares foi avaliada segundo o sistema de escores citado abaixo.

### **Escores:**

- **0 = ausente**
- **1 = fraco (a)**
- **2 = moderado (a)**
- **3 = intenso (a)**

## **4.7 Análise Estatística**

A intensidade de marcação da laminina, seu espessamento e a presença de conglomerados foram classificados em ausentes, fracos, moderados ou intensos (Quadro 1). Posteriormente, foram obtidas as medianas fornecidas pela análise dos três avaliadores para cada estrutura do grupo controle e de todos

*Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

---

os tempos do grupo irradiado. Estas medianas foram, então, submetidas ao teste de Kruskal-Wallis ( $\alpha = 0,05$ ). O grau de concordância interobservadores também foi avaliado por meio do teste de Kappa.

Quadro 1 - Avaliação da laminina

Número da lâmina:	Estruturas	Intensidade de marcação	Espessamento	Conglomerados
	Ácinos			
	Ductos estriados			
	Ductos intercalares			
	Capilares			
	Vênulas			
	Arteriolas			
	Fibras Nervosas			

## **5 RESULTADOS**

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos por meio das análises microscópicas do material coletado.

### **5.1 Avaliação Subjetiva**

#### **5.1.1 Hematoxilina-Eosina**

##### ***5.1.1.1 Grupo Controle***

Este grupo caracterizou-se pela contigüidade dos ácinos serosos e pela presença de ductos intercalares e de ductos estriados em posição intralobular. OS ductos excretores, por sua vez, estavam localizados periféricamente, ou seja, em posição extralobular (figura 5).

### **5.1.1.2 Grupo Irradiado**

#### *5.1.1.2.1 Subgrupo 4 horas*

Verificou-se o início de um processo de atrofia acinar, que foi identificado devido a uma discreta separação entre os ácinos. Os núcleos das células serosas mantiveram-se normais e não foi observada a presença de infiltrado inflamatório (figura 6).

#### *5.1.1.2.2 Subgrupo 8 horas*

Foi observada uma quantidade abundante de células necrosadas, cujos núcleos apresentavam cariólises e cariorrexes, figuras de necrose nuclear. A cariólise corresponde à destruição do núcleo e perda de afinidade da cromatina pelos corantes básicos, ao passo que a cariorrexe equivale à ruptura do núcleo e desintegração da cromatina, que aparece na forma de granulações. Os ácinos mostraram-se atróficos e perderam seu formato natural, conferindo ao tecido glandular um aspecto desorganizado, como se estivesse degenerado. Neste subgrupo foi visualizada a expressão máxima das figuras de necrose nuclear produzidas pelos efeitos deletérios da radiação gama (figura 7).

#### *5.1.1.2.3 Subgrupo 12 horas*

## *Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

Os ácinos mantiveram-se atróficos, porém seus núcleos não apresentavam as alterações degenerativas observadas no subgrupo anterior e seu formato voltou a ter um aspecto normal. Por outro lado, foi verificada uma quantidade muito grande de vacúolos nos citoplasmas das células serosas (figura 8). Este subgrupo, juntamente com o subgrupo 8 horas, foram os mais severamente atingidos pelos efeitos da radiação.

### *5.1.1.2.4 Subgrupo 24 horas*

A atrofia acinar foi preponderante neste subgrupo em relação a todos os outros tempos estudados, contudo o tecido glandular mostrou-se mais organizado e não foi verificada a presença das figuras de necrose nuclear (cariólises, cariorrexes), assim como das vacuolizações citoplasmáticas (figura 9).

### *5.1.1.2.5 Subgrupo 48 horas*

A separação entre os ácinos manteve-se acentuada, embora já não existissem vacuolizações e alterações nucleares degenerativas (figura 10).

### *5.1.1.2.6 Subgrupo 72 horas*

Este subgrupo apresentou aspectos semelhantes ao subgrupo anterior: os ácinos mantiveram-se atróficos, sem vacuolizações e com ausência de necrose nuclear. Verificou-se, entretanto, uma maior organização da arquitetura glandular e a presença de algumas regiões nas quais a separação entre os ácinos havia diminuído (figura 11).

## Coloração por Hematoxilina - Eosina

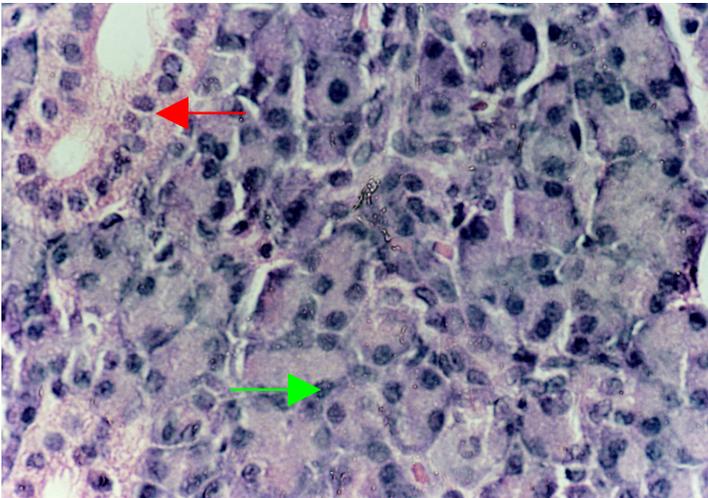


Figura 5 – Grupo controle mostrando um ducto estriado (seta vermelha) e a grande proximidade existente entre os ácinos (seta verde). Aumento original: 10 x 1,25 x 16

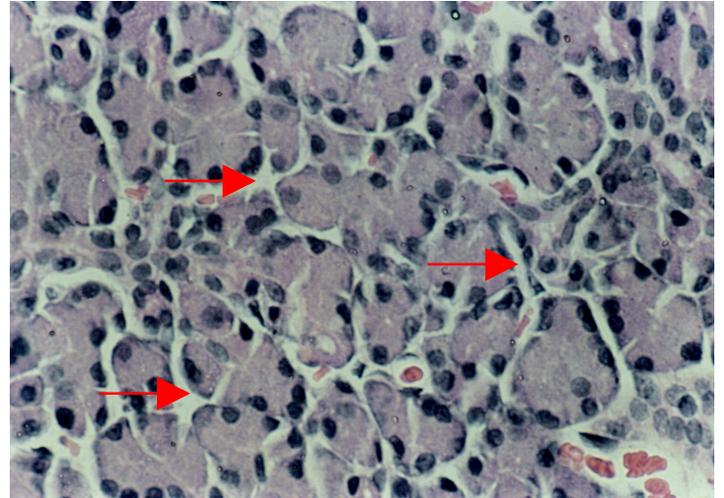


Figura 6 – Grupo Irrradiado: subgrupo 4 horas apresentando discreta separação entre os ácinos (setas). Aumento original: 10 x 1,25 x 16

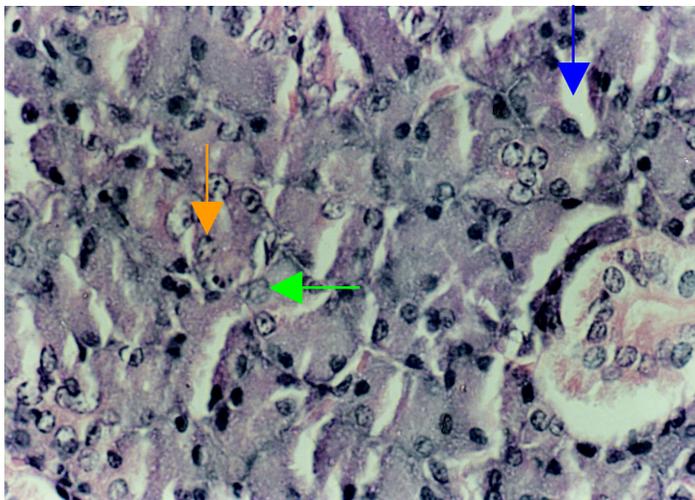


Figura 7 – Grupo Irrradiado: subgrupo 8 horas apresentando figuras de necrose nuclear, tais como a cariorrexe (seta laranja) e a cariólise (seta verde). Os ácinos estão atróficos (seta azul) e o tecido glandular perdeu sua arquitetura normal. Aumento original: 10 x 1,25 x 16

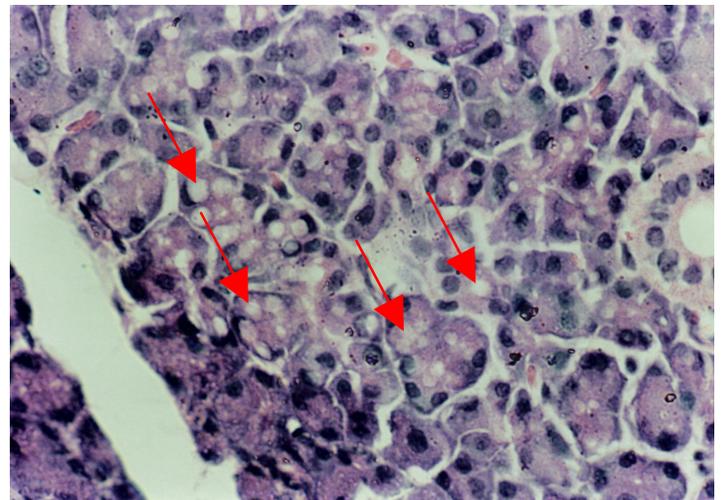


Figura .8 – Grupo Irrradiado: subgrupo 12 horas apresentando atrofia acinar e grande incidência de vacuolizações citoplasmáticas (setas). Aumento original: 10 x 1,25 x 16

## Coloração por Hematoxilina - Eosina

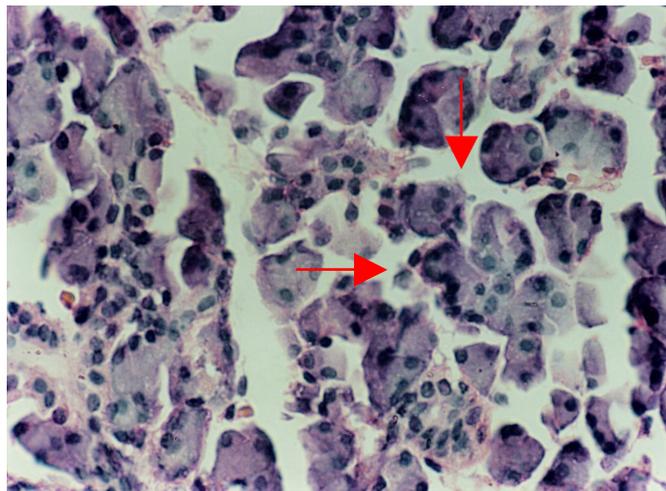


Figura 9 – Grupo Irradiado: subgrupo 24 horas apresentando severa atrofia acinar. Aumento original: 10 x 1,25 x 16

