

ARMANDO MANCIO DE CAMARGO

ESTUDO HISTOLÓGICO, HISTOQUÍMICO E ULTRA-ESTRUTURAL  
DOS EFEITOS DA DIABETES ESPONTÂNEA E INDUZIDA PELA  
ALOXANA OU ESTREPTOZOTOCINA SOBRE AS GLÂNDULAS  
SUBMANDIBULARES DE CAMUNDONGO

Tese de Livre-Docência apresentada  
no Departamento de Anatomia  
do Instituto de Biologia  
da Universidade Estadual de  
Campinas.

Campinas - SP - Brasil

1984

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

À

Ester, minha esposa

Silvia, minha filha

André, meu filho

pela compreensão e apoio  
pelo amor e incentivo  
pela razão de continuar.

COMISSÃO JULGADORA

---

---

---

---

---

## AGRADECIMENTOS

Externamos aqui nossos agradecimentos ao Prof. Dr. João Baptista Parolari, mestre exemplar e amigo, pelas oportunidades que sempre proporcionou, para alcançarmos os objetivos alme  
jados.

A Profa. Dra. Vilma Cloris de Carvalho, Chefe do Departamen  
to de Anatomia do Instituto de Biologia da Universidade Esta  
dual de Campinas, pelo apoio e confiança que sempre nos de  
dicou.

Ao Dr. Jacob S. Hanker, Professor da University of North Ca  
rolina at Chapel Hill, NC, USA e Professor Associado Adjunto de Patologia da Duke University Medical Center, Durham, NC, USA, pela amável acolhida, e pelos 18 meses que passamos em seu Laboratório, onde recebemos amizade, conhecimentos e treinamentos em citoquímica ultra-estrutural e microscopia e letrônica de enzimas. Agradecemos também pela sugestão deste trabalho e por permitir a execução dos estudos preliminares realizados em seu Laboratório.

*To Dr. Jacob S. Hanker, Professor of the University of North Carolina at Chapel Hill, NC, USA, and Adjunct Associate Professor of Pathology, Duke University Medical Center, Durham, NC, USA, for the friendly reception and for the eighteen months that we spent in your Laboratory, where I received*

friendship and experience in ultra-structural cytochemistry and electron microscopy of enzymes. I also thank the suggestion of the present paper and for facilitating the execution of the preliminary studies performed in his Laboratory.

Ao Wallace W. Ambrose, Peggy Yates, Teresa Jarvis West e Dell Dorgan, Pesquisadores do Dental Research Center, University of North Carolina at Chapel Hill, NC, USA, pela amizade e toda colaboração recebida durante nosso estágio naquela Universidade.

To Wallace W. Ambrose, Peggy Yates, Teresa Jarvis West and Dell Dorgan, Researchers of the Dental Research Center, University of North Carolina at Chapel Hill, NS, USA, for the friendship and all collaboration that I received during my period of training in that University.

Ao Dr. José Merzel, Professor Titular do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, mestre e amigo, pela confiança, pelo apoio e pelo respeito com que sempre nos distinguiu. Suas valiosas sugestões, foram significativas, quando da realização deste trabalho.

Ao Dr. Bruno Kühnig Junior, Professor Adjunto do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, colega e amigo de todas as horas, pela confiança, pelo apoio e pelo incentivo que sempre nos emprestou. Com igual dedicação

deu-nos valiosas sugestões e efetiva colaboração na interpretação das eletron-fotomicrografias.

Ao Prof. Marconi Freire Montezuma, pela valiosa colaboração e sugestões quando da confecção desta tese.

Ao Prof. Francisco Alcilone de Aragão, pela correção da redação deste trabalho.

Ao Dr. José Antonio Cordeiro, Professor do Departamento de Estatística do IMECC da Universidade Estadual de Campinas, pela valiosa orientação da análise estatística.

Aos colegas do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, pela compreensão quando da execução deste trabalho.

Ao Sr. Pedro Gimenez Gomez, pelo empenho e dedicação que sempre demonstrou na elaboração da documentação fotográfica.

À Sra. Anna Gagliardi, pela valiosa colaboração na organização da Bibliografia.

À Srta. Victalina Molisani e à Srta. Vera Lucia Gonçalves pela colaboração e esmero no serviço de datilografia.

*Esta pesquisa foi financiada, em sua fase preliminar, pelos USPHS ( USA ) grants DE-04370, DE-02668, RR-05333 e pela FAPESP, Bolsa de Pós-Doutorado, Proc. nº 79/1391.*

## ÍNDICE

APRESENTAÇÃO .....	iv
INTRODUÇÃO E LITERATURA .....	1
MATERIAL E MÉTODOS .....	9
RESULTADOS .....	15
Análise da Urina .....	15
Comparação do Peso dos Animais .....	16
Comparação do Peso de Órgãos dos Animais .....	17
Glândula Submandibular .....	19
Estudo histológico à microscopia óptica .....	19
Estudo da inervação parassimpática - <u>Ace</u> tilcolinesterase .....	22
Estudo Ultra-Estrutural .....	24
DISCUSSÃO .....	54
RESUMO .....	69
BIBLIOGRAFIA .....	72

## INTRODUÇÃO E LITERATURA

O estudo da morfologia normal das glândulas submandibulares de camundongos, despertou certo interesse, após a descrição feita por LACASSAGNE ( 1940a ), sobre o dimorfismo sexual que essas glândulas apresentavam. Esses achados foram confirmados posteriormente por vários autores ( FEKETE, 1941 CAUSSE & LACASSAGNE, 1942; JUNQUEIRA et al., 1949 ). Outros estudos foram feitos mostrando que essas diferenças podem desaparecer com a castração ou acentuar-se com a administração de andrôgenos ( LACASSAGNE, 1940c; CHAULIN-SERVINIÈRE, 1942; RAYNAUD, 1944 ). Em ratos, não existe diferença na morfologia das glândulas submandibulares de machos e fêmeas, mas existe uma diferença no nível da atividade proteolítica dos extratos da glândula ( SREEBNY et al. 1955 ).

LACASSAGNE ( 1940a ), encontrou uma predominância de ductos granulosos, parte do sistema do ducto intralobular, em camundongos machos e uma predominância dos ácinos nas fêmeas. Esse autor sugeriu a possibilidade de que o dimorfismo pode ser refletido pelas diferenças nas secreções glandulares. Essa sugestão levou a uma série de estudos que demonstraram níveis de protease em glândulas submandibulares, duas vezes mais altos em machos do que nas fêmeas ( JUNQUEIRA, 1948 ), maior atividade da amilase em saliva de ca

mundongo macho do que em fêmea ( RAYNAUD & REBEYROTTE, 1949 ) e maior atividade amilolítica da glândula submandibular homogenada de macho ( HARVEY, 1957 ).

Apesar das atividades da amilase e protease terem sido detectadas nas glândulas submandibulares de camundongos, não foi precisada a localização exata com relação às estruturas glandulares. JUNQUEIRA et al. ( 1949 ), propuseram os ductos granulosos, os quais são mais extensos e contêm uma maior concentração de granulos secretores nos machos, como local de produção de protease. SREEBNY et al. ( 1955 ) e SREEBNY ( 1960 ), enquanto investigavam variações relacionadas a sexo em níveis de protease, descobriram que a atividade proteolítica por unidade de volume do ducto granuloso era muito maior em ratos machos, FLATLAND et al. ( 1969 ), localizaram a maior parte da atividade de amilase nas células acinosas.

Uma série de outros trabalhos foi realizada sobre a influência de hormônios sexuais nas glândulas submandibulares, para determinar se esta influência era um efeito direto ou efeito de outras secreções endócrinas. CHRETIEN ( 1977 ), observou que, sob circunstâncias normais, o aumento na testosterona que acompanha a puberdade nos machos resulta na diferenciação e hipertrofia dos ductos granulosos dos camundongos machos. Esse autor observou também que uma das características do desenvolvimento afetadas pelo hipogonadismo nos camundongos diabéticos foi a diferenciação celular nas glândulas submandibulares de camundongos machos.

A relação entre a diabetes e as glândulas salivares tem sido estudada sob vários pontos de vista. COHEN ( 1947 ) observou um aumento da incidência da cárie dental em pacientes diabéticos. Após esse estudo, vários pesquisadores passaram a investigar o papel das glândulas salivares na produção de cáries ( KLAPPER, 1956; SREEBNY et al., 1959 ). A incidência de doença periodontal é acentuadamente maior em pacientes diabéticos ( BELTING et al., 1964 ). Isso pode ser devido, em parte, a complicações vasculares que frequentemente acompanham a diabetes, mas é certamente agravado pela frequente diminuição da secreção salivar, resultando em boca seca ( xerostomia ), também encontrada em diabéticos ( SHEPARD, 1942; BANKS, 1945; AMIES & PARK, 1948; SHERIDAN et al. 1959; BERTRAM, 1967; CONNER et al., 1970 ). A diminuição da secreção salivar pode ser, em princípio, neurogênica, resultante de uma neuropatia autônoma, ou pode ser devida à atrofia ou hipofunção da glândula, causada pela própria diabetes ( CUTLER et al., 1977 ).

CARSON ( 1979 ) e HANKER et al. ( 1980 ), observaram os efeitos hipogonádicos da diabetes espontânea sobre as glândulas submandibulares e rins de camundongos machos e fêmeas.

A diabetes mellitus é uma doença do metabolismo mediada por um fator genético, caracterizada pela deficiência relativa ou absoluta de insulina, a qual, em sua expressão clínica completamente desenvolvida, caracteriza-se por hiperglicemia, doenças vasculares ( como a aterosclerose e micro-

angiopatia ) e neuropatias.

A administração de insulina permite um bom controle da glicemia, trazendo algum alívio da sintomatologia; porém, muitas das complicações persistem.

A dificuldade de encontrar uma cura bem sucedida para a diabetes tem sido, em grande parte, devida à falta de melhor conhecimento da etiologia da doença, cujo estudo apresenta várias dificuldades : 1) a complexidade de formas da doença, abrangendo um largo espectro de perfis clínicos e subclínicos; 2) a influência da idade, com relação ao início da doença; 3) diversidade nos índices de incidências nos diferentes grupos étnicos e geográficos, que parecem não ter relação definida com fenotipo, dieta ou habitat. Não restam dúvidas de que fatores genéticos desempenham um papel crucial no desenvolvimento da diabetes. Apesar do papel da herança ser controvertido, ( CREUTZFELDT et al., 1976 ), o mecanismo que parece explicar as manifestações da potencialidade diabética inclui uma combinação de uma herança poligênica ou multifatorial e algumas influências ambientais, até agora de conhecimento restrito. Relatos recentes têm sugerido que existe também um componente autoimune para a diabetes ( CARSON, 1979 ).

Em humanos, duas formas clínicas distintas de diabetes são reconhecidas : a diabetes manifestada no adulto, caracterizada por certa estabilidade, obesidade, relativa insensibilidade à insulina e ausência de cetoses, exceto durante complicações agudas ocasionais, e a diabetes juvenil, ma

nifestada na adolescência, caracterizada pela instabilidade, alta sensibilidade à insulina e alta tendência a cetoses ( ELLENBERG & RIFKIN, 1962 ).

Todos os animais modelos utilizados para o estudo da diabetes apresentam hiperglicemia, relativa ou absoluta hipoinsulinemia e obesidade com características metabólicas comuns ( HERBERG & COLEMAN, 1977 ). Contudo, as espécies apresentam diferenças específicas quanto à severidade do de sarranjo metabólico. A resistência à insulina e a hiperglicemia profunda caracteriza a síndrome da doença nos camundon gos diabéticos, como uma das mais severas daquelas encontra das em animais modelos ( CARSON, 1979 ).

O camundongo diabético originou-se de uma mutação espontânea e exibe um distúrbio metabólico semelhante à dia betes mellitus humana, com início na idade adulta.