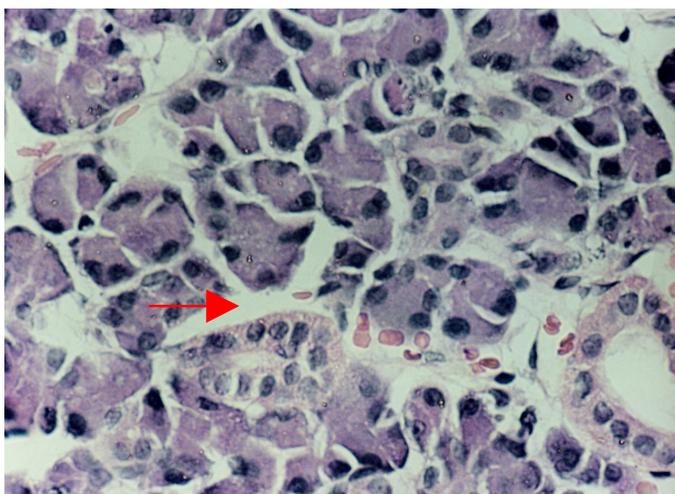


Figura 10 – Grupo Irradiado: subgrupo 48 horas apresentando atrofia dos ácinos. Aumento original: 10 x 1,25 x 16

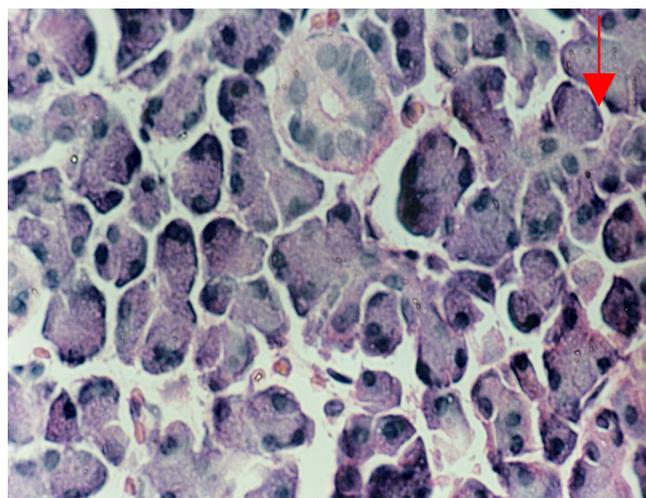


Figura 11 – Grupo Irradiado: subgrupo 72 horas mostrando maior organização do tecido glandular e áreas com menor separação entre os ácinos (seta). Aumento original: 10 x 1,25 x 16

## **5.1.2 Avaliação imunohistoquímica**

### **5.1.2.1 Grupo Controle**

O grupo controle caracterizou-se pela presença de uma marcação moderada ao redor dos ácinos, dos ductos estriados, dos ductos intercalares, dos ductos excretorios e das arteríolas. Os capilares, vênulas e fibras nervosas, por sua vez, apresentaram-se fortemente marcados (figuras 12, 13 e 14).

### **5.1.2.2 Irradiado**

#### **5.1.2.2.1 Subgrupo 4 horas**

As glândulas parótidas removidas 4 horas após a irradiação caracterizaram-se por apresentarem ácinos, capilares, arteríolas, vênulas e fibras nervosas bem marcados. Os ductos estriados, intercalares e excretorios, por sua vez, mostraram marcação moderada e foi detectado um leve espessamento da laminina acinar (figuras 15, 16 e 17).

#### **5.1.2.2.2 Subgrupo 8 horas**

O subgrupo 8 horas apresentou ácinos, ductos intercalares, ductos estriados, ductos excretores e arteríolas moderadamente marcados. Já os capilares, as vênulas e as fibras nervosas apresentaram-se com marcação intensa. Observou-se um espessamento moderado da laminina existente nas membranas basais dos ácinos e a presença de conglomerados desta proteína (figura 18).

#### *5.1.2.2.3 Subgrupo 12 horas*

O subgrupo 12 horas apresentou ácinos, ductos, arteríolas, vênulas, capilares e fibras nervosas intensamente marcados. O espessamento da laminina acinar mostrou-se intenso e diversas regiões de acúmulos ou conglomerados de laminina puderam ser identificadas (figuras 19 e 20).

#### *5.1.2.2.4 Subgrupo 24 horas*

A marcação dos ácinos, arteríolas, vênulas, capilares e fibras nervosas mostrou-se acentuada, embora os ductos apresentassem-se moderadamente marcados. O espessamento da laminina acinar mostrou distribuição heterogênea, existindo tanto áreas com espessamento moderado (figura 21), como regiões com intenso espessamento acinar (figura 22). Os acúmulos ou conglomerados da proteína em estudo puderam ser facilmente visualizados.

#### *5.1.2.2.5 Subgrupo 48 horas*

Este subgrupo caracterizou-se pela intensa marcação da laminina presente na membrana basal dos ácinos e pelo grande número de conglomerados da mesma. Com exceção dos ductos intercalares e estriados, os quais se mostraram moderadamente marcados, todas as demais estruturas apresentaram marcação intensa (figuras 23 e 24).

#### *5.1.2.2.6 Subgrupo 72 horas*

O espessamento da membrana basal acinar atingiu seu ápice no subgrupo 72 horas, estando distribuído homogeneamente por toda a lâmina. A quantidade de conglomerados de laminina foi superior aos demais grupos estudados. Os ácinos, arteríolas, vênulas, capilares e fibras nervosas mostraram-se fortemente marcados, ao passo que os ductos apresentaram marcação moderada (figuras 25, 26 e 27)

## Imunohistoquímica

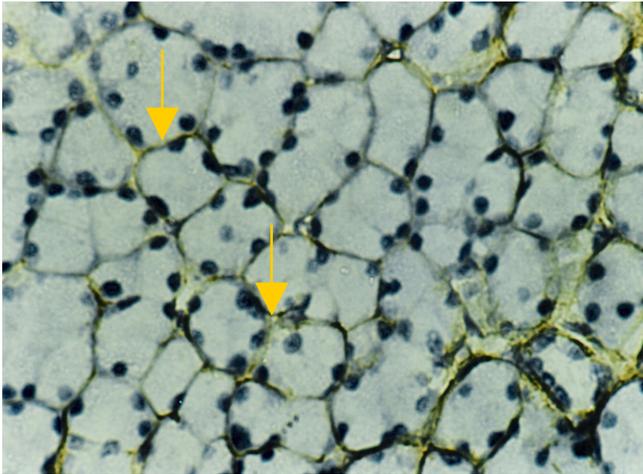


Figura 12 – Grupo Controle mostrando marcação moderada, ausência de espessamento e de conglomerados de laminina. Aumento original: 10 x 1,25 x 16



Figura 13 – Grupo Controle apresentando fibras nervosas intensamente marcadas. Aumento original: 10 x 1,25 x 16

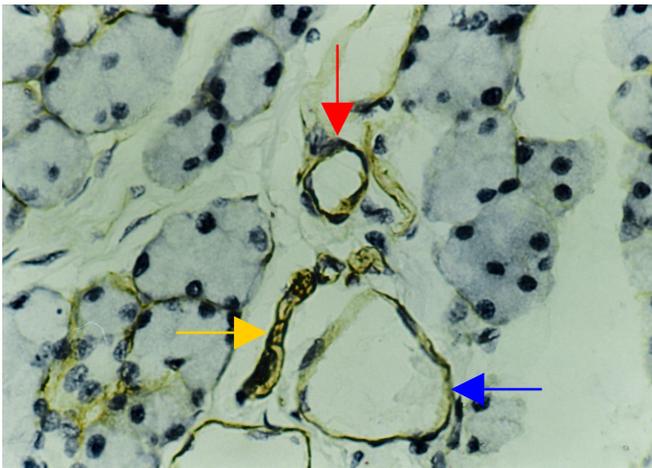


Figura 14 – Grupo Controle apresentando vênulas (seta azul), fibras nervosas (seta laranja) e capilares (seta vermelha) com marcação intensa. Aumento original: 10 x 1,25 x 16

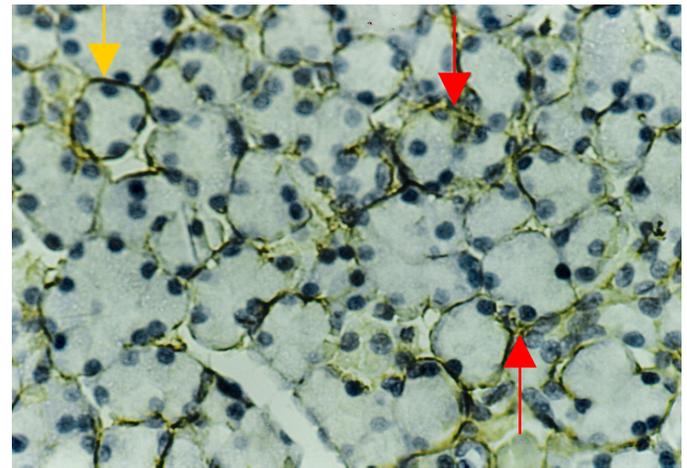


Figura 15 – Grupo Irradiado: subgrupo 4 horas com ácinos bem marcados (seta laranja) e presença de um espessamento fraco da proteína laminina (setas vermelhas). Aumento original: 10 x 1,25 x 16

## Imunohistoquímica

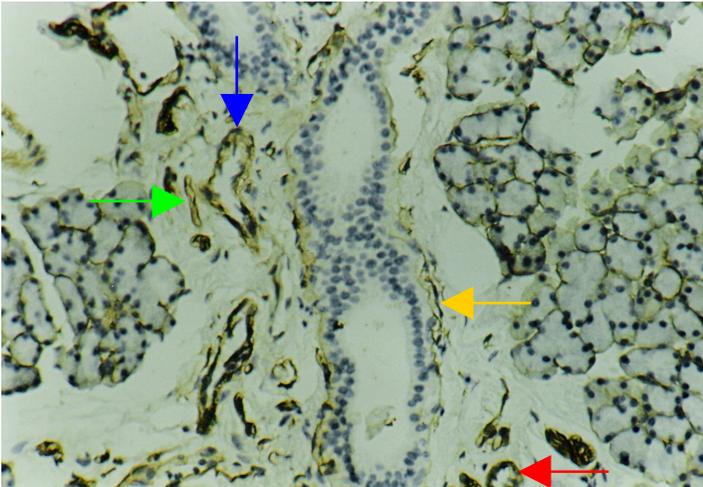


Figura 16 – Grupo Irradiado: subgrupo 4 horas apresentando um ducto excretor (seta laranja) com marcação forte, assim como vênulas (seta azul), capilares (seta vermelha) e fibras nervosas (seta verde) intensamente marcados. Aumento original: 10 x 1,25 x 6,3