Animais modelos também são usados para a indução química da diabetes, e drogas como a aloxana e a estrepto zocina, agentes antineoplásticos, são muito tóxicas para as células beta do pâncreas produtoras de insulina. Doses apro priadas desses agentes produzirão animais com uma deficiên cia de insulina semelhante à forma de diabetes do tipo juve nil ( CARSON, 1979 ).

Não se constatou na literatura um estudo definido sobre as mudanças produzidas nas glândulas submandibulares na condição diabética. Uma vez que a glândula submandibular responde às secreções gonadal, pituitária, tiroidal e supra-renal, parece válido suspeitar que a glândula pode responder

ã presença ou ausência da insulina. Os estudos em ratos di  
béticos parecem confirmar essa suspeita.

Contudo, nesse particular, existem relatos na liter  
atura indicando que a glândula submandibular não responde a  
níveis de insulina. SHAFER & MUHLER ( 1960 ) testaram vários  
hormônios e afirmaram que "*a insulina não tem qualquer efeit*  
*o sobre as glândulas salivares*". WILLIAMS & ENSINCK (1966 ),  
relacionaram os tecidos conhecidos que respondem à insulina,  
e, dentre os doze tecidos relacionados, as glândulas salivar  
es não estavam incluídas. Esses autores sugeriram que ou-  
tros estudos devem ser feitos, para determinar a extensão e  
natureza da ação da insulina, se direta ou indireta, em to-  
dos os tecidos.

Os estudos encontrados na literatura, relacionando  
diabetes ou insulina com as glândulas salivares, foram realiz  
ados somente em ratos, os quais mostraram várias diferenças  
das glândulas salivares maiores com as dos camundongos. Prim  
eiro, as glândulas submandibulares dos ratos não produzem  
amilase, mas simplesmente a armazena e excreta ( SCHNEYER &  
SCHNEYER, 1956, 1958, 1960 ). Segundo, os camundongos poss  
uem uma atividade amilolítica muito maior do que os ratos :  
no soro, nas glândulas submandibulares homogenadas e na saliv  
a ( JUNQUEIRA et al., 1949 ). E, finalmente, as glândulas  
submandibulares dos ratos possuem um nível de protease muito  
menor do que as dos camundongos ( SHACKLEFORD & KLAPPER ,  
1962a ). Além disso, dois dos estudos de LIU & LIN ( 1969a,  
b ) sobre crescimento e desenvolvimento das glândulas salivar

res na diabetes induzida pela aloxana e em ratas normais, somente animais fêmeas foram utilizados nessa pesquisa. Dos estudos sobre dimorfismo sexual, foi aceito que a fêmea é menos suscetível à maioria das influências hormonais. Como era esperado, esses autores encontraram poucas mudanças nas glândulas que pudessem ser atribuídas à perda de peso geral do animal. Portanto, a relação significativa da insulina com as glândulas submandibulares parece ser somente aquela de MASI et al., ( 1966 ). Esses autores, estudando o metabolismo da glicose  $C^{14}$  marcada "in vitro", descobriram que a adição de insulina ao meio estimulou significativamente a síntese de mucoproteína em fragmentos de tecidos.

Baseado na literatura apresentada, muitas vezes contraditória e incompleta, torna-se evidente a necessidade de estudar os efeitos da diabetes sobre as glândulas salivares.

As glândulas submandibulares serão o principal objetivo desta pesquisa, e, em face das observações referentes ao animal, serão usados somente camundongos machos normais para a indução da diabetes, através da aloxana e da estreptozotocina. Um estudo paralelo, com finalidade comparativa também será feito, com camundongos machos e fêmeas diabéticos de geração espontânea.

Propõe-se, nesta pesquisa, um estudo morfológico das glândulas submandibulares, em níveis de microscopia óptica e eletrônica, e um estudo da inervação parassimpática, em glândulas submandibulares de camundongos machos diabéti-

cos, por indução química, e de machos e fêmeas diabéticos, de geração espontânea, comparados com a morfologia normal da glândula.

## MATERIAL E MÉTODOS

As experiências foram feitas com camundongos machos heterozigotos C57BL/KsJ db/n normais e homozigotos db/db diabéticos. Esses animais foram obtidos de uma colônia mantida pela criação de heterozigotos para gens diabéticos ( db ), linhagem cujos homozigotos apresentam uma síndrome semelhante à diabetes mellitus humana do adulto. A geração original do camundongo C57BL/KsJ db/n foi obtida do Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA.

Para a indução da diabetes, foram usados 24 camundongos, com três meses de idade, todos machos, pesando aproximadamente 24 gramas cada um. Os animais foram divididos em três lotes de oito animais cada um e mantidos em grupos de dois por gaiola. Durante a experiência, todos os animais receberam alimentação sólida balanceada na forma de grânulos e água ad-libitum.

Foram usados ainda, nesta experiência, três outros lotes, com seis camundongos cada um, sendo um lote composto de animais machos e outro com fêmeas, homozigotos, C57BL/KsJ db/db : todos diabéticos à semelhança da diabetes mellitus humana do adulto. O terceiro lote de camundongos fêmeas C57BL/KsJ db/n normais, serviu para controle e comparação. Todos os animais com três a seis meses de idade. Os machos e

as fêmeas, diabéticos ( db/db ), pesando em média 46 gramas, e as fêmeas normais ( db/n ) pesando em média 26 gramas. Estes lotes foram usados com a finalidade de se fazer um estudo paralelo entre as glândulas submandibulares dos animais diabéticos por indução com aqueles dos homozigotos diabéticos por geração espontânea.

Os agentes diabetogênicos usados foram a aloxana monohidratada ( pfs ) e a estreptozotocina ( pfs ) ( Sigma Chemical Company, Saint Louis, Missouri, USA ).

O primeiro lote de camundongos machos C57BL/KsJ db/n normais recebeu tratamento com aloxana, o segundo lote com estreptozotocina e o terceiro, apenas tampão citrato, o qual serviu para controle e comparação.

O veículo usado para a administração do agente diabetogênico foi o tampão citrato 0,1 M pH 4,4. Cada animal recebeu 5 injeções intraperitoneais, em intervalos de 7 dias cada uma. As duas primeiras doses foram de 75 mg/kg e as três doses restantes, de 150 mg/kg de peso, de aloxana ou estreptozotocina, totalizando 600 mg/kg de peso, para cada animal. O lote controle recebia ao mesmo tempo apenas 0,1 ml de tampão citrato 0,1 M pH 4,4 pela mesma via intraperitoneal.

Para a determinação do estado diabético dos animais, foi usado o Combistix ( Ames Company Division, Miles Laboratories, Inc. Elkhart, Indiana, USA ), que determina a variação aproximada de glicose ( g/100 ml ), proteína ( mg/100 ml ) e pH na urina. A urina foi colhida por compressão manual da bexiga de cada camundongo, e uma gota foi colocada no reagente da fita, mas sempre desprezando a primeira

gota. Após dois segundos, a gota de urina foi removida com papel de filtro. A leitura do resultado foi feita 30 segundos após a aplicação da urina na fita reagente, em comparação com a tabela fornecida.

Quatro testes de urina foram feitos com Combistix, em todos animais, para análise quantitativa de proteína, glicose e pH, durante a semana que antecedeu o início do tratamento com aloxana ou estreptozotocina para servir de controle padrão. Outros 15 testes foram feitos em dias alternados, em todos os animais em experiência durante os 30 dias de tratamento, aplicando-se a mesma técnica e condições, para certificar-se do estado diabético dos animais.

Após 30 dias do início do tratamento e constatado o estado diabético, os camundongos foram anestesiados com éter e fixados in situ por perfusão através do ventrículo esquerdo. A drenagem do sangue e o excesso de fixador foram efetuados através de uma pequena incisão no ventrículo direito. Todos os animais foram sacrificados no período da manhã, entre 9,00 e 12,00 horas.

Com o animal anestesiado, foi aberta a parede anterolateral esquerda do tórax e, através do ventrículo esquerdo, foi injetada rapidamente solução salina até que todo o sangue tivesse sido eliminado, e, em seguida, 2% de paraformaldeído em 0,1 M tampão fosfato pH 7,4. Seguiu-se rapidamente com a retirada das glândulas submandibulares, rins, testículos e glândulas supra-renais.

Os órgãos do lado direito de três animais foram co

locados em solução salina e, sob lupa, foi removido o excesso de gordura e tecido conjuntivo para, rapidamente, serem secos em papel de filtro e, em seguida, pesados e fotografados. Os ôrgãos dos outros cinco animais foram imediatamente cortados sob fixador em tamanhos apropriados para microscopia ôptica, completando-se a fixação por mais 2,5 horas sob imersão em 2% de paraformaldeído em 0,1 M tampão fosfato pH 7,4 e, logo após, foram lavados e conservados em 0,22 M sacarose em 0,1 M tampão fosfato pH 7,4.

Para o estudo histológico rotineiro, fragmentos de glândulas submandibulares fixados em 2% de paraformaldeído 0,1 M tampão fosfato pH 7,4, foram incluídos em parafina, cortados com 5 micrômetros de espessura e corados pela Hematoxilina - Eosina.

Para o estudo histoquímico, fragmentos das glândulas submandibulares, fixados e lavados, foram cortados com 10 micrômetros de espessura em criostato, de acordo com o método de Pearse ( 1968 ), e deixados secar ao ar sobre lamínulas. Os cortes foram conservados afastados da luz solar até serem incubados histoquimicamente.

Pelo fato de não se obter uma boa morfologia do material cortado por congelação e uma melhor penetração de reagentes histoquímicos, procurou-se modificar a técnica usada para " Wafer embedding " de ROMANOVICZ & HANKER ( 1977 ), adaptando-a somente para microscopia ôptica. Em vez da inclusão em resina epoxi ou epon, entre duas lamínulas cobertas com " fluorocarbono " ( 100% Teflon ), os cortes foram monta

dos em lâminas comuns. Com a adaptação da técnica do " Wafer embedding ", pelo autor desta pesquisa, pôde-se trabalhar com cortes não congelados, utilizando-se o Oxford Vibratome-Sectioning System Model G ( 1149 Chess Drive, Foster City, Califórnia, USA ), para, assim, obter-se uma melhor morfologia do tecido e uma melhor penetração do reagente histoquímico na reação para acetilcolinesterase, segundo HANKER et al. ( 1973b ).

Os órgãos do lado esquerdo foram cortados sob fixador em tamanhos apropriados para microscopia eletrônica, completando-se sua fixação por imersão em 3% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído em 0,1 M tampão fosfato pH 7,4, por um período de 2,5 horas, após o que foram lavados e conservados em 0,22 M sacarose em 0,1 M tampão fosfato pH 7,4.

Para o estudo ultra-estrutural, as glândulas submandibulares foram cortadas com 10-15 micrômetros de espessura em um Oxford Vibratome, e os cortes foram incluídos em resina epoxi ou epon de acordo com a técnica do " Wafer embedding " de ROMANOVICZ & HANKER ( 1977 ).

Os " Wafers " foram examinados ao microscópio óptico para determinar a distribuição do produto da reação por todo o tecido e para selecionar as áreas desejadas. Essas áreas foram cortadas do " Wafer " e coladas em blocos suportes para microtomia. Os blocos foram cortados em um ultramicrotomo SORVALL - PORTER BLUM - MT2, com 0,5 a 0,8 micrômetro de espessura. Os cortes semifinos foram feitos com navalha de vidro, montados em lâminas e corados pela técnica de

RICHARDSON et al. ( 1960 ), ( azul de metileno - azur II de Mallory ), para serem examinados e fotografados em microscopia óptica. Em seqüência, cortes ultrafinos foram feitos com navalha de diamante, montados em telas de cobre, p<sup>o</sup>s-contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, e examinados e fotografados, na fase preliminar, em um microscópio eletrônico AEI 801 e, posteriormente, em um EM-9A do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

## RESULTADOS

### Análise da Urina

As fitas reagentes revelaram alterações químicas significantes na urina dos camundongos em experiência. O valor padrão normal de proteínas na urina foi de 33 mg/100 ml, valor esse confirmado durante o tratamento no lote controle, que recebeu apenas injeções de tampão citrato. O lote de animais que recebeu tratamento com aloxana teve um aumento da proteinúria da ordem de 4,5 vezes em relação ao lote controle. O mesmo ocorreu com aqueles animais injetados com estreptozotocina, que apresentaram uma taxa de proteínas na urina 6,0 vezes maior que a dos controles, como mostra a Tabela 1.

As mesmas fitas reagentes mostraram reações negativas para glicose, em todos os animais, nos testes que antecederam o tratamento e naqueles animais que receberam apenas tampão citrato. Os animais que receberam injeções de aloxana ou estreptozotocina, agentes diabetogênicos, apresentaram valores significantes de glicosúria, indicando o estado diabético dos animais, como indica a Tabela 1.

O pH da urina foi constante em todos os animais, tanto antes, como durante o tratamento.

Tabela 1 - Análise da Urina com Fita Reagente ( Combistix )

	Antes do Tratamento ( n = 24 )	Controle ( n = 8 )	Aloxana ( n = 8 )	Estrepto- zotocina ( n = 8 )
Proteína ( mg/100 ml )	34,4 ± 12,4	34,4 ± 12,4	163,8 ± 35,0	205,6 ± 30,1
Glicose ( g/100 ml )	0	0	0,6 ± 0,3	0,8 ± 0,1
pH	6,2	6,3	6,0	6,3

Os valores mostrados são a média de ( n ) animais

#### Proteína

Controle x Aloxana :  $p < 0,0001$

Controle x Estreptozotocina :  $p < 0,0001$

Aloxana x Estreptozotocina :  $p < 0,05$

#### Glicose

Controle x Aloxana :  $p < 0,0001$

Controle x Estreptozotocina :  $p < 0,0001$

Aloxana x Estreptozotocina : não significativa a 27% (  $p < 0,28$  )

#### Comparação do Peso dos Animais

O peso dos animais foi controlado durante toda a experiência e, como pode ser observado na Tabela 2, os camundongos que foram usados para a indução da diabetes tiveram uma perda de peso significativa durante os 30 dias de tratamento. Por outro lado, os animais que receberam apenas tampão citrato, que serviram de controle, tiveram o seu peso

significativamente aumentado.

Tabela 2 - Peso Médio ( em g ) dos Animais Durante o Experimento

	Controle n = 8	Aloxana n = 8	Estreptozotocina n = 8
Peso inicial	24,2 ± 0,9	25,0 ± 0,5	24,3 ± 0,6
Peso no sacrifício ( 30 dias )	27,3 ± 0,6	21,9 ± 0,8	19,3 ± 0,5
Variação	+3	-3	-5

Peso inicial x Peso após 30 dias

Controle x Aloxana : p < 0,0001

Controle x Estreptozotocina : p < 0,0001

Controle x Controle : p < 0,0001

Aloxana x Estreptozotocina ( 30 dias ) : p < 0,0001

#### Comparação do Peso de Órgãos dos Animais

Os animais que foram submetidos à indução da diabetes pela aloxana ou estreptozotocina não só tiveram a perda de peso durante o tratamento, mas alguns de seus órgãos também sofreram uma significativa redução no seu peso e tamanho. As glândulas submandibulares e os rins dos animais tratados com estreptozotocina foram os mais atingidos, com uma redução de peso na ordem de 43,82% e 19,67%, respectivamente. Para os animais tratados com aloxana, foram as glândulas submandibulares e os testículos que tiveram uma redução de peso

maior, em torno de 16,00%. As glândulas supra-renais reagiram de maneira contrária, pois apresentaram um aumento de tamanho e um acréscimo de peso, da ordem de 32,00%, para os animais tratados com aloxana, e de 4,00% para os que receberam estreptozotocina como tratamento ( Tabela 3 ).

Tabela 3 - Peso de Vários Órgãos ( em mg ) de Camundongos db/n

	Controle n = 3	Aloxana n = 3	Estreptozotocina n = 3
Gl. Submandibular	82,6 ± 2,5	69,1 ± 3,0	46,4 ± 2,3
Rim	246,0 ± 10,0	222,3 ± 27,3	197,6 ± 16,1
Testículo	83,4 ± 2,2	70,0 ± 6,8	76,0 ± 1,0
Gl. Supra-Renal	2,5 ± 0,1	3,3 ± 0,3	2,6 ± 0,3

Cada valor é a média do peso do órgão de ( n ) animais.

#### Glândula Submandibular

Controle x Aloxana :  $p < 0,01$

Controle x Estreptozotocina :  $p < 0,001$

Aloxana x Estreptozotocina :  $p << 0,01$

#### Rim

Controle x Aloxana : não significativa a 29% (  $p < 0,30$  )

Controle x Estreptozotocina :  $p < 0,03$

Aloxana x Estreptozotocina : não significativa a 27% (  $p < 0,28$  )

#### Testículo

Controle x Aloxana : não significativa a 8% (  $p < 0,09$  )

Controle x Estreptozotocina :  $p < 0,04$

Aloxana x Estreptozotocina : não significante a 27% (  $p < 0,28$  )

#### Glândula Supra-Renal

Controle x Aloxana : não significante a 6% (  $p < 0,07$  )

Controle x Estreptozotocina : não significante a 53% (  $p < 0,54$  )

Aloxana x Estreptozotocina : não significante a 7% (  $p < 0,08$  )

#### Glândula Submandibular

Antes de descrevermos as observações feitas, será útil fazer uma rápida revisão da histologia desta glândula no camundongo.

A estrutura da glândula submandibular é a de uma glândula túbulo-acinosa e a sua unidade básica inclui células acinosas, ductos intercalados, ductos estriados ( granuloso ) e ductos coletores. Sua porção secretora é constituída por células serosas e mucosas ( seromucosas ). As células serosas apresentam-se na forma de ácinos ou podem associar-se às extremidades dos túbulos mucosos onde as células adquirem a forma semilular.

As observações morfológicas, ao nível de microscopia óptica e microscopia eletrônica, limitam-se a aspectos dos ductos granuloso, ácinos e inervação parassimpática da glândula.

#### Estudo histológico à microscopia óptica

Os ductos granuloso das glândulas submandibulares

de camundongos machos normais ( db/n ) apresentaram um diâmetro relativamente grande, luz ampla e ocupavam, em qualquer campo que se observasse, uma área maior do que a dos ácinos e túbulos mucosos. Os ductos eram formados por células colunares altas com núcleos pequenos, localizados na região basal e citoplasma de aspecto homogêneo, em cortes convencionais corados com HE ( Fig. 1 ). Já em cortes semifinos corados com azul de metileno-azur II de Mallory, observou-se que os dois terços apicais das células eram ocupados por grânulos nítidos de tamanho e forma homogêneos ( Fig. 5 ). Na fêmea normal ( db/n ), o diâmetro e a luz dos ductos eram reduzidos e suas células, menos altas. A quantidade e o tamanho dos grânulos eram bem menores que os dos machos ( Fig. 9 ).

Nos ácinos das glândulas submandibulares de camundongos machos normais ( db/n ) os núcleos estavam localizados na região periférica das células, com os grânulos distribuídos homogeneamente por todo citoplasma ( Fig. 5 ). O mesmo aspecto foi observado nas fêmeas normais ( db/n ), cujos ácinos, entretanto, ocupavam uma área maior que aquela dos ductos granulosos ( Fig. 9 ).

Os ductos granulosos das glândulas submandibulares dos animais tratados com aloxana apresentaram-se reduzidos de tamanho, formados por células colunares baixas com núcleos aumentados de tamanho e, tanto o citoplasma como os núcleos, mostraram-se com aspecto mais frouxo, em cortes corados com HE ( Fig. 2 ). Os cortes semifinos corados com azul de metileno-azur II de Mallory, apresentaram na região basal

do citoplasma alguns vacúolos, com os grânulos localizados mais próximos da região apical, e não tão nítidos como nos controles ( Fig. 6 ).

Os ácinos das glândulas submandibulares dos animais que receberam aloxana, apresentaram-se com aspecto aparentemente normal, com os núcleos localizados na periferia das células, e os grânulos sugerindo uma maior fusão entre si ( Fig. 6 ).

Nos animais tratados com estreptozotocina, os ductos granulosos das glândulas submandibulares, exibiram uma redução de tamanho ainda maior, com a luz chegando quase a desaparecer e, em qualquer campo que se observasse, havia uma predominância da área ocupada pelos ácinos e túbulos mucosos sobre a dos ductos granulosos. Os núcleos estavam localizados mais próximos da região central das células, devido ao seu aumento de volume e por serem as células colunares mais baixas ( Fig. 3 ). Nos cortes semifinos, as alterações foram ainda mais evidentes. O citoplasma das células dos ductos apresentaram grandes vacúolos e áreas degeneradas. Os grânulos ocupavam o terço apical das células e não se mostraram com a mesma nitidez daqueles encontrados nos animais controles ( Fig. 7 ).

Os ácinos desses animais que receberam estreptozotocina, apresentaram-se aparentemente semelhantes àqueles dos animais tratados com aloxana, com exceção do fato de exibirem grandes vacúolos no citoplasma das células, na região ocupada pelos grânulos ( Fig. 7 ).

Os ductos granulosos das glândulas submandibulares dos camundongos machos diabéticos ( db/db ) de geração espontânea, apresentaram-se em cortes corados com HE, bastante reduzidos de tamanho, com células colunares baixas e núcleos localizados na região central das células. A área ocupada pelos ácinos predominava sobre a dos ductos ( Fig. 4 ). Esses aspectos foram semelhantes àqueles encontrados nos animais tratados com estreptozotocina. Em cortes semifinos corados com azul de metileno-azur II de Mallory ( Fig. 8 ), os ductos mostraram-se bastante reduzidos, quando comparados aos machos normais e, com os grânulos localizados na região apical das células, semelhantes àqueles encontrados nas fêmeas normais ( Fig. 9 ).

Nas fêmeas diabéticas, em cortes semifinos corados com azul de metileno-azur II de Mallory ( Fig. 10 ), os ductos granulosos não diferiram muito daqueles das fêmeas normais ( db/n ) ( Fig. 9 ), assim como, dos machos diabéticos ( db/db ) ( Fig. 8 ), à exceção da presença de um número maior de grânulos secretores verificando-se, conseqüentemente, um ligeiro aumento dos ductos granulosos.

Os ácinos, tanto nos machos como nas fêmeas diabéticos ( db/db ), apresentaram-se com aspectos aparentemente normais. Os núcleos localizavam-se na periferia das células e, os grânulos bem nítidos, estavam distribuídos, homogeneamente, por todo o citoplasma, à semelhança das fêmeas normais ( db/n ).

As reações de acetilcolinesterase ( AChE ) mostraram que, nas glândulas submandibulares dos machos normais, as fibras nervosas com intensa atividade enzimática foram encontradas, particularmente, circundando os ductos granulosos, geralmente dois a três axônios por ducto. Os axônios, também apresentaram íntima proximidade das células acinosas, mas em menor número e menor intensidade de reação ( Fig. 11 ).

Nas glândulas submandibulares das fêmeas normais, as fibras AChE-positivas mostraram-se aparentemente reduzidas em número e intensidade de reação ( Fig. 15 ) e, particularmente, o número de fibras em torno dos ductos granulosos era menor quando comparados aos dos machos normais.

Nos animais tratados com aloxana, a inervação das glândulas submandibulares pareceu ter disposição semelhante à dos controles, mas com intensidade de reação menor ( Fig. 12 ).

Nas glândulas submandibulares de animais tratados com estreptozotocina, as fibras parassimpáticas pareceram estar aumentadas em número, com reação enzimática mais intensa, quando comparadas às dos animais controles ( Fig. 13 ).