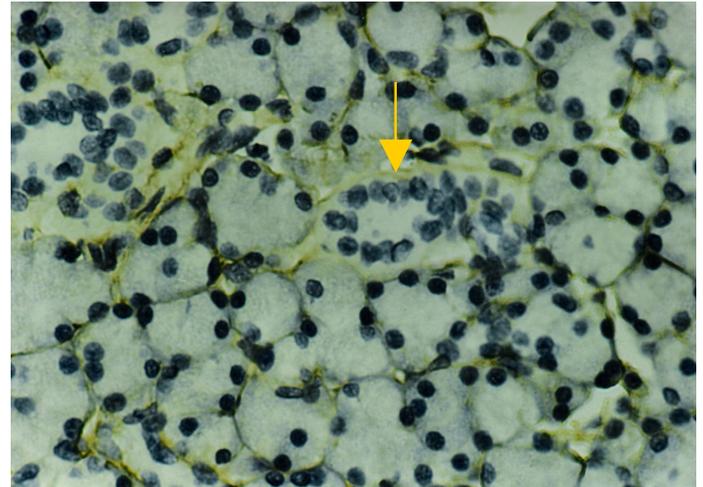


Figura 17 – Grupo Irradiado: subgrupo 4 horas mostrando a marcação moderada dos ductos intercalares. Aumento original: 10 x 1,25 x 16

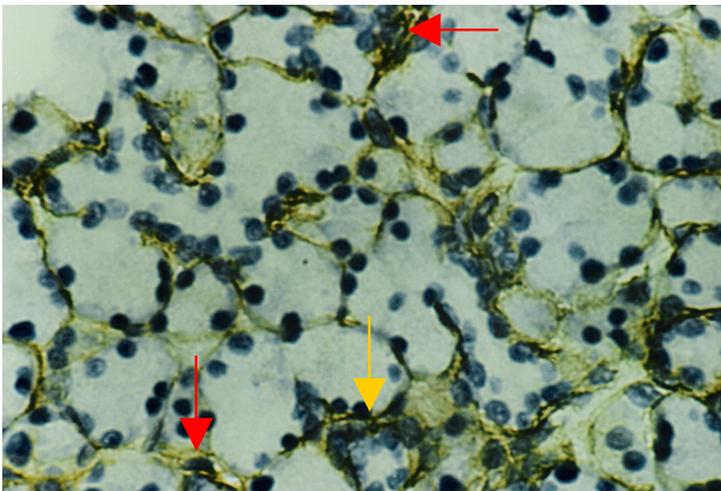


Figura 18 – Grupo Irradiado: subgrupo 8 horas mostrando ácinos bem marcados e a presença de um espessamento moderado ao redor dos mesmos (seta laranja). Há regiões apresentando conglomerados de laminina (setas vermelhas). Aumento original: 10 x 1,25 x 16

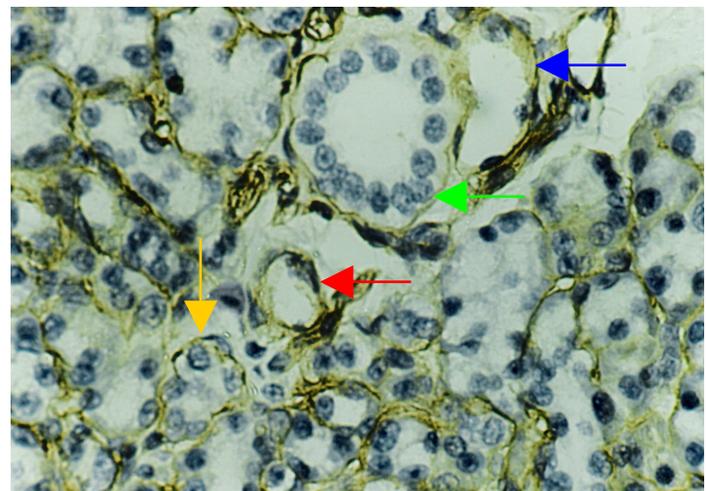


Figura 19 – Grupo Irradiado: subgrupo 12 horas com ácinos (seta laranja), vênulas (seta azul), capilares (seta vermelha) e um ducto intercalares (seta verde) fortemente marcados. Aumento original: 10 x 1,25 x 16

## Imunohistoquímica

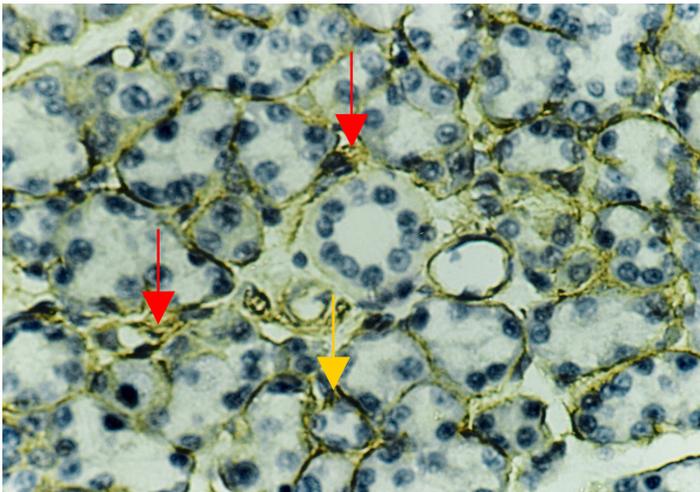


Figura 20 – Grupo Irradiado: subgrupo 12 horas mostrando a marcação intensa dos ácinos, o forte espessamento da proteína laminina presente em sua membrana basal (seta laranja) e a presença de conglomerados desta proteína (setas vermelhas). Aumento original: 10 x 1,25 x 16

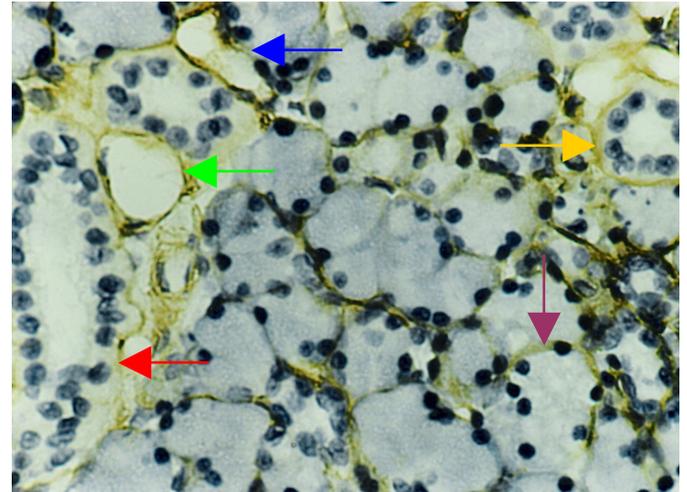


Figura 21 – Grupo Irradiado: subgrupo 24 horas apresentando ductos intercalares (seta laranja), ductos estriados (seta vermelha), vênulas (seta azul) e capilares (seta verde) fortemente marcados e a presença de espessamento moderado (seta violeta). Aumento original: 10 x 1,25 x 16

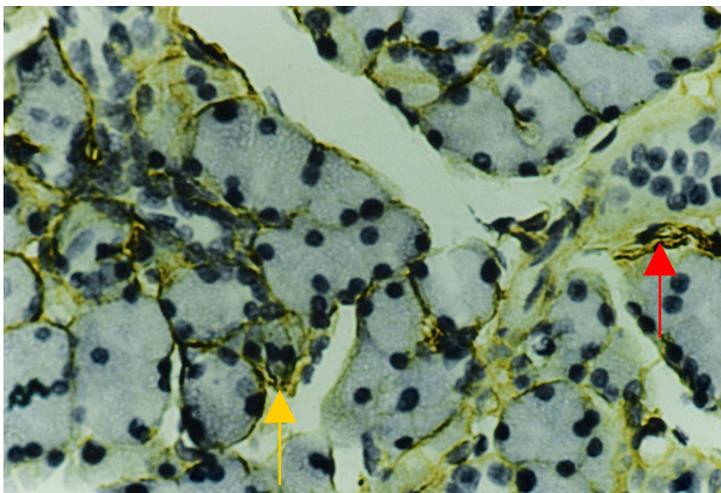


Figura 22 – Grupo Irradiado: subgrupo 24 horas apresentando acentuada marcação e espessamento da laminina presente ao redor dos ácinos (seta laranja). Os conglomerados desta proteína (seta vermelha) são facilmente visualizados. Aumento original: 10 x 1,25 x 16

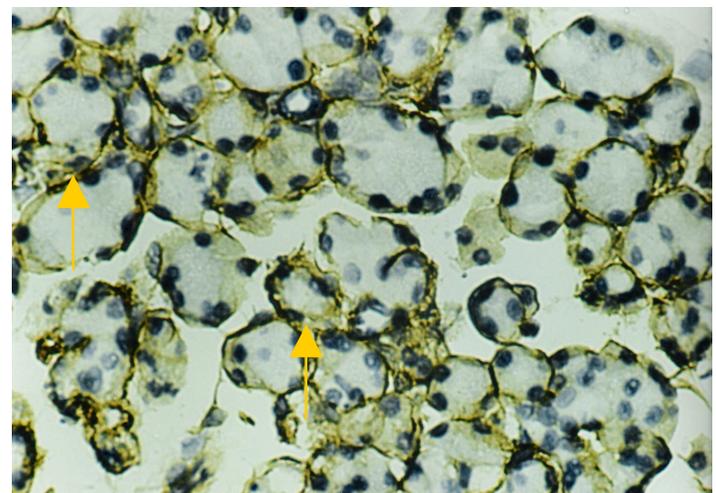


Figura 23 – Grupo Irradiado: subgrupo 48 horas apresentando intensa marcação da laminina presente na membrana basal dos ácinos. Aumento original: 10 x 1,25 x 16

## Imunohistoquímica

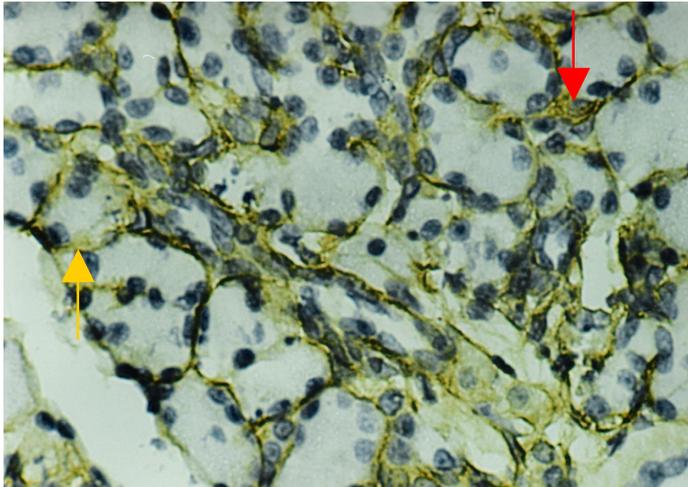


Figura 24 – Grupo Irradiado: subgrupo 48 horas apresentando um forte espessamento da laminina acinar (seta laranja). Notar a presença de acúmulos ou conglomerados desta proteína (seta vermelha). Aumento original: 10 x 1,25 x 16