Nos machos diabéticos ( db/db ) de geração espontânea, a inervação parassimpática das glândulas submandibulares, representada pela presença dos axônios em torno dos ductos granulosos e dos ácinos, pareceu aumentada quando comparada à dos machos normais, mas assemelhando-se, quanto ao número de axônios e intensidade de reação, com as glândulas dos animais tratados com estreptozotocina, como pode ser observa

do na Fig. 14.

Nas fêmeas diabéticas ( db/db ) de geração espontânea, as glândulas submandibulares apresentaram sua inervação parassimpática aumentada, quanto ao número de axônios e intensidade de reação, quando comparada à das fêmeas normais ( Fig. 16 ).

### Estudo Ultra-Estrutural

Os ductos granulosos dos camundongos machos controlados mostraram células colunares bem definidas ( Fig. 17 e 18 ), apresentando evidências morfológicas de células em plena atividade funcional. Os núcleos com membranas bem definidas apresentaram-se na região basal da célula, onde observava-se também um grande número de mitocôndrias e abundantes perfis de retículo endoplasmático rugoso com cisternas extensas e bem organizadas. O aparelho de Golgi, encontrava-se entre o núcleo e os grânulos de secreção.

Os grânulos de secreção, que ocupavam os dois terços apicais das células, eram bastante eletrondensos, apresentando-se em vários tamanhos e aparentemente em diferentes estados de maturação.

Na região basal de algumas células, os ductos granulosos, mostraram pequenos vacúolos e a membrana plasmática dessa região apresentou invaginações pouco profundas.

Os espaços intercelulares eram maiores na região basal das células, onde podia-se observar interdigitações en

tre células vizinhas. A medida que se avançava para a região apical, os espaços intercelulares se estreitavam e se tornavam cada vez mais retilíneos. Desmossomos apareciam de espaço em espaço entre as células tubulares ( Fig. 17 ).

As células mioepiteliais, situadas junto à base das células tubulares, apresentaram-se de forma alongada e finas. O núcleo era elipsóide, central e orientado segundo o longo eixo da célula. Elas estavam geralmente em contato direto com as membranas das células tubulares, ligando-se a elas por desmossomos e apresentando prolongamentos que adentravam os espaços intercelulares das células epiteliais. Havia, porém, regiões em que as células mioepiteliais estavam separadas das células glandulares pela membrana basal. Quando em contato direto com o tecido glandular, as células mioepiteliais apresentavam algumas vesículas de pinocitose ( Figs. 17 e 18 ).

As células acinosas dos camundongos machos normais apresentaram-se com o citoplasma, em sua maior parte, tomado por grânulos de secreção de baixa eletrondensidade, com matriz bem definida e ocasionalmente contíguos uns com os outros. As mitocôndrias eram proeminentes, espalhadas ao acaso na periferia da célula, margeando a membrana citoplasmática, devido à presença da grande quantidade de grânulos de secreção. Ao redor dos núcleos existiam grandes áreas repletas de perfis de retículo endoplasmático rugoso, extensos, paralelos e bem organizados ( Fig. 19 ).

Nos ductos granulosos dos camundongos fêmeas nor

mais ( db/n ) ( Fig. 28 ), as células colunares eram baixas e continham menos grânulos de secreção eletrondensos, localizados no terço apical do citoplasma das células secretoras. Os núcleos se encontravam mais próximos da região central das células e os perfis de retículo endoplasmático rugoso eram mais espalhados e pouco abundantes. As mitocôndrias mostraram-se numerosas, proeminentes, alongadas com orientação perpendicular à lâmina basal e, geralmente, associadas às numerosas invaginações da membrana plasmática basal. O aparelho de Golgi também se fazia presente entre o núcleo e os grânulos de secreção ( Fig. 28 ).

As células acinosas dos camundongos fêmeas normais apresentaram-se com o seu citoplasma tomado, em grande parte, por grânulos de baixa eletrondensidade e matriz bem definida. Os núcleos estavam localizados próximos à periferia das células e, ao seu redor, existiam áreas repletas de perfis de retículo endoplasmático rugoso. As mitocôndrias eram proeminentes e espalhadas ao acaso, próximas da periferia das células.

Os ductos granulados dos animais tratados com estreptozotocina mostraram sinais evidentes de alterações celulares de intensidade variável ( Figs. 20, 21 e 22 ). As células colunares eram mais baixas e os espaços intercelulares perderam sua nitidez. Os núcleos pareciam ocupar uma posição mais central nas células, acompanhado por um aumento de seu volume, com um maior número de massas de heterocromatina e de poros na carioteca.

O citoplasma das células dos ductos granulosos perderam sua aparência organizada, apresentando-se com grandes vacúolos e, em algumas células, com áreas degeneradas e necróticas. Em células menos afetadas, onde não existiam vacúolos ou degenerações na região basal, a membrana plasmática apresentou profundas invaginações, associadas às mitocôndrias, que, por sua vez, apresentaram-se aumentadas de tamanho e com uma certa mudança no padrão das cristas, assemelhando-se àquelas do tipo encontrado nas células secretoras de esteróides ( Fig. 22 ).

Outras organelas citoplasmáticas perinucleares perderam sua nitidez e organização em graus diferentes de célula para célula, principalmente os perfis de retículo endoplasmático rugoso, que, em algumas áreas, se tornaram mais escassos, menos extensos e desorganizados, como também, em outras áreas mais afetadas, desapareceram por completo, o mesmo acontecendo com o aparelho de Golgi.

Os grânulos de secreção que nos animais controles ocupavam os dois terços apicais das células, passaram a ocupar nos animais tratados com estreptozotocina apenas o terço apical. Eles eram de eletrondensidade média, ou claros, apresentando uma redução em seu número, e muitos deles apresentavam-se bastante aumentados de tamanho, com freqüente mudança de forma ( Fig. 20 ).

As células mioepiteliais também pareceram sofrer alterações nas mesmas proporções das áreas mais ou menos afetadas. No geral, pareceu haver uma diminuição do seu tamanho

e, nas áreas onde existiam extensos vacúolos ou degenerações das células tubulares, elas também apareciam com as mesmas alterações ( Fig. 21 ).

Nas células acinosas dos animais tratados com estreptozotocina, as alterações mais evidentes foram com relação aos grânulos de secreção. Os grânulos perderam aquela matriz bem definida e adquiriram um aspecto mais ou menos amcrfo. Em quase todas as células de um mesmo ácino, vários grânulos fundiram-se um com o outro, formando verdadeiras lagoas de material secretor. Podia-se observar ainda, em outras áreas, grânulos fluindo seu material secretor para dentro de lagoas já formadas ( Fig. 23 ).

O núcleo e as organelas citoplasmáticas, principalmente os perfis de retículo endoplasmático rugoso, que eram em grande número, foram comprimidos entre si ou contra a membrana citoplasmática, por aquelas lagoas de material secretor, fazendo o protoplasma perder a aparência encontrada em células análogas dos controles. As mitocôndrias também apresentaram-se pouco proeminentes quando comparadas com os animais controles.

Os ductos granulosos dos animais tratados com aloxana apresentaram as mesmas características dos animais tratados com estreptozotocina, mas com menor intensidade e variando de célula para célula ( Figs. 24 e 25 ).

O citoplasma das células dos ductos granulosos não apresentaram aqueles vacúolos e áreas necróticas ou degeneradas, como foram vistos nos animais tratados com estreptozo

tocina, mas, mesmo assim, perderam a sua aparência organizada como nos animais controles. Os perfis de retículo endo-plasmático rugoso eram escassos, desorganizados e menos extensos. As invaginações da membrana plasmática que nos animais controles se atinham à região basal, apareceram também nos espaços intercelulares. As mitocôndrias, localizadas na região basal das células, eram mais proeminentes, de maior tamanho, bastante alongadas e apareciam associadas às invaginações da membrana basal, orientando-se perpendicularmente a ela ( Fig. 25 ). O aparelho de Golgi era raramente visível ou, quando aparecia, era pouco nítido.

Os grânulos eram de eletrondensidade média ou fraca. Apresentaram-se em vários tamanhos, alguns bastante aumentados, de maneira a formarem uma massa compacta no citoplasma, havendo, aparentemente, uma diminuição em seu número ( Fig. 24 ).

As células mioepiteliais não chegaram a ser atingidas nas mesmas proporções das dos animais tratados com es-treptozotocina, mas pareceu haver uma redução no seu tamanho ( Figs. 24 e 25 ).

As células acinosas dos animais que receberam tratamento com aloxana não atingiram o mesmo grau de alterações visto nos que receberam estreptozotocina como tratamento. Apenas os grânulos de secreção mostraram algumas evidências de início de um processo de fusão semelhante ao encontrado nas células acinosas dos camundongos que receberam estreptozotocina ( Fig. 26 ).

As células dos ductos granulosos dos camundongos machos diabéticos de geração espontânea ( db/db ) apresentaram algumas características, que também foram encontradas nos animais tratados com estreptozotocina ou aloxana. As membranas intercelulares não eram tão nítidas como nos animais controles e os núcleos estavam localizados mais na região central das células. Na região basal das células granulosas, a membrana plasmática apresentou um número muito maior de invaginações com as mitocôndrias, na sua totalidade associadas e orientadas perpendicularmente à lâmina basal. As mitocôndrias eram mais numerosas do que nos machos normais e apresentaram-se, ainda, mais alongadas e proeminentes. Os perfis de retículo endoplasmático rugoso eram escassos, mais espalhados e menos extensos. O aparelho de Golgi, geralmente, encontrava-se entre o núcleo e os grânulos, ou podia também se apresentar lateralmente ao núcleo. Os grânulos de secreção, localizados no citoplasma apical das células, eram eletrondensos e em pequena quantidade ( Fig. 27 ).

Nas células dos ductos granulosos dos camundongos fêmeas diabéticos ( db/db ), de geração espontânea ( Fig. 29 ), os grânulos de secreção eletrondensos estavam localizados nos terços apical e central das células e eram mais numerosos do que nas fêmeas normais ( db/n ). A região basal das células apresentou menos invaginações da membrana com mitocôndrias associadas do que estavam presentes nas fêmeas normais ( db/n ). As mitocôndrias, em menor número, eram menos organizadas e a maioria delas não se achava orientada perpendicularmente

dicularmente à lâmina basal. Os núcleos encontravam-se na região basal das células. Os perfis de retículo endoplasmático rugoso eram menos abundantes. O aparelho de Golgi também estava presente nas células dos ductos granulosos das fêmeas diabéticas ( db/db ) entre o núcleo e os grânulos.