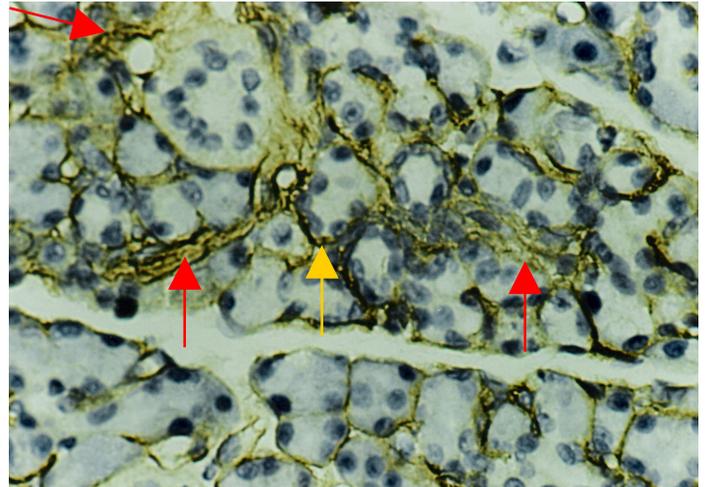


Figura 25 – Grupo Irradiado: subgrupo 72 horas com ácinos intensamente marcados e a presença de um espessamento muito forte ao redor dos mesmos (seta laranja). Os conglomerados de laminina são evidentes neste grupo (setas vermelhas). Aumento original: 10 x 1,25 x 16

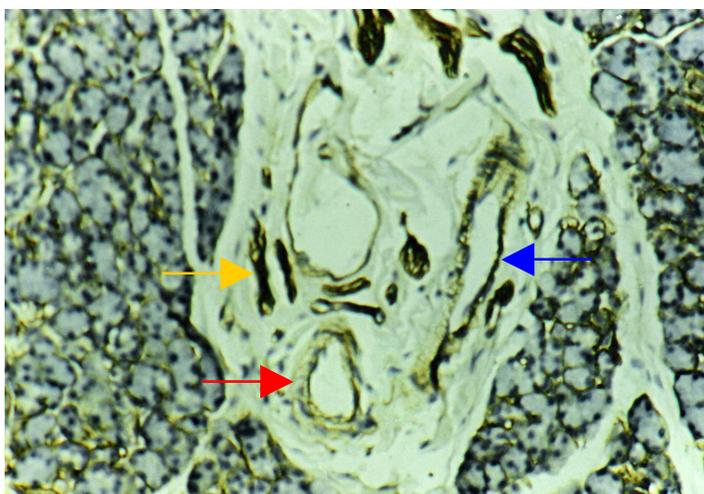


Figura 26 – Grupo Irradiado: subgrupo 72 horas mostrando vênulas (seta azul), arteríolas (seta vermelha) e fibras nervosas (seta laranja) bem marcadas. Aumento original: 10 x 1,25 x 6,3

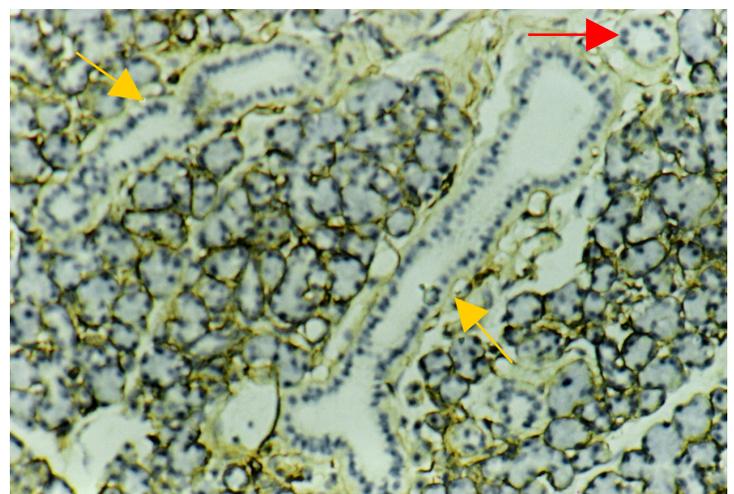


Figura 27 – Grupo Irradiado: subgrupo 72 horas mostrando a marcação moderada dos ductos estriados (setas laranjas) e intercalares (seta vermelha). Aumento original: 10 x 1,25 x 6,3

## **5.2 Análise Objetiva**

### **5.2.1 Kruskal-Wallis**

A comparação entre as intensidades de marcação e espessamento da laminina nos diversos grupos estudados foi realizada por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ( $\alpha = 0,05$ ), através do qual foram obtidos os gráficos e a tabela apresentados a seguir:

#### **5.2.1.1 Ácinos**

A mediana da intensidade de marcação da laminina acinar foi 2 para o grupo controle e o subgrupo 8 horas. Os demais subgrupos apresentaram mediana igual a 3. No que diz respeito à marcação da laminina presente nos ácinos, não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados ( $p=0,6975$ ).

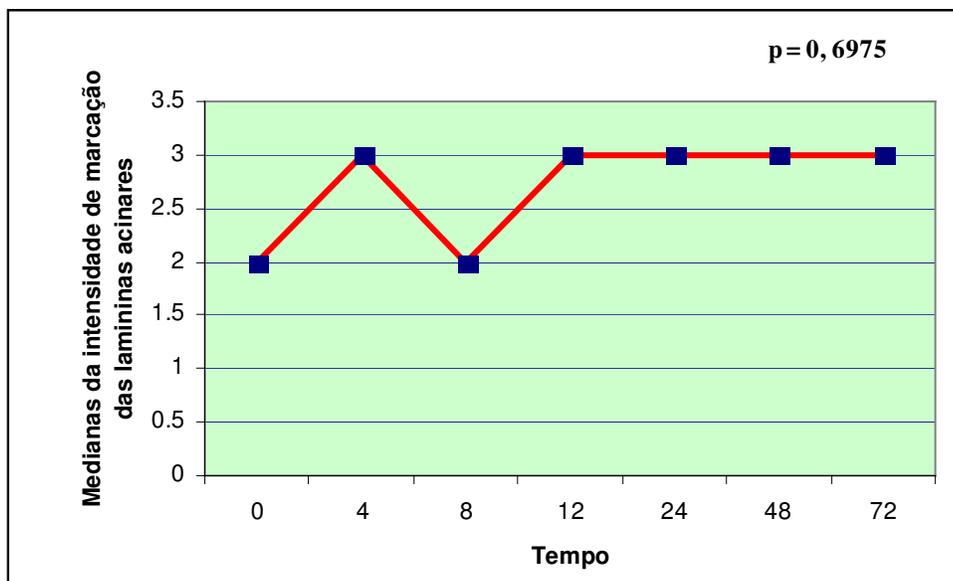


Figura 28 – Intensidade de marcação das lamininas acinares nos diversos tempos estudados

### **5.2.1.2 Ductos Intercalares**

A intensidade de marcação dos ductos intercalares apresentou mediana igual a 2 para todos os grupos avaliados, com exceção do subgrupo 12 horas. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados ( $p = 0,1429$ ).

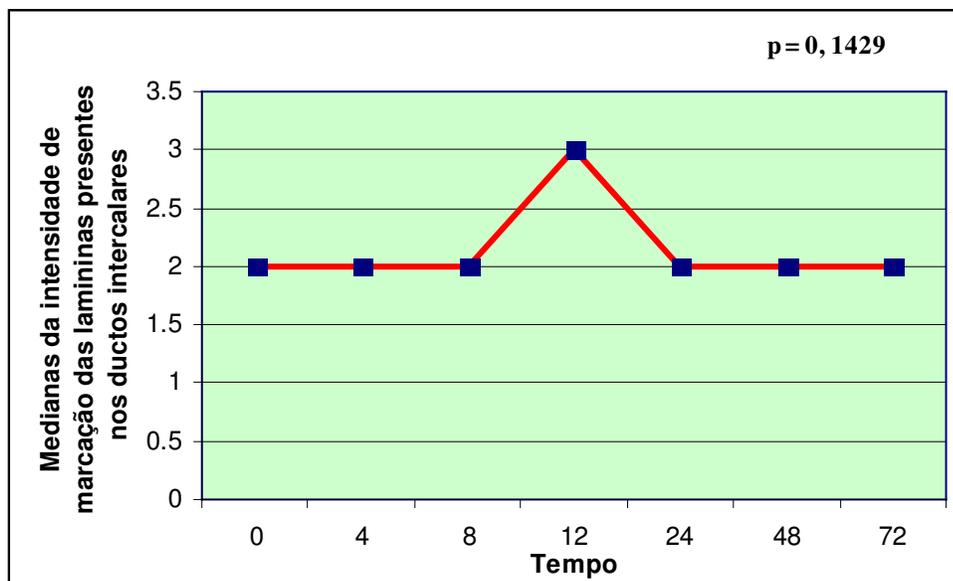


Figura 29 – Intensidade de marcação das lamininas presentes nos ductos intercalares nos diversos tempos estudados

### **5.2.1.3 Ductos Estriados**

Com exceção do subgrupo 12 horas, que apresentou mediana igual a 3, todos os outros grupos apresentaram mediana igual a 2, não sendo detectada diferença estatisticamente significante entre os grupos avaliados ( $p = 0,1429$ ).