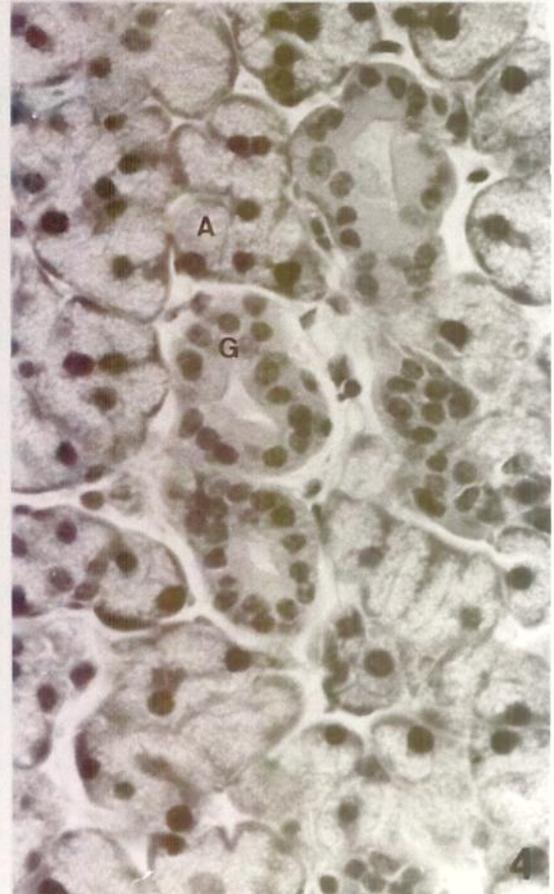
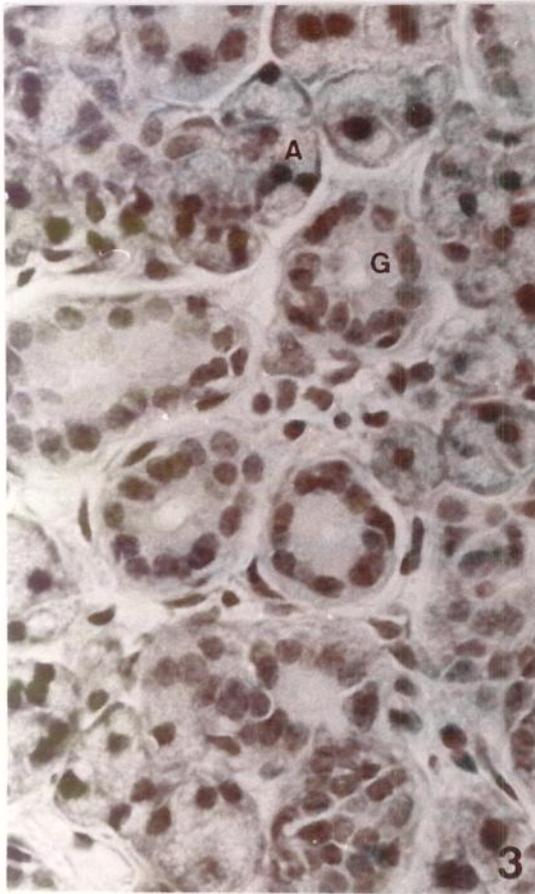
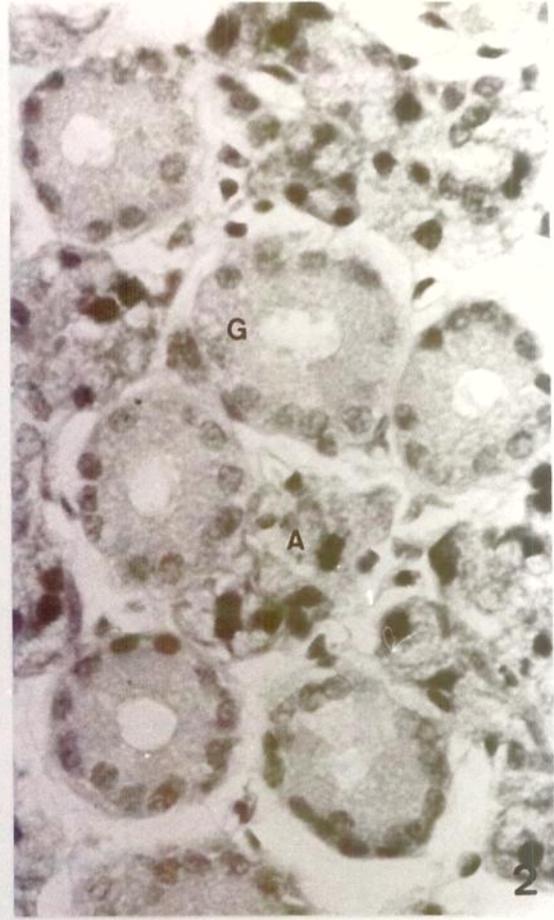
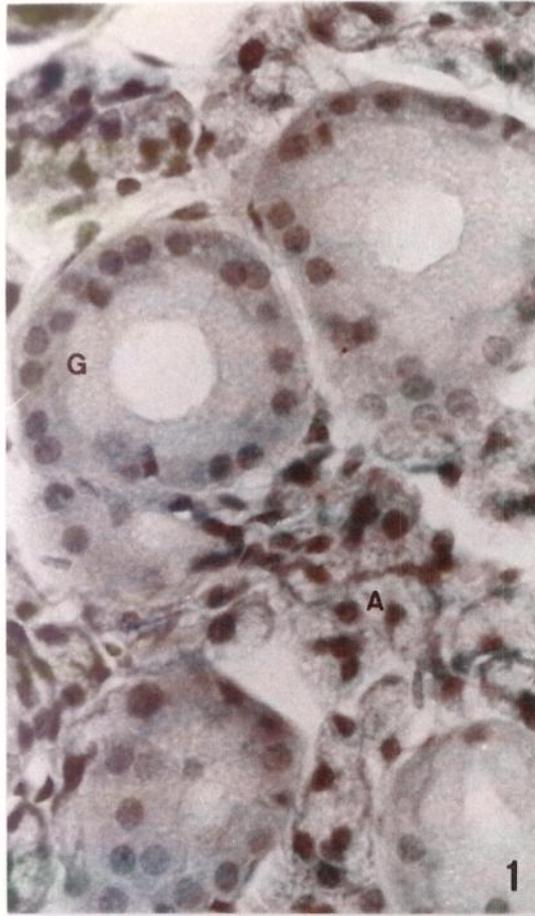
Nenhuma anormalidade foi observada nas células acinosas dos camundongos machos e fêmeas diabéticos ( db/db ), de geração espontânea.

## PRANCHA 1

Glândula Submandibular de Camundongo, Cortes em Parafina, com 5 micrômetros de Espessura, HE . 560 X

- Fig. 1 - Macho normal ( controle ). Os ductos granulosos ( G ) são grandes, ocupando uma área maior que a dos ácinos. Os núcleos são pequenos e localizados na região basal das células. Ácinos ( A ).
- Fig. 2 - Macho tratado com aloxana. Os ductos granulosos ( G ) são menores, quando comparados aos controles. Os núcleos estão aparentemente aumentados de tamanho e, como o citoplasma, as células granulosas apresentam-se relativamente mais vazias, quando comparadas aos controles. Ácinos ( A ).
- Fig. 3 - Macho tratado com estreptozotocina. Os ductos granulosos ( G ) são ainda mais reduzidos de tamanho, que os da Fig. 2, havendo uma predominância da área ocupada pelos ácinos sobre a dos ductos. Os núcleos estão aumentados de tamanho e localizados na região central das células. Ácinos ( A ).

Fig. 4 - Macho diabético ( db/db ) de geração espontânea. Pode-se notar a semelhança dos ductos granulosos ( G ), comparados aos da Fig. 3. O tamanho dos ductos, o aspecto do citoplasma, o tamanho e a localização dos núcleos, bem como a predominância da área ocupada pelos ácinos, são semelhantes aos aspectos encontrados nos animais tratados com estreptozotocina. Ácinos ( A ).



## PRANCHA 2

Glândula Submandibular de Camundongo, Cortes em Epon, com 0,5 Micrômetro de Espessura; Coloração : Azul de Metileno - Azur II de Mallory. 560 X

Fig. 5 - Macho normal. Os ductos granulosos ( G ) são grandes, com as células repletas de grânulos secretores ocupando os dois terços apicais, e com os núcleos localizados na região basal. A área ocupada pelos ductos é maior que a dos ácinos ( A ).

Fig. 6 - Macho tratado com aloxana. Os ductos granulosos ( G ), são menores, comparados os controles. Os grânulos secretores são em menor quantidade, e comprimidos entre si. O citoplasma apresenta-se com aspecto mais vazio, com alguns vacúolos. Os núcleos apresentam-se aparentemente aumentados de tamanho. Ácinos ( A ).

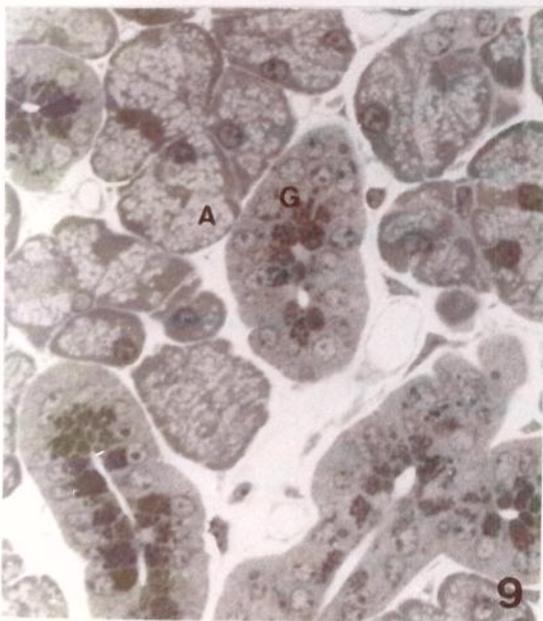
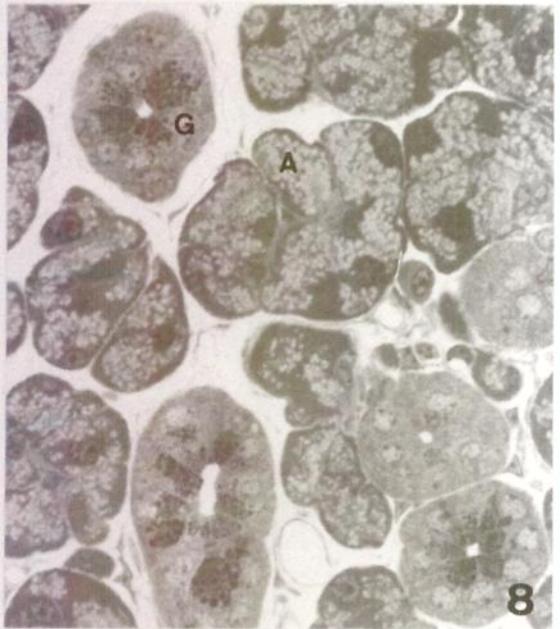
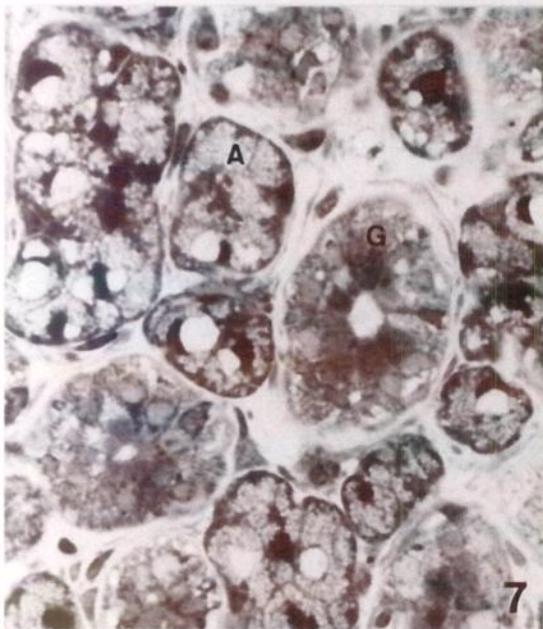
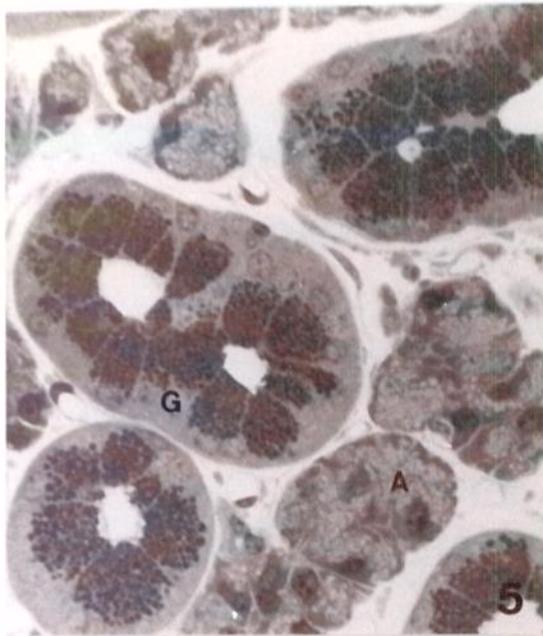
Fig. 7 - Macho tratado com estreptozotocina. Os ductos granulosos ( G ) apresentam-se ainda mais reduzidos, podendo-se observar as mesmas alterações, mas em graus mais severos em todos os aspectos menciona

dos na Fig. 6. Podem-se observar, ainda, grandes vacúolos nas células acinosas ( A ).

Fig. 8 - Macho diabético ( db/db ). Os ductos granulosos ( G ) são reduzidos, apresentando uma menor quantidade de grânulos secretores do que os machos normais. Os núcleos estão localizados na região central das células, provavelmente em consequência da diminuição dos grânulos secretores. A área ocupada pelos ácinos é maior que a dos ductos. Ácinos (A).

Fig. 9 - Fêmea normal. Os ductos granulosos ( G ) são de diâmetro menor e contêm menos grânulos secretores que os machos normais. Os núcleos estão localizados na região central das células. Há uma predominância da área ocupada pelos ácinos sobre a dos ductos. Ácinos ( A ).

Fig. 10 - Fêmea diabética ( db/db ). Os ductos granulosos ( G ) são aproximadamente do mesmo tamanho, ou ligeiramente maiores que aqueles dos machos diabéticos ( db/db ) e das fêmeas normais, mas existe quantidade consideravelmente maior de grânulos secretores do que nas fêmeas normais. Ácinos ( A ).



## PRANCHA 3

Glândula Submandibular de Camundongo, Cortes em Agar com "Vibratome", com  $\pm 15$  Micrômetros de Espessura. De mon stra ção C ito qu í m i c a d e A t i v i d a d a A c e t i l c o l i n e s t e r a s e ( AChE ).  $\pm 200 X$

Fig. 11 - Macho normal ( controle ). Os ductos granulosos ( G ), estão rodeados por axônios parassimpáticos bem evidentes, com intensa reação positiva ( setas ). Os ácinos ( A ) são inervados por uma menor quantidade de axônios.

Fig. 12 - Macho tratado com aloxana. Os axônios presentes em torno dos ductos granulosos ( G ) e dos ácinos ( A ) sugerem uma aparente redução em seu número, representada pela intensidade da reação ( seta ), quando comparada aos machos normais.

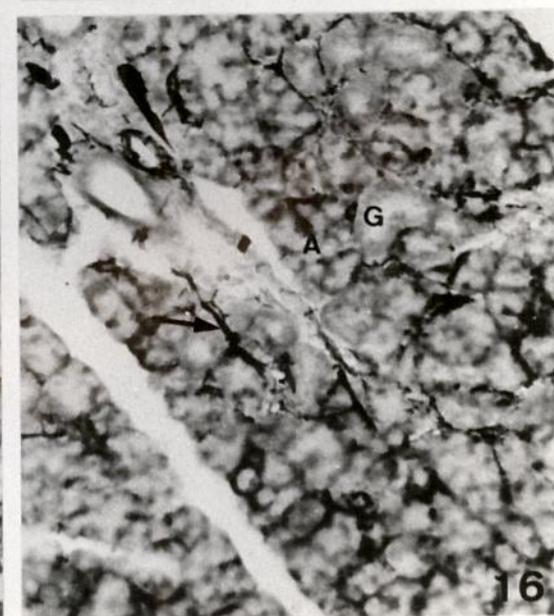
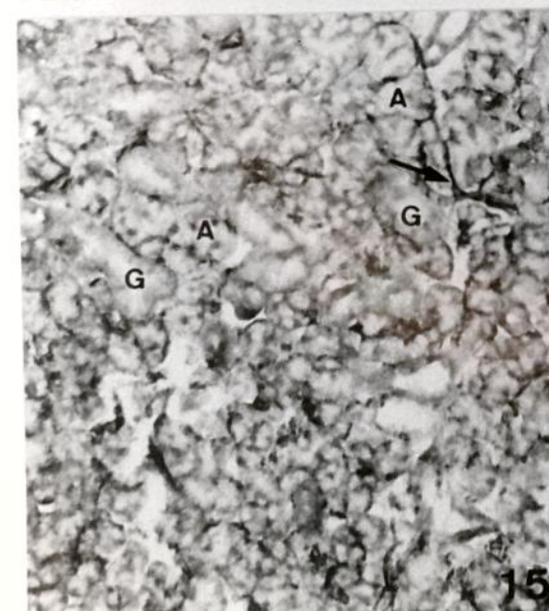
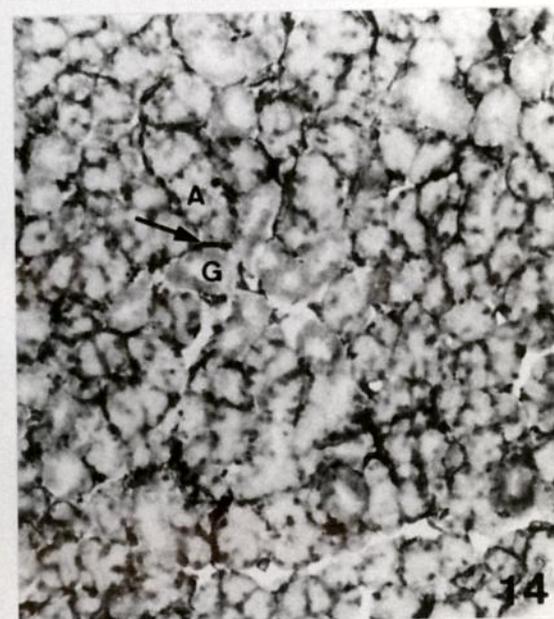
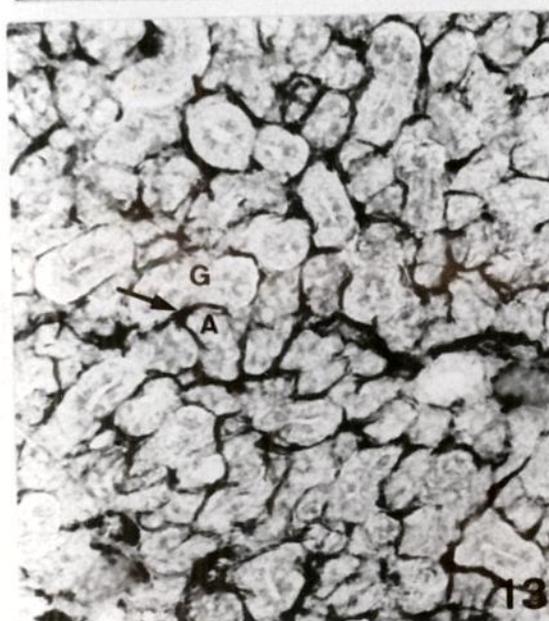
Fig. 13 - Macho tratado com estreptozotocina. As fibras parassimpáticas evidenciadas pela ac e t i l c o l i n e s t e r a s e a p r e s e n t a m u m a p a r e n t e a u m e n t o d e r e a ç ã o e m t o r n o d o s d u c t o s g r a n u l o s o s e d o s á c i n o s ( seta ). N o t a - s e u m m a i o r n ú m e r o d e d u c t o s e á c i n o s e, c o n s e

qlentemente, de axônios numa área com o mesmo aumento do animal controle.

Fig. 14 - Macho diabético ( db/db ). As fibras parassimpáticas em torno dos ductos granulosos ( G ) e dos ácinos ( A ) apresentam uma intensidade de reação semelhante à dos animais tratados com estreptozotocina ( seta ). Sugerindo, como na Fig. 13, um maior número de ductos e ácinos, como também de axônios numa mesma área e aumento do animal controle.

Fig. 15 - Fêmea normal. As fibras parassimpáticas em torno dos ductos granulosos ( G ) e dos ácinos ( A ) estão aparentemente reduzidas em número e intensidade de reação ( seta ), quando comparadas aos machos normais.

Fig. 16 - Fêmea diabética ( db/db ). As fibras colinérgicas associadas aos ductos granulosos ( G ) e aos ácinos ( A ), apresentam uma intensidade de reação representadas pelos axônios ( seta ), maior do que nas fêmeas normais.



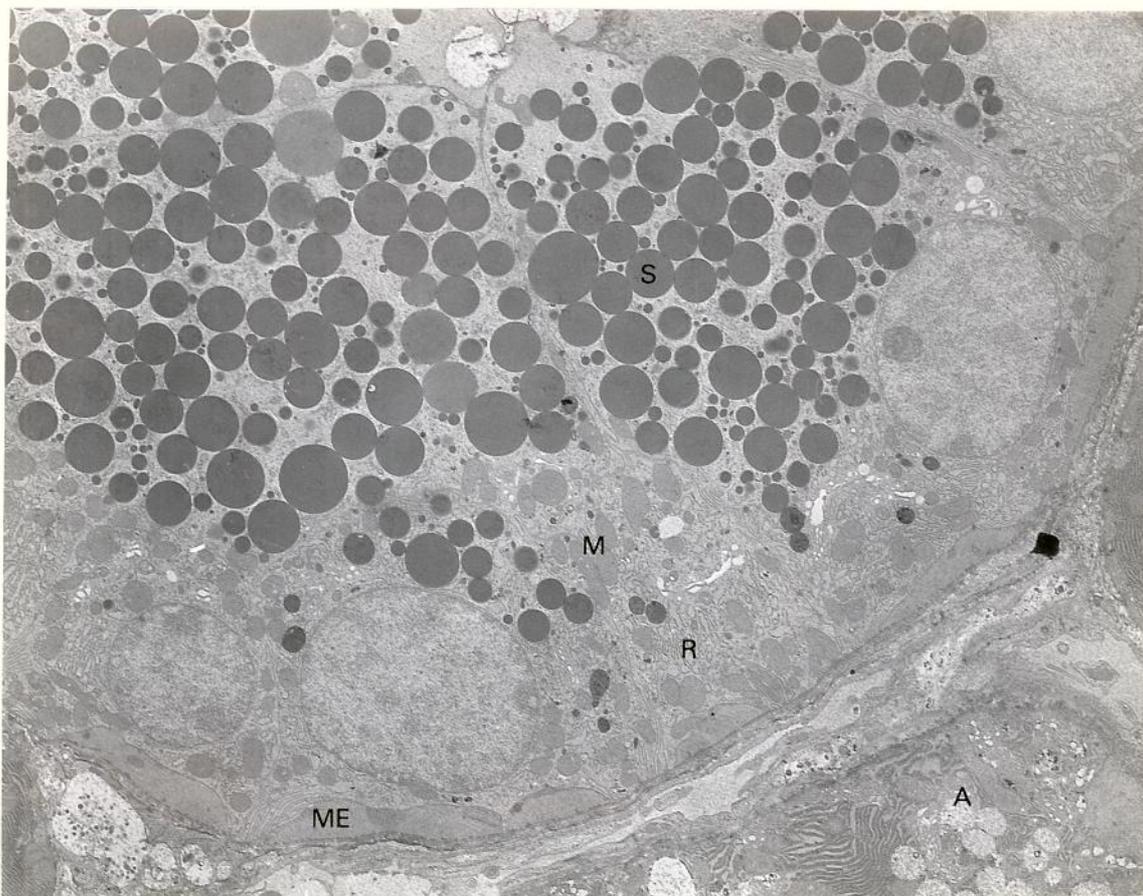


Fig. 17 - Glândula Submandibular ( GSM ) de camundongo macho normal. Ducto granuloso. As células estão repletas com grânulos secretores eletrondenscos ( S ). As mitocôndrias ( M ) estão espalhadas e orientadas ao acaso dentro das células. Pode-se observar a grande quantidade de perfis de retículo endoplasmático rugoso ( R ), desenvolvidos nessas células granulosas, que são sugestivas de alta atividade secretora. Células mioepiteliais ( ME ) na região basal das células granulosas e partes das células acinosas ( A ) também podem ser observadas. 4.000 X