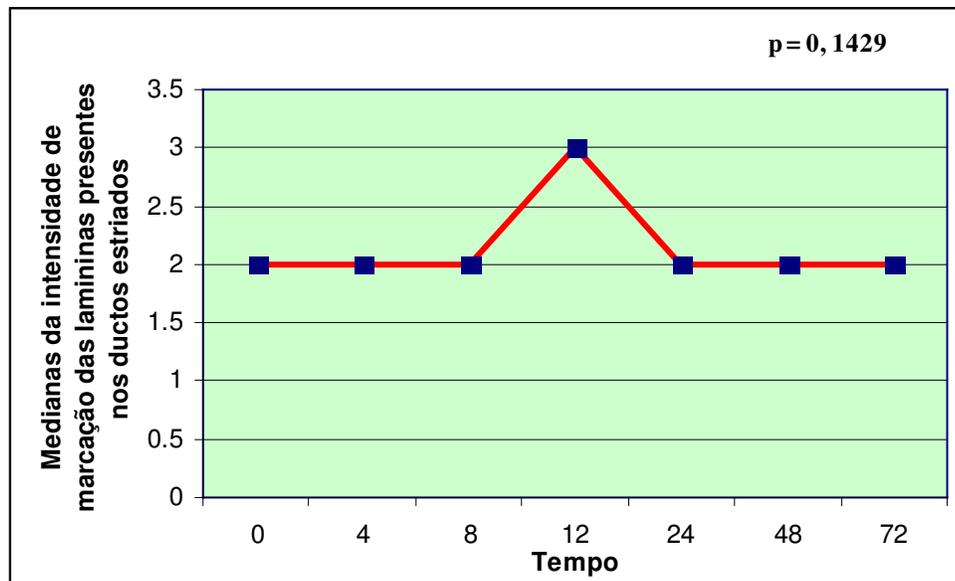


Figura 30 – Intensidade de marcação das lamininas presentes nos ductos estriados nos diversos tempos estudados

#### **5.1.2.4 Capilares**

Todos os tempos avaliados apresentaram mediana igual a 3 e não diferiram significativamente entre si ( $p = 0,7401$ ).

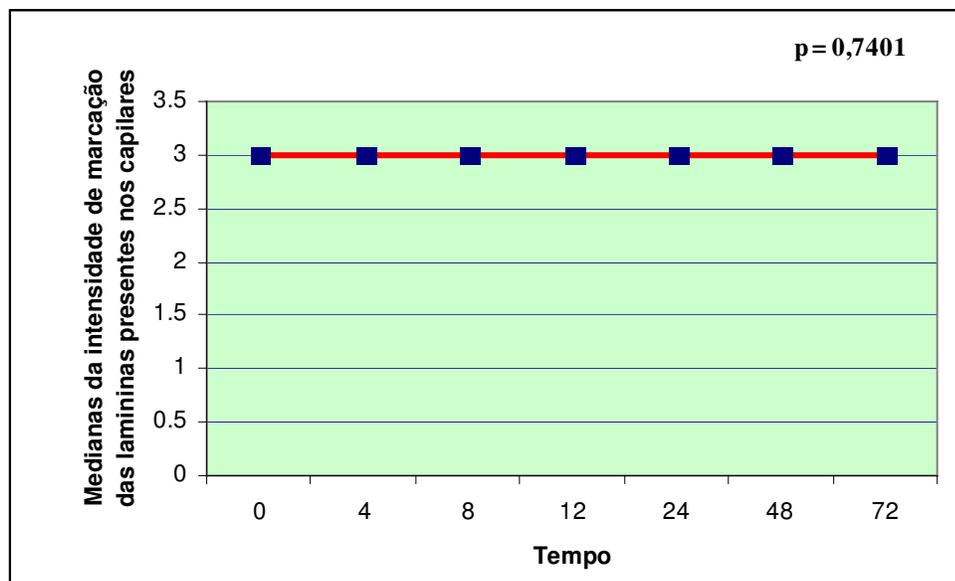


Figura 31 – Intensidade de marcação das lamininas presentes nos capilares nos diversos tempos estudados

### **5.1.2.5 Arteriolas**

As arteriolas apresentaram mediana igual a 2 para o grupo controle e para o subgrupo 8 horas e mediana igual a 3 para os outros subgrupos. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados ( $p = 0,4559$ ).

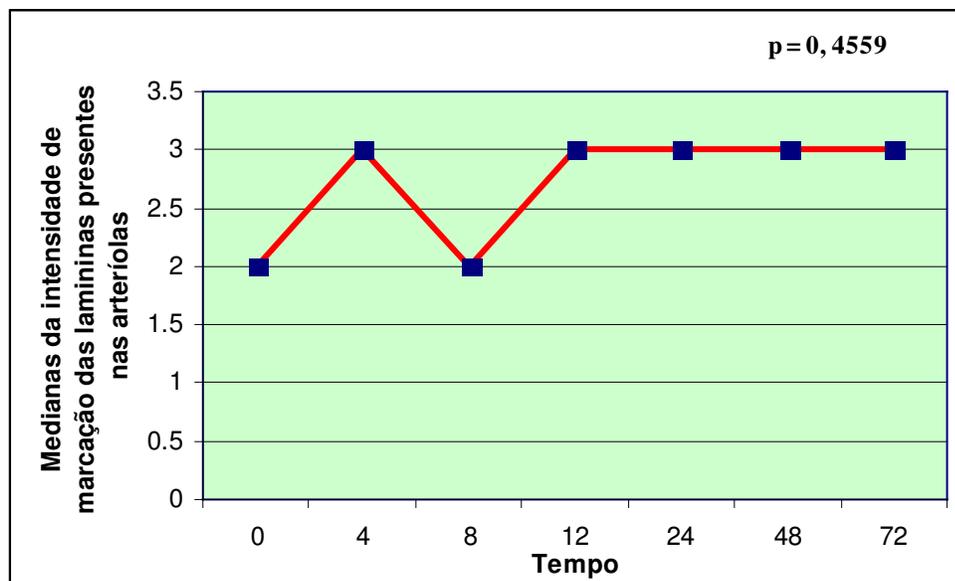


Figura 32 – Intensidade de marcação das lamininas presentes nas arteríolas nos diversos tempos estudados

### **5.1.2.6 Vênulas**

As vênulas apresentaram mediana igual a 3 para todos os grupos avaliados. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p = 0,8685$ ).

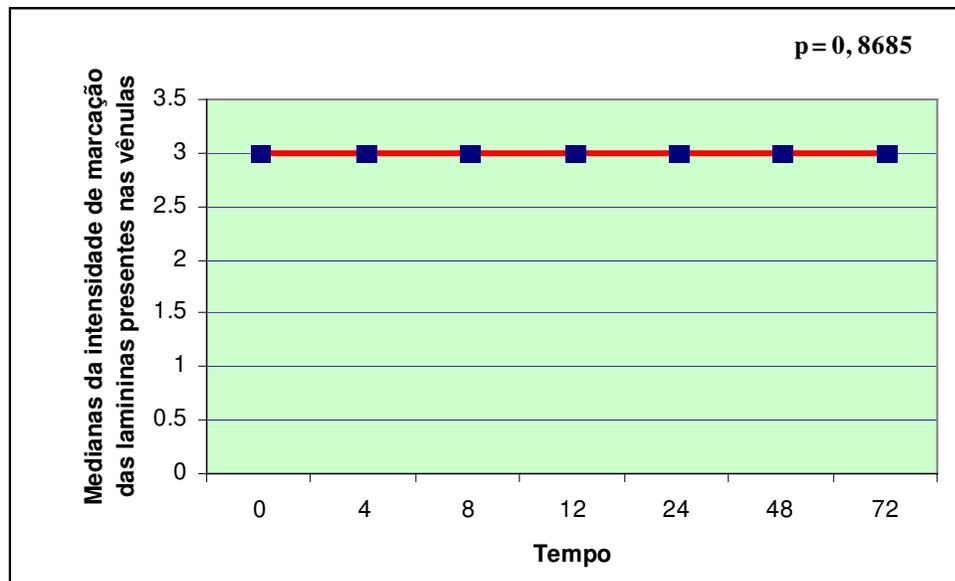


Figura 33 – Intensidade de marcação das lamininas presentes nas vênulas nos tempos estudados

### **5.1.2.7 Fibras nervosas**

A intensidade de marcação da laminina apresentou mediana igual a 3 para todos os grupos avaliados.

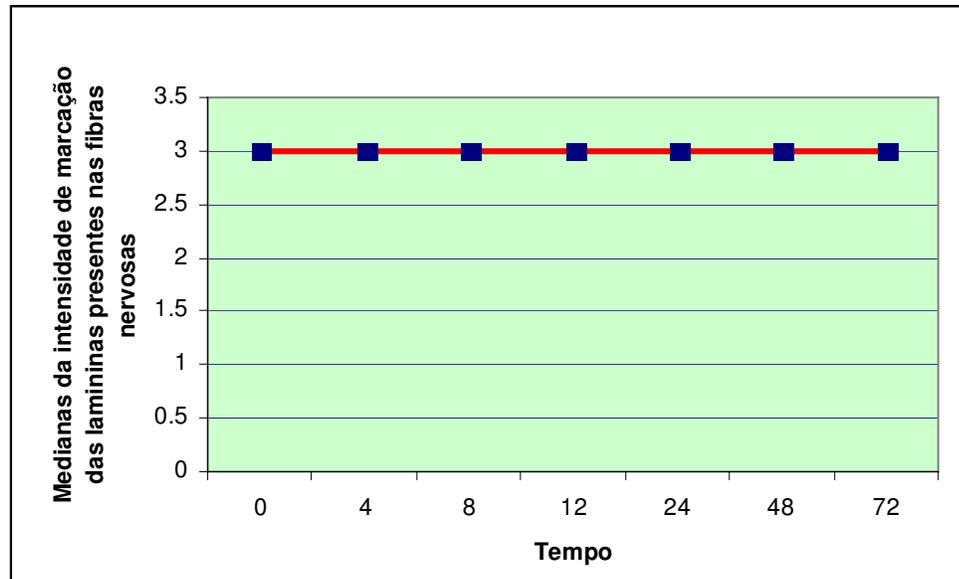


Figura 34 – Intensidade de marcação das lamininas presentes nas fibras nervosas nos tempos estudados

#### **5.1.2.8 Espessamento da laminina presente nas membranas basais dos ácinos e presença de conglomerados desta proteína**

O grupo controle e os subgrupos 4, 8 e 12 horas apresentaram, respectivamente, medianas iguais a 0, 1, 2 e 3. O subgrupo 24 horas, por sua vez apresentou mediana igual a 2, enquanto os subgrupos 48 e 72 horas tiveram mediana correspondente a 3. Foi detectada diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o subgrupo 72 horas ( $p= 0.0315$ ).

*Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

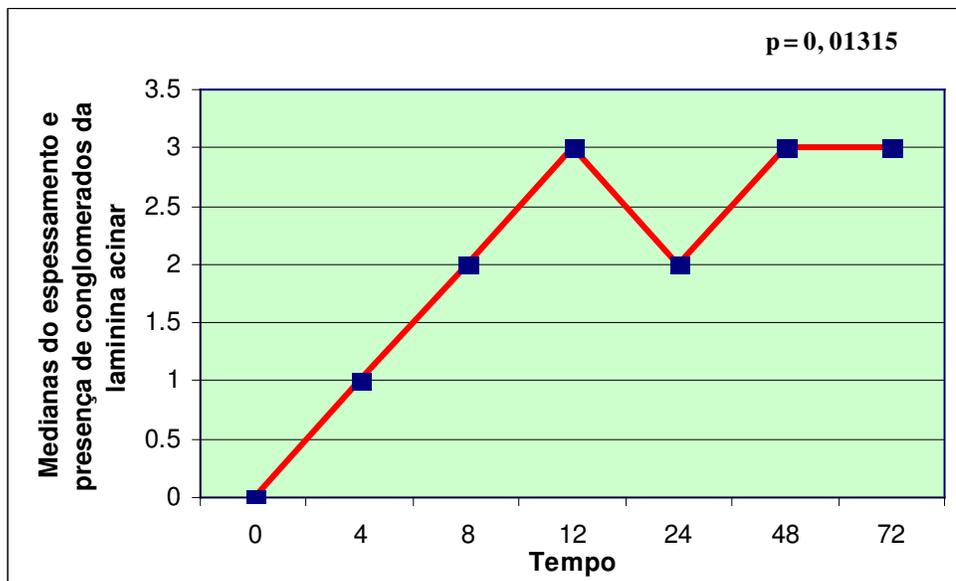


Figura 35 – Intensidade do espessamento e presença de conglomerados de laminina nos diversos tempos estudados

Sabendo-se que os gráficos apresentados foram construídos por meio das medianas de cada estrutura estudada, nos diferentes tempos de avaliação, foi construída uma tabela com as medianas, mínimos e máximos de cada grupo, estando incluídas todas as estruturas glandulares avaliadas.

*Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

**Tabela 1**

Mediana, mínimo e máximo dos grupos estudados

Tempo	Mediana	Mínimo	Máximo
Controle	2	0	3
4 horas	3	1	3
8 horas	2	1	3
12 horas	3	2	3
24 horas	3	1	3
48 horas	3	1	3
72 horas	3	2	3

## 5.2.2 Kappa

O Kappa é uma medida de concordância interobservador e mede o grau de concordância além do que seria esperado tão somente pelo acaso. Para todos os resultados obtidos neste estudo, foi estimado um intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 2**

Avaliação do grau de concordância interobservadores por meio do teste de Kappa

Observadores	Kappa
Observador 1 x Observador 2	0,7221
Observador 2 x Observador 3	0,6424
Observador 1 x Observador 3	0,6424

Os resultados demonstram boa concordância interobservadores.

## **6 DISCUSSÃO**

Estudos a respeito da embriogênese e histogênese de glândulas salivares indicam que a maior parte do desenvolvimento, da regeneração e do reparo das células acinares não são alcançados pela divisão dos próprios ácinos, mas pela proliferação e diferenciação das células epiteliais dos ductos intercalares (Stephens *et al.*, 1989a; Peter *et al.*, 1994a). Devido a estas características, as células acinares não deveriam ser muito radiosensíveis e era de se esperar que sua resposta à radiação ionizante ocorresse vagarosamente. Entretanto, as rápidas alterações presentes no fluxo e na composição das salivas de pacientes irradiados indicam que o tecido glandular responde de forma aguda aos efeitos deletérios da radiação.

Quando classificados em ordem decrescente de radiosensibilidade, os tecidos podem ser divididos em seis grupos: tecidos vegetativos intermitóticos, tecidos intermitóticos em diferenciação, tecidos conjuntivos multipotenciais, tecidos pós-mitóticos reversíveis e tecidos pós-mitóticos fixos. As células acinares e os ductos das glândulas salivares estão posicionados na categoria dos tecidos pós-mitóticos reversíveis, constituindo, portanto, o segundo grupo mais radorresistente da classificação. Seu índice mitótico é baixo e apresentam características evidentes de células altamente diferenciadas (Rubin & Casarett, 1968).

## *Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

Sob o ponto de vista radiobiológico, a suposta radiorresistência das glândulas salivares opõe-se drasticamente aos diversos efeitos colaterais apresentados clinicamente por pacientes submetidos à radioterapia. Uma possível explicação para tal enigma encontra-se no fato de as células epiteliais serosas encontrarem-se repletas de grânulos de secreção. Estes são ricos em enzimas proteolíticas e metais pesados, como o zinco, o manganês, o ferro e o cobre, que promovem reações de oxi-redução e catalizam a peroxidação lipídica provocada pela radiação ionizante. Ao potencializar os efeitos radioativos, estes metais provocam a ruptura das membranas dos grânulos de secreção, promovendo, desta forma, o extravasamento de enzimas proteolíticas dentro do citoplasma e, conseqüentemente, a autólise e morte celular (Abok *et al.*, 1984).

As células serosas têm polaridade, isto é apresentam um ápice e uma base. O ápice é a região de liberação das secreções para o lúmen dos ácinos, enquanto a base é a porção da membrana celular que está em contato com as células mioepiteliais e a membrana basal. Na região basolateral situam-se os receptores hormonais, juntamente com canais iônicos que controlam a estrutura e a função das células (Stephens *et al.*, 1989a). Quando os radicais livres produzidos pelas radiações ionizantes atingem as membranas celulares, causando peroxidação dos lipídios constituintes das mesmas, destroem a integridade das células e podem provocar acúmulos intracelulares prejudiciais de íons cálcio e potássio. Acredita-se, portanto, que as membranas celulares sejam o principal alvo da ação deletéria das radiações ionizantes contra os ácinos serosos (El-Mofty & Kahn, 1981; Akita *et al.*, 1984; Stephens *et al.*, 1989a, 1989b; Nagler, 2002). A hipótese de que as injúrias apresentadas pelas células acinares

pudessem ser secundárias aos danos vasculares foi descartada por diversos autores (Sholley *et al.*, 1974; Stephens *et al.*, 1989a, 1989b).

Existe um consenso entre os autores de que as células serosas são mais radiosensíveis do que as células mucosas (El-Mofty & Kahn, 1981; Abok *et al.*, 1984; Stephens *et al.*, 1989a, 1989b; Peter *et al.*, 1994a, 1994b, 1995; Nagler *et al.*, 1997; Nagler, 2002). Contudo, enquanto alguns associam a radiosensibilidade das células serosas à presença dos grânulos de secreção (Abok *et al.*, 1984; Nagler *et al.*, 1997; Nagler, 2002), outros negam enfaticamente a veracidade desta associação (Peter *et al.*, 1994b, 1995). Um artigo publicado recentemente por Nagler (2002) parece esclarecer o mecanismo enigmático que envolve a radiosensibilidade do tecido glandular. Este autor esclareceu que dos metais contidos nos grânulos de secreção, somente o ferro e o cobre são capazes de promover reações de oxi-redução e catalizar a formação de radicais livres. Os radicais livres formados, por sua vez, podem atingir as membranas celulares, provocando a peroxidação de seus lipídios, ou afetar diretamente o DNA. Desta forma, quando as células necessitam entrar em mitose para promover a reparação do parênquima glandular, sua morte torna-se inevitável. Assim, pode-se afirmar que o DNA é considerado um alvo muito sensível em glândulas salivares irradiadas (Sasaki, 1976).

A escolha da dose de 15 Gy utilizada no presente trabalho deveu-se à afirmação de Vissink *et al.*, em 1990, de que a saturação das alterações funcionais provocadas pela radiação nas glândulas salivares maiores inicia-se com 15 Gy. A dose escolhida segue a metodologia previamente utilizada em diversos trabalhos (Stephens *et al.*, 1986, 1989b; Vissink *et al.*, 1990, 1991; Peter *et al.*, 1994a,

1994b, 1995; Nagler *et al.*, 1997; Tuji, 2004; Pontual, 2005; Ramos, 2005), o que facilita a comparação com os dados existentes na literatura.

Os tempos escolhidos nesta pesquisa tiveram a finalidade de avaliar os efeitos agudos da radiação, uma vez que Stephens *et al.* (1986) afirmaram que ao contrário das manifestações crônicas, as alterações agudas apresentadas por glândulas salivares irradiadas ainda precisavam ser melhor estudadas. Somando-se a este fato, alguns relatos da literatura indicam que o processo de regeneração das glândulas salivares inicia-se no 3<sup>o</sup> (Peter *et al.*, 1994a) ou 8<sup>o</sup> dia após a irradiação (Philips, 1970; Sodicoff *et al.*, 1977). Em resumo, as maiores alterações e a recuperação apresentada por glândulas salivares irradiadas ocorrem durante os dez primeiros dias após os animais terem sido irradiados.

Em concordância com o primeiro estágio do estudo de Phillips (1970) e com os trabalhos de Berdjis (1960), Stephens *et al.* (1986) e Paardekooper *et al.* (1998), no presente trabalho observou-se a presença de severa atrofia dos ácinos serosos em todos os subgrupos estudados, especialmente no subgrupo 24 horas. A análise subjetiva também demonstrou a presença de alterações nucleares, podendo ser observada uma quantidade abundante de núcleos com cariólises e cariorrexes no subgrupo 8 horas. As vacuolizações citoplasmáticas, por sua vez, estavam presentes de forma significativa no subgrupo 12 horas. Da mesma forma, Stephens *et al.* (1986) identificaram a presença das três figuras de necrose nuclear (picnose, cariólise e cariorrexe) e de vacúolos nas células serosas 12 e 24 horas após a irradiação de glândulas parótidas de macacos, enquanto Vissink *et al.* (1991) observaram picnose, assim como vacuolizações, no 3<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> dias após a dose local de 15 Gy ter sido administrada à glândulas submandibulares de ratos.

## *Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

Os ductos intercalares, estriados e excretorios avaliados neste trabalho apresentaram aspecto normal e mostraram-se radorresistentes, corroborando os estudos de Sholley *et al.* (1974) e El-Mofty & Kahn (1981). Por outro lado, Chomette *et al.* (1981) relataram a presença de pequenas áreas de necrose na região dos ductos estriados no 3<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> dias após a irradiação de glândulas submandibulares, ao passo que Peter *et al.* (1994b) encontraram aberrações nucleares nos ductos intercalares de glândulas parótidas irradiadas com dose local de 15 Gy de radiação X, tendo sua maior incidência sido verificada 12 horas e 1 dia após a irradiação.

Espera-se que glândulas salivares irradiadas apresentem um infiltrado inflamatório considerável, conforme foi relatado por Stephens *et al.* (1986), que verificaram a presença de um intenso infiltrado inflamatório em seus estudos envolvendo glândulas parótidas de macacos irradiados. O presente trabalho, no entanto, apresentou resultados semelhantes aos relatados por Vissink *et al.* (1991) e Paardekooper *et al.* (1998), nos quais foi relatada a presença de um infiltrado muito suave. Acredita-se que estes resultados sejam decorrentes da maior radorresistência glandular dos ratos em relação aos macacos.