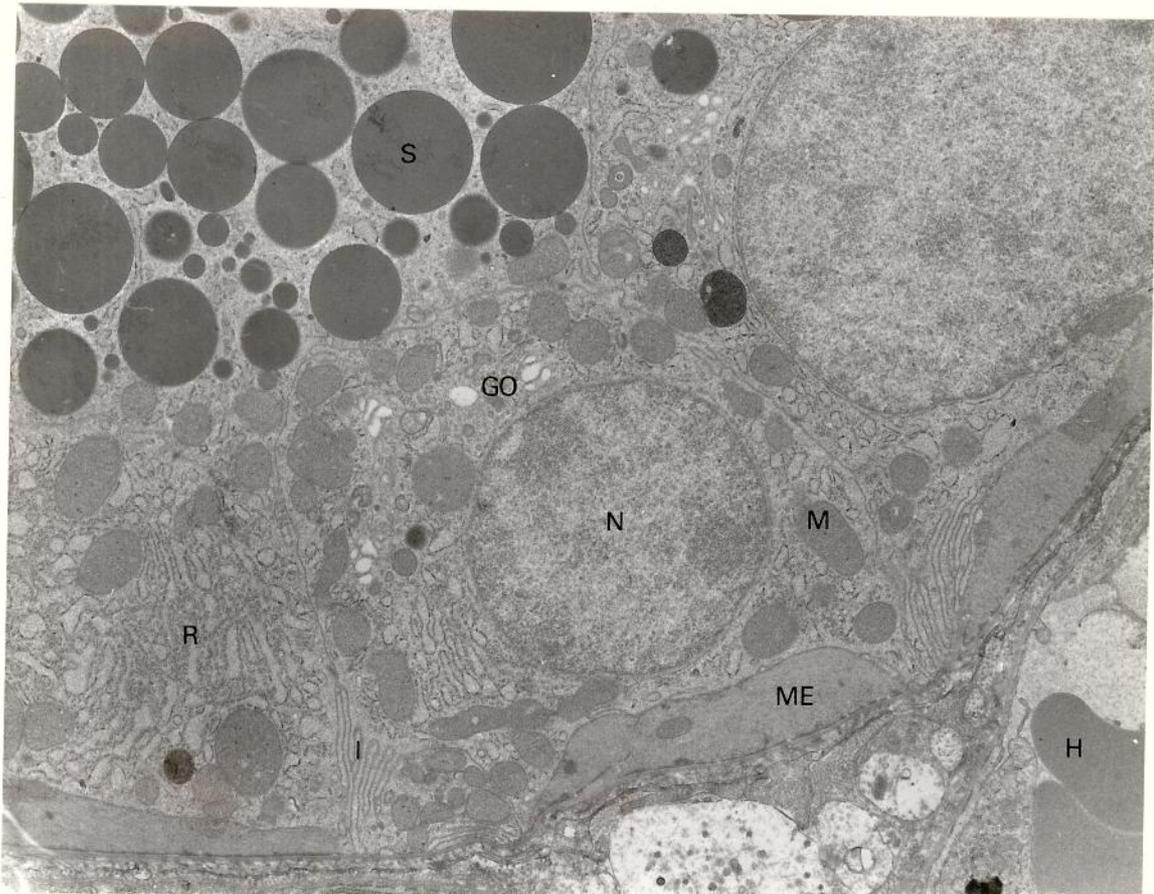


Fig. 18 - GSM de camundongo macho normal. Maior aumento da região basal de células do ducto granuloso, mostrando núcleo ( N ), grânulos secretores ( S ), mitocondrias ( M ), perfis de retículo endoplasmático rugoso ( R ), Aparelho de Golgi ( GO ), células mioepiteliais ( ME ), invaginações da membrana basal ( I ) e hemácias ( H ). 8.000 X

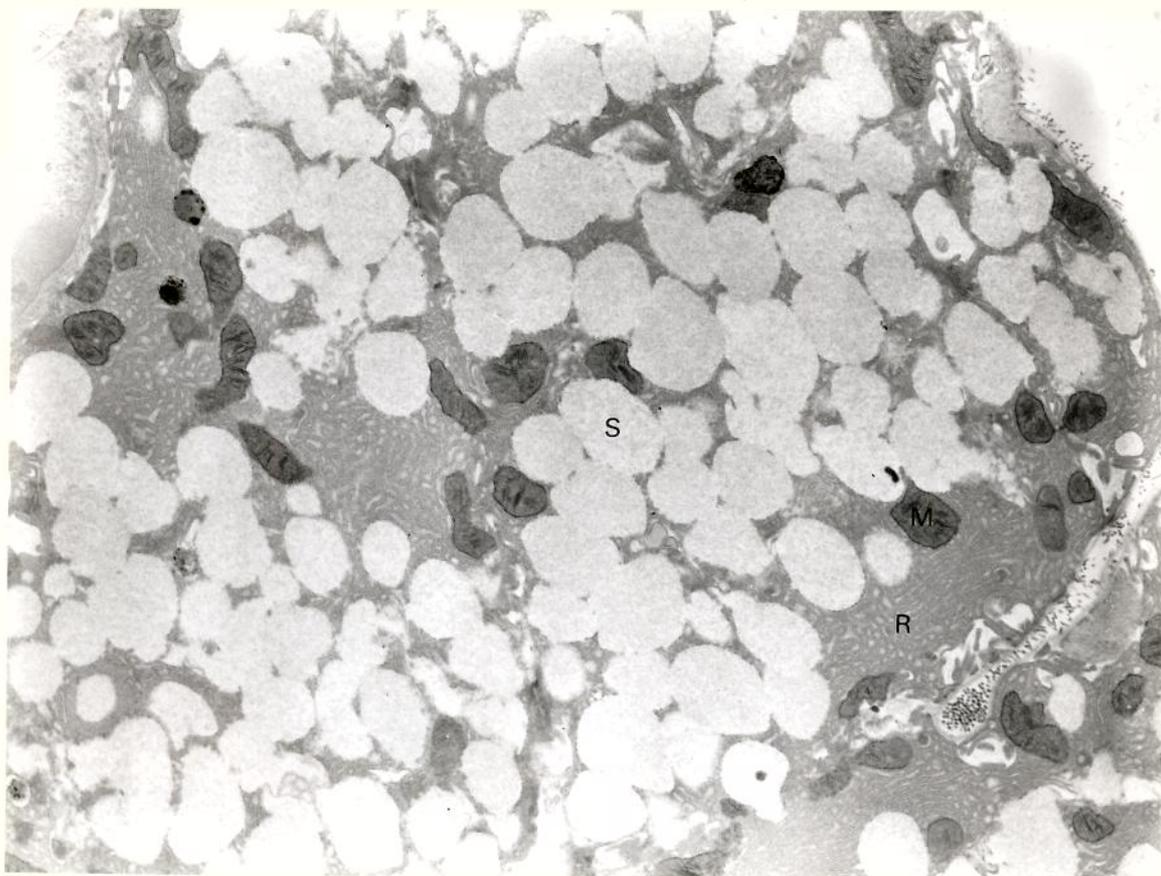


Fig. 19 - GSM de camundongo macho normal. Células acinosas. Os grânulos secretores ( S ) de eletrondensidade fraca ou claros apresentam-se com uma matriz bem definida e ocasionalmente contíguos um ao outro. As mitocôndrias ( M ) são bem evidentes e espalhadas ao acaso. Os perfis de retículo endoplasmático rugoso ( R ) são numerosos e bem organizados. 8.000 X



Fig. 20 - GSM de camundongo macho, tratado com estreptozotocina. As alterações celulares dos ductos granulosos são evidentes. Os grânulos secretores ( S ) são em menor número, de tamanhos bastante variados e em diferentes graus de eletrondensidade. O citoplasma de algumas células apresenta, em sua região basal, grandes vacúolos e áreas degenerativas, desaparecendo os perfis de retículo endoplasmático rugoso e outras organelas, com exceção das mitocôndrias ( M ). Os núcleos ( N ) perderam seu aspecto homogêneo, apresentando a cromatina mais condensada e os poros nucleares mais evidentes. As células mioepiteliais ( ME ) apresentam áreas degenerativas, quando localizadas próximas às áreas mais afetadas pelos efeitos tóxicos da droga. 4.000 X

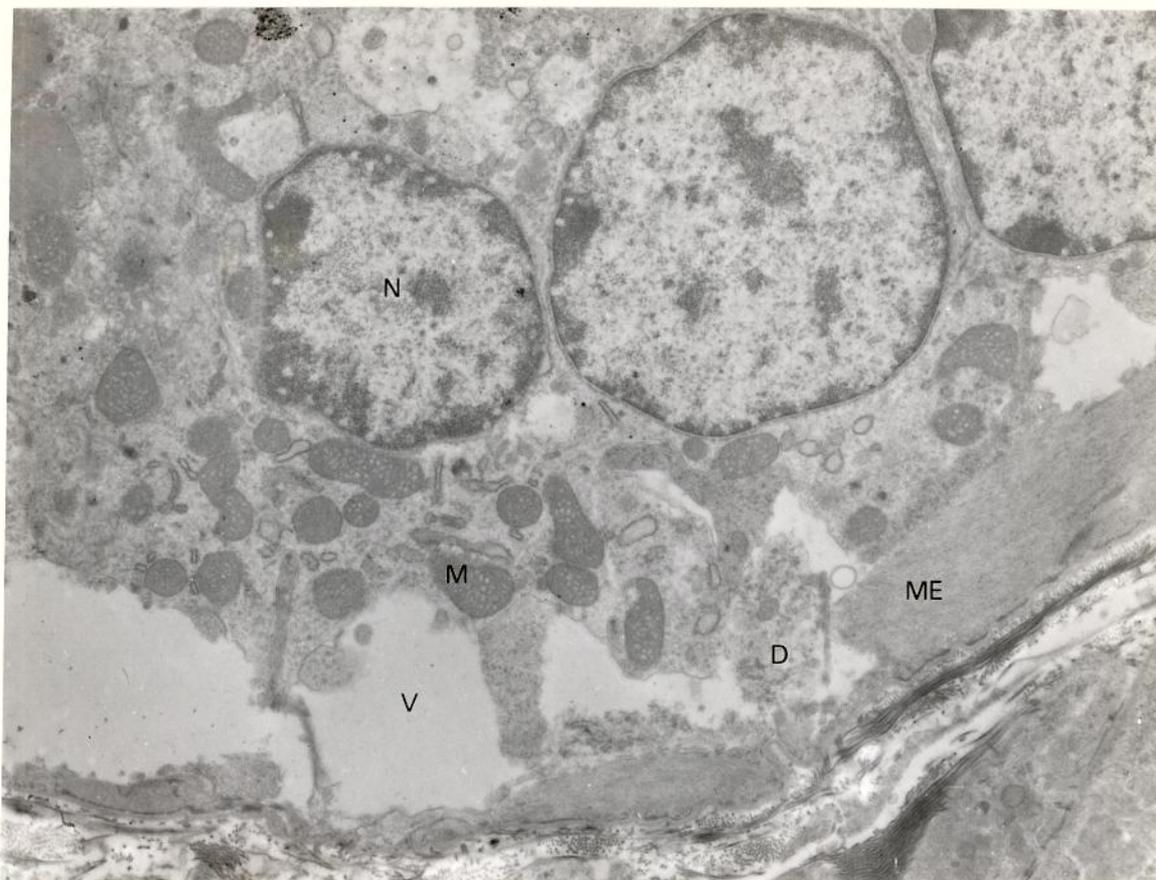


Fig. 21 - GSM de camundongo macho, tratado com estreptozotocina. Maior aumento da região basal das células dos ductos granulosos. As mitocôndrias ( M ) estão localizadas mais nessa região, orientadas ao acaso e sugerindo uma mudança no seu padrão. Grandes vacúolos ( V ) e áreas degenerativas ( D ), com as células mioepiteliais ( ME ) apresentando as mesmas alterações. Os perfis de retículo endoplasmático rugoso e o aparelho de Golgi parecem ter desaparecido com o estado degenerativo da célula. Os núcleos ( N ) apresentam a cromatina mais condensada e os poros mais evidentes, quando comparados aos controles. 8.000 X