Considerando-se os tempos de estudo nos quais as alterações causadas pela radiação foram mais intensas, este trabalho é respaldado pelos estudos de Tuji (2004) e Pontual (2005) realizados, respectivamente, em glândulas parótidas e submandibulares de ratos. Se no presente estudo os subgrupos 12 e 24 horas foram os que apresentaram maior destruição, em outros trabalhos a expressão máxima das alterações agudas radioinduzidas foram verificadas 24 horas (Stephens *et al.*, 1986), 72 horas (Vissink *et al.*, 1991) e 6 dias após a irradiação (Chomette *et al.*, 1981). Em relação ao início do processo

de reparo, os subgrupos 24, 48 e 72 horas mostraram-se mais organizados e com indícios de recuperação, estando estes achados de acordo com os resultados encontrados por Tuji (2004) e Pontual (2005). Apesar de a atrofia acinar ter sido preponderante no subgrupo 24 horas em relação a todos os outros subgrupos estudados, considera-se que o processo de reorganização do tecido glandular tenha se iniciado neste tempo, uma vez que 24 horas após a irradiação as figuras de necrose nuclear (cariólises e cariorrexes) e vacuolizações citoplasmáticas deixaram de ser abundantes.

Sabendo-se que as alterações histomorfológicas e ultra-estruturais (Berdjjs, 1960; Phillips, 1970; Sholley *et al.*, 1974; Sasaki, 1976; Chomette *et al.*, 1981; El-Mofty & Kahn, 1981; Stephens *et al.*, 1986; Vissink *et al.*, 1991; Paardekooper *et al.*, 1998; Tuji, 2004; Pontual, 2005), assim como as alterações fisiológicas (Sodicoff *et al.*, 1977; Balzi *et al.*, 1979; Anderson *et al.*, 1981; Akita *et al.*, 1984, Vissink *et al.*, 1990; Ramos, 2005) apresentadas por glândulas salivares irradiadas estão relativamente bem documentadas na literatura científica e preocupados com o fato de que, sob o ponto de vista da anatomia patológica, as membranas basais podem ser consideradas barreiras estruturais para a invasão e o comportamento metastático de alguns tumores (Caselitz *et al.*, 1988; D'Ardenne, 1989), decidiu-se por avaliar esta estrutura em glândulas parótidas de ratos irradiados.

Dentre os constituintes da membrana basal, um interesse especial tem sido dado à laminina. Esta glicoproteína é o componente mais abundante da referida membrana (Mc Arthur *et al.*, 1993, 1997) e pode ser sintetizada por células epiteliais, endoteliais, musculares e alguns fibroblastos, desempenhando funções que abrangem a proliferação, a adesão e a migração tanto de células

normais como tumorais. Adicionalmente, considera-se que a laminina desempenhe uma função importante na morfogênese epitelial (Durbeej & Ekblom, 1997), na diferenciação dos neurônios (Edgar, 1991), na diferenciação das células endoteliais (Rose *et al.*, 1999) e na neoformação vascular (Giannopoulou *et al.*, 2001)

Um dos maiores questionamentos envolvendo essa proteína diz respeito ao fato de ela conseguir desempenhar papéis tão diferentes, em tecidos distintos e em estágios de desenvolvimento também diversificados. Provavelmente, a explicação para este questionamento esteja na composição da própria molécula. Está bem estabelecido na literatura que a laminina pertence a uma família de glicoproteínas extracelulares compostas por três cadeias ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) e muitas subunidades geneticamente distintas ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_4$ ,  $\gamma_1$  e  $\gamma_2$ ). Um dos maiores avanços em relação às pesquisas envolvendo esta proteína corresponde à identificação de suas novas cadeias. Descobertas recentes têm demonstrado a existência de uma variedade de isoformas antes desconhecidas, o que em parte explica as diversas funções desempenhadas pelas membranas basais (Tryggvason, 1993; Strassburger *et al.*, 1998).

As alterações radioinduzidas apresentadas pela laminina podem se manifestar na forma de descontinuidade (Ehrhart *et al.*, 1996), modificações na sua quantidade (Rosenkrans & Penney, 1987; Giannopoulou *et al.*, 2001), aumento de sua intensidade de marcação (Bartel-Friedrich *et al.*, 1999, 2000; Friedrich *et al.*, 2002), espessamento (Ehrhart *et al.*, 1996; Bartel-Friedrich *et al.*, 2000) e presença de conglomerados (Gustafsson *et al.*, 1998; Bartel-Friedrich *et al.*, 2000; Friedrich *et al.*, 2002). No presente estudo, não foi verificada a presença de descontinuidade e não foram detectadas diferenças estatisticamente

significantes entre a intensidade de marcação da laminina presente nos grupos controle e irradiado, estando de acordo com os trabalhos de Bartel-Friedrich *et al.* (2000) e Friedrich *et al.* (2002), nos quais a marcação da laminina irradiada com doses de até 20 Gy não diferiu significativamente do grupo controle.

Entretanto, comparando-se cada subgrupo com o grupo controle, observou-se o espessamento da proteína laminina presente nas membranas basais dos ácinos do subgrupo 72 horas mostrou-se estatisticamente diferente do grupo controle ( $p = 0,0315$ ), corroborando os achados de Ehrhart *et al.* (1996), que verificaram a presença de espessamento da laminina glandular do 1º ao 9º dia após a irradiação e Bartel-Friedrich *et al.* (2000), os quais observaram espessamento 6 meses e 1 ano após os animais terem sido irradiados.

A presença de acúmulos ou conglomerados de laminina nas regiões de necrose acinar caracterizou os trabalhos de Gustafsson *et al.* (1998), Bartel-Friedrich *et al.* (2000) e Friedrich *et al.* (2002). Existem poucos trabalhos na literatura científica escrita em língua inglesa que retrataram tal acúmulo. Neste estudo, estes conglomerados também foram identificados nas regiões de atrofia acinar e o subgrupo 72 horas mostrou-se estatisticamente diferente do grupo controle ( $p = 0,0315$ ). Entretanto, diferentemente dos autores citados, utilizou-se uma dose única e menor de radiação, sendo que nos demais trabalhos foram utilizadas doses fracionadas de até 60 Gy, e somente os efeitos agudos foram avaliados, contradizendo definitivamente a afirmação de Gustafsson *et al.* (1998) de que as proteínas da matriz extracelular são radiorresistentes e incapazes de manifestar alterações agudas. Foram consideradas regiões de conglomerados aquelas caracterizadas por um acúmulo isolado da proteína laminina, ao passo que o espessamento era uniforme e circundava completamente os ácinos.

Vale salientar que este estudo teve como último tempo avaliado 72 horas, sendo este o único subgrupo que apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle, no que diz respeito ao espessamento e presença de conglomerados de laminina. Nas pesquisas realizadas por McArthur *et al.* (1993, 1997), estudando glândulas salivares labiais de pacientes com Síndrome de Sjögren e sialoadenite não-específica, respectivamente, foi observado um aumento considerável na intensidade de marcação da laminina. Os autores sugeriram que esta proteína possa ser mediadora do processo inflamatório linfocítico envolvendo glândulas salivares de pacientes com Síndrome de Sjögren. Pacientes com esta síndrome têm como uma das alterações a redução do fluxo salivar. Esta alteração também é uma seqüela de indivíduos submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço. Assim, pode ser que a redução do fluxo salivar seja decorrente da presença de acúmulos ou conglomerados de laminina em glândulas irradiadas e que este fator também possa estar presente em tempos maiores que 72 horas após a irradiação, o que não foi avaliado nesta pesquisa.

Acredita-se, atualmente, que o espessamento da laminina irradiada seja provocado pela ativação radioinduzida do fator de crescimento beta (TGF $\beta$ ), já tendo sido demonstrada a superexpressão deste fator na 1<sup>a</sup> hora após a irradiação (Barcellos-Hoff, 1993). O TGF $\beta$  está intimamente relacionado à reparação tecidual, à regulação da deposição das proteínas da matriz extracelular e ao próprio crescimento celular. Quando exposto à radiação, é ativado e promove o aumento da deposição de várias proteínas da matriz, dentre elas a laminina (Barcellos-Hoff, 1993; Ehrhart *et al.*, 1996). Desta forma, o espessamento e a presença de conglomerados de laminina, verificados no subgrupo 72 horas do presente estudo, podem ser decorrentes de uma maior quantidade de laminina depositada pelo TGF $\beta$  ativado.

Outra possível explicação para tal fenômeno pode ser aquela que foi proposta por Penney & Rosenkrans (1984). Segundo estes autores, a radiação provoca a destruição dos sítios aniônicos presentes nas glicoproteínas da matriz. Estes sítios correspondem aos carboidratos presentes nestas glicoproteínas que, ao serem destruídos, causam o aumento da porosidade da membrana basal. Conseqüentemente, essas proteínas iniciam um processo proliferativo e a membrana torna-se espessa.

À vista das duas hipóteses citadas anteriormente, considera-se que o aumento de espessura da laminina irradiada possa constituir um processo de remodelamento da matriz extracelular (Costes *et al.*, 2000) O remodelamento pode ser tanto um processo fisiológico, ocorrendo durante os vários estágios da embriogênese, quanto um processo patológico, sendo evidente durante a carcinogênese (Ehrhart *et al.*, 1996). Portanto, a compreensão dos efeitos agudos das radiações ionizantes pode ser a chave para o entendimento de muitos de seus efeitos tardios, como o câncer.

A junção dos componentes insolúveis da matriz extracelular, dos fatores de crescimento solúveis e das citoquinas formam o chamado microambiente. Conforme foi citado por Ehrhart *et al.* (1996), o microambiente é considerado um determinante crítico dos processos fisiológicos normais que ocorrem no organismo, uma vez que modula as interações entre as células. Conseqüentemente, a manutenção da integridade de seus componentes é fundamental para o bom funcionamento orgânico. Esses autores sugeriram que as alterações radioinduzidas provocadas no microambiente podem promover a carcinogênese.

*Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

---

Pelo exposto, pode-se afirmar que apesar dos imensuráveis benefícios oriundos da radioterapia como modalidade terapêutica dos tumores de cabeça e pescoço, a inclusão das glândulas salivares no campo de irradiação submete-as a diversos efeitos colaterais. Recomenda-se, portanto, o monitoramento periódico e criterioso de pacientes submetidos ao tratamento radioterápico, sendo esta a única forma de se manter os efeitos benéficos da radioterapia e minimizar os malefícios causados pela mesma.

## **7 CONCLUSÕES**

De acordo com os resultados obtidos e dentro das condições experimentais empregadas neste trabalho, foi possível concluir que:

- As principais alterações morfológicas foram: figuras de necrose nuclear (cariólises e cariorrexes), vacuolizações e severa atrofia dos ácinos;
- No que diz respeito à intensidade de marcação da laminina, não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo controle e o grupo irradiado para nenhuma das estruturas avaliadas;
- A radiação causou o espessamento da laminina presente nas membranas basais acinares, juntamente com o surgimento de conglomerados desta proteína.