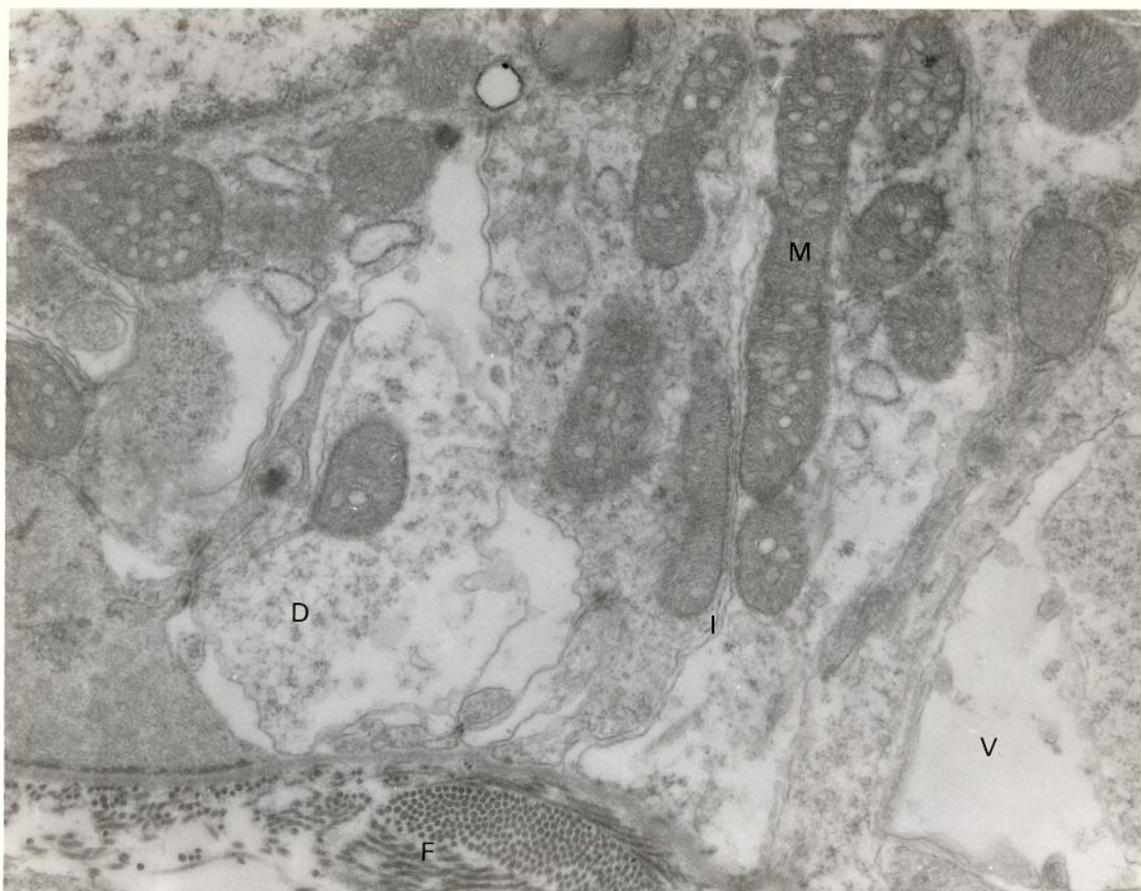


Fig. 22 - GSM de camundongo macho tratado com estreptozotocina. Maior aumento da região basal da célula do ducto granuloso. Nessa região, a membrana basal apresenta extensas invaginações ( I ), com as mitocôndrias ( M ) alongadas e intimamente associadas a elas. Observa-se as mitocôndrias apresentando uma mudança no padrão de suas cristas, semelhantes às das células secretoras de esteróides. Vacúolos (V) e áreas degenerativas ( D ). Núcleo ( N ). Parte inferior da foto, fibras colágenas e reticulares ( F ). 20.000 X

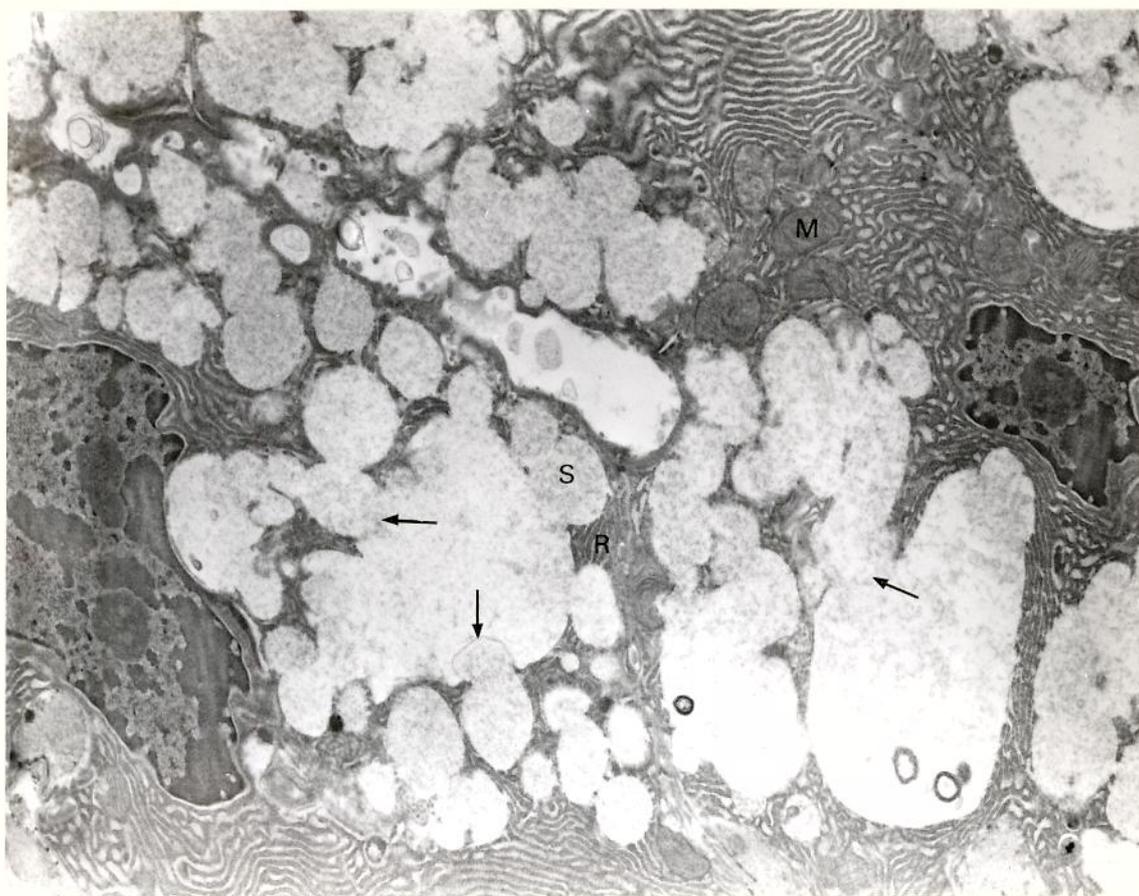


Fig. 23 - GSM de camundongo macho, tratado com estreptozotocina. Células acinosas. Os grânulos secretores (S) de eletrondensidade fraca ou claros se fundem um com o outro, formando verdadeiras lagoas de material secretor. Pode-se notar, ainda, grânulos fluindo seu conteúdo para dentro de lagoas já formadas ( setas ). As mitocôndrias ( M ) são escassas e pouco evidentes. Os perfis de retículo endoplasmático rugoso ( R ) são comprimidos pela formação de lagoas de material protêico. 8.000 X

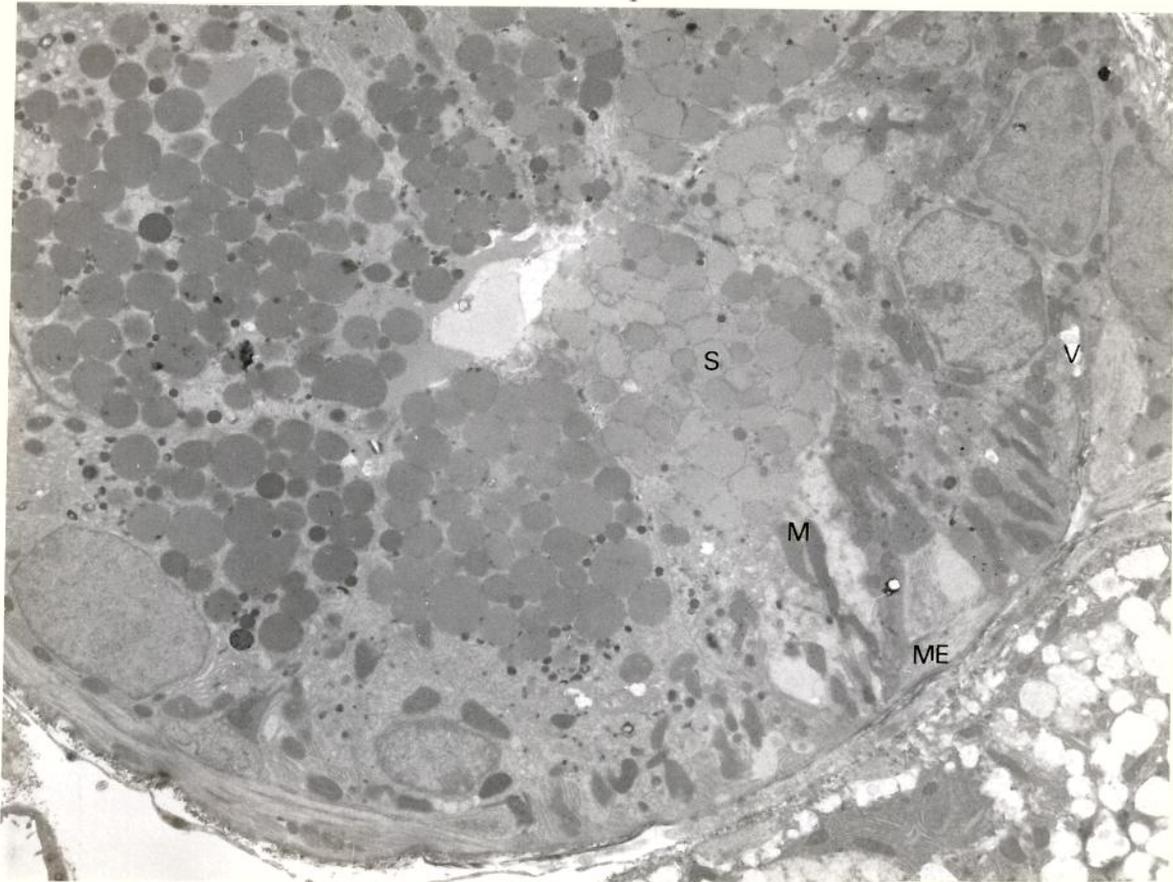


Fig. 24 - GSM de camundongo macho, tratado com aloxana. Ducto granuloso. Os grânulos secretores ( S ) são de eletrondensidade média ou claros, de vários tamanhos, comprimidos entre si e perdendo a sua individualidade. O citoplasma perdeu seu aspecto homogêneo e os perfis de retículo endoplasmático rugoso são escassos e desorganizados. As mitocôndrias (M) tornaram-se mais proeminentes, alongadas e aumentadas de tamanho. Podem-se observar, também, alguns vacúolos ( V ) e células mioepiteliais ( ME ).  
4.000 X