## Referências

Abok K, Brunk U, Jung B, Ericsson J. Morphologic and histochemical studies on the differing radiosensitivity of ductular and acinar cells of the rat submandibular gland.

**Virchows Arch B Cell Pathol.** 1984; 45(4): 443-60.

Akita S, Nagayama M, Kaneda T, Oka T, Ohishi N, Yagi K. Effects of  $\gamma$ -ray irradiation on superoxide dismutase activity and lipid peroxidase level in mouse salivary glands. **J Appl Biochem.** 1984; 6(1-2): 64-9.

Anderson MW, Izutsu KT, Rice JC. Parotid gland pathophysiology after mixed gamma and neutron irradiation of cancer patients. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1981, 52(5): 495-500.

Baker DG. The radiobiological basis for tissue reactions in the oral cavity following therapeutic x-irradiation. **Arch Otolaryngol.** 1982; 108(1): 21-4.

Balzi M, Cremonini D, Tomassi I, Becciolini A, Giannardi G, Pelu G. Radiation effects on the parotid gland of mammals. Part 2: Modifications of plasma and parotid amylase activity. **Strahlentherapie.** 1979; 155(8): 566-9.

*Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

---

Barcellos-Hoff MH. Radiation-induced transforming growth factor beta and subsequent extracellular matrix reorganization in murine mammary gland. **Cancer Res.** 1993; 53(17): 3880-6.

Bartel-Friedrich S, Friedrich RE, Lautenschlager C., Holzhausen HJ. Dose-response relationship and the effect of age and latency period on the expression profile of laminin in irradiated rat mandibular glands. **Anticancer Res.** 2000; 20(6D): 5221-8.

Bartel-Friedrich S, Friedrich RE, Moll R, Lautenschlager C. Immunohistochemical detection of extracellular matrix proteins in the irradiated rat mandibular gland. **Anticancer Res.** 1999; 19(4A): 2779-84.

Berdjjs CC. Irradiation as a cause of "masculinization" in submaxillary glands. **Br J Exp Pathol.** 1960; XLII(1): 38-42.

Caselitz J, Schmitt P, Seifert G, Wustrow J, Schuppan D. Basal membrane associated substances in human salivary glands and salivary gland tumors. **Path Res Pract.** 1988; 183(4): 386-94.

Chomette G, Auriol M, Vaillant JM, Bertrand JC, Chenal C. Effects of irradiation on the submandibular gland of the rat. An enzyme histochemical and ultrastructural study. **Virchows Arch A Pathol Anat Histol.** 1981; 391(3): 291-9.

*Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

---

Costes S, Streuli CH, Barcellos-Hoff MH. Quantitative image analysis of laminin immunoreactivity in skin basement membrane irradiated with 1 GeV/nucleon iron particles. **Radiation Res.** 2000; 154(4): 389-97.

D'Ardenne AJ. Use of basement membrane markers in tumor diagnosis. **J Clin Pathol.** 1989; 42(5): 449-57.

Durbeej M, Ekblom P. Dystroglycan and laminins: glycoconjugates involved in branching epithelial morphogenesis. **Exp Lung Res.** 1997;23(2): 109-18.

Edgar D. The expression and distribution of laminin in the developing nervous system. **J Cell Sci Suppl.** 1991;15: 9-12.

Ehrhart EJ, Gillette EL, Barcellos-Hoff MH. Immunohistochemical evidence of rapid extracellular matrix remodeling after iron-particle irradiation of mouse mammary gland. **Radiat Res.** 1996; 145(2): 157-62.

El-Mofty SK, Kahn AJ. Early membrane injury in lethally irradiated salivary gland cells. **Int J Radiat Biol.** 1981;39(1): 55-62.

Friedrich RE, Bartel-Friedrich S, Holzhausen HJ, Lautenschlager C. The effect of external fractionated irradiation on the distribution pattern of extracellular matrix proteins in submandibular salivary glands of the rat. **J Craniomaxillofac Surg.** 2002; 30(4): 246-54.

*Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

---

Giannopoulou E, Katsoris P, Hatziapostolou M, Kardamakis D, Kotsaki E, Polytarchou C *et al.* X-rays modulate extracellular matrix in vivo. **Int J Cancer.** 2001; 94(5): 690-8.

Gustafsson H, Aalto Y, Franzen L, Thornell L, Henriksson, R. Effects of fractionated irradiation on the cytoskeleton and basal lamina in parotid glands - an immunohistochemical study. **Acta Oncol.** 1998; 37(1): 33-40.

Hand AR. Glândulas salivares. *In:* Bhaskar SN. **Histologia e embriologia oral de Orban.** 10. ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1989. p. 353-87.

Junqueira LC, Carneiro J. **Biologia Celular e Molecular.** 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 233-43.

McArthur CP, Fox NW, Kragel P. Monoclonal antibody detection of laminin in minor salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. **Autoimmun.** 1993; 6(5): 649-61.

McArthur CP, Daniels PJ, Kragel P, Howard PF, Julian L. Sjogren's syndrome salivary gland immunopathology: increased laminin expression precedes lymphocytic infiltration. **J Autoimmun.** 1997; 10(1): 59-65.

Nagler RM. The enigmatic mechanism of irradiation-induced damage to the major salivary glands. **Oral Dis.** 2002; 8(3): 141-6.

*Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

---

Nagler RM, Marmary Y, Fox PC, Baum BJ, Har-El R, Chevion M. Irradiation-induced damage to the salivary glands: the role of redox-active iron and copper. **Radiat Res.** 1997; 147(4): 468-76.

Paardekooper GMRM, Cammelli S, Zeilstra LJW, Coppes RP, Konings AWT. Radiation-induced apoptosis in relation to acute impairment of rat salivary gland function. **Int J Radiat Biol.** 1998; 73(6): 641-8.

Penney DP, Rosenkrans WA Jr. Cell-cell matrix interactions in induced lung injury . I. The effects of X-irradiation on basal laminar proteoglycans. **Radiation Res.** 1984; 99(2): 410-9.

Peter B, Van Waarde MAWH, Vissink A, 's-Gravenmade EJ, Konings AWT. Radiation-induced cell proliferation in the parotid and submandibular glands of the rat. **Radiation Res.** 1994a; 140(2): 257-65.

Peter B, Van Waarde MAWH, Vissink A, 's-Gravenmade EJ, Konings AWT. The role of secretory granules in the radiosensitivity of rat salivary gland acini – a morphological study. **Radiation Res.** 1994b; 140(3): 419-28.

Peter B, Van Waarde MAWH, Vissink A, 's-Gravenmade EJ, Konings AWT. The role of secretory granules in radiation-induced dysfunction of rat salivary glands. **Radiat Res.** 1995; 141(2): 176-82.

Phillips RM. X-ray induced changes in function and structure of the rat parotid gland. **J Oral Surg.** 1970; 28(6): 432-7.

*Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

---

Pontual MLA. **Efeito radioprotetor do selenito de sódio em glândulas submandibulares de ratos** [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2005.

Ramos FMM. **Evaluation of radioprotective effect of vitamin E in salivary dysfunction in irradiated rats** [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2005.

Rose RW, O'Hara MD, Williamson SK, Grant DS. The role of laminin-1 in the modulation of radiation damage in endothelial cells and differentiation. **Radiat Res.** 1999, 152(1): 14-28.

Rosenkrans WA Jr, Penney DP. Cell-Cell matrix interactions in induced lung injury. IV. Quantitative alterations in pulmonary fibronectin and laminin following x irradiation. **Radiat Res.** 1987, 109(1): 127-42.

Rubin P; Casarett GW. Clinical radiation pathology as applied to curative radiotherapy. **Cancer.** 1968; 22(4): 767-78.

Sasaki T. Latent and persistent lethal injury in mouse salivary gland cells following gamma irradiation. **Radiat Res.** 1976; 67(1): 104-13.

Sholley MM, Sodicoff M, Pratt NE. Early radiation injury in the rat parotid gland. Reaction of acinar cells and vascular endothelium. **Lab Invest.** 1974; 31(4): 340-54.

*Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

---

Sodicoff M, Pratt NE, Trepper P, Sholley MM, Hoffenberg S. Effects of x-irradiation and the resultant inanition on the amylase content of the rat parotid gland. **Arch Oral Biol.** 1977; 22(4): 261-7.

Stephens LC, Schultheiss TE, Ang KK, Peters LJ. Pathogenesis of radiation injury to the salivary glands and potential methods of protection. **Cancer Bull.** 1989a; 41(2): 106-114.

Stephens LC, King GK, Peters LJ, Ang KK, Schultheiss TE, Jardine JH. Acute and late radiation injury in Rhesus parotid glands. Evidence of interphase cell death. **Am J Pathol.** 1986; 124(3): 469-78.

Stephens LC, Schultheiss TE, Small SM, Ang KK, Peters LJ. Response of parotid gland organ culture to radiation. **Radiation Res.** 1989b; 120(1): 140-153.

Stevens A, Lowe J. **Histologia Humana.** São Paulo: Manole; 2001. p. 49-64.

Strassburger S, Berndt A, Hyckel P, Katenkamp D, Kosmehl H. Differential expression of laminin chains in the human major salivary gland. **Histochem J.** 1998; 30(2): 81-8.

Tryggvason K. The laminin family. **Curr Opin Cell Biol.** 1993; 5(5): 877-82.

Tuji FM. **Avaliação do efeito radioprotetor do selenito de sódio em glândulas parótidas de ratos** [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2004.

*Avaliação morfológica e imunohistoquímica dos efeitos agudos da radiação gama em glândulas parótidas de ratos*

---

---

Vissink A, 's-Gravenmade EJ, Ligeon EE, Konings AWT. A functional and chemical study of radiation effects on rat parotid and submandibular/sublingual glands. **Radiation Res.** 1990; 124(3): 259-65.

Vissink A, Kalicharan D, 's-Gravenmade EJ, Jongebloed WL, Ligeon EE, Nieuwenhuis P *et al.* Acute irradiation effects on morphology and function of rat submandibular glands. **J Oral Pathol Med.** 1991; 20(9): 449-56.

## Anexo



Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **572-1**, sobre "**INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO GAMA NA DISTRIBUIÇÃO DE ESPESSURA DA LAMININA PRESENTE NAS GLÂNDULAS SALIVARES DE RATOS DE DIFERENTES IDADES**" sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Solange Maria de Almeida / Andréa de Castro Domingos** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 1º. de Agosto de 2003.

### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **572-1**, entitled "**INFLUENCE OF THE GAMMA RADIATION ON THE DISTRIBUTION AND THICKNESS ON THE LAMININ PRESENT IN THE SALIVARY GLANDS OF RATS WITH DIFFERENT AGES**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on August 1<sup>st</sup>, 2003.

Campinas, 29 de Novembro de 2004.

**2ª. VIA**

Profa. Dra. Liana Verinaud  
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso  
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP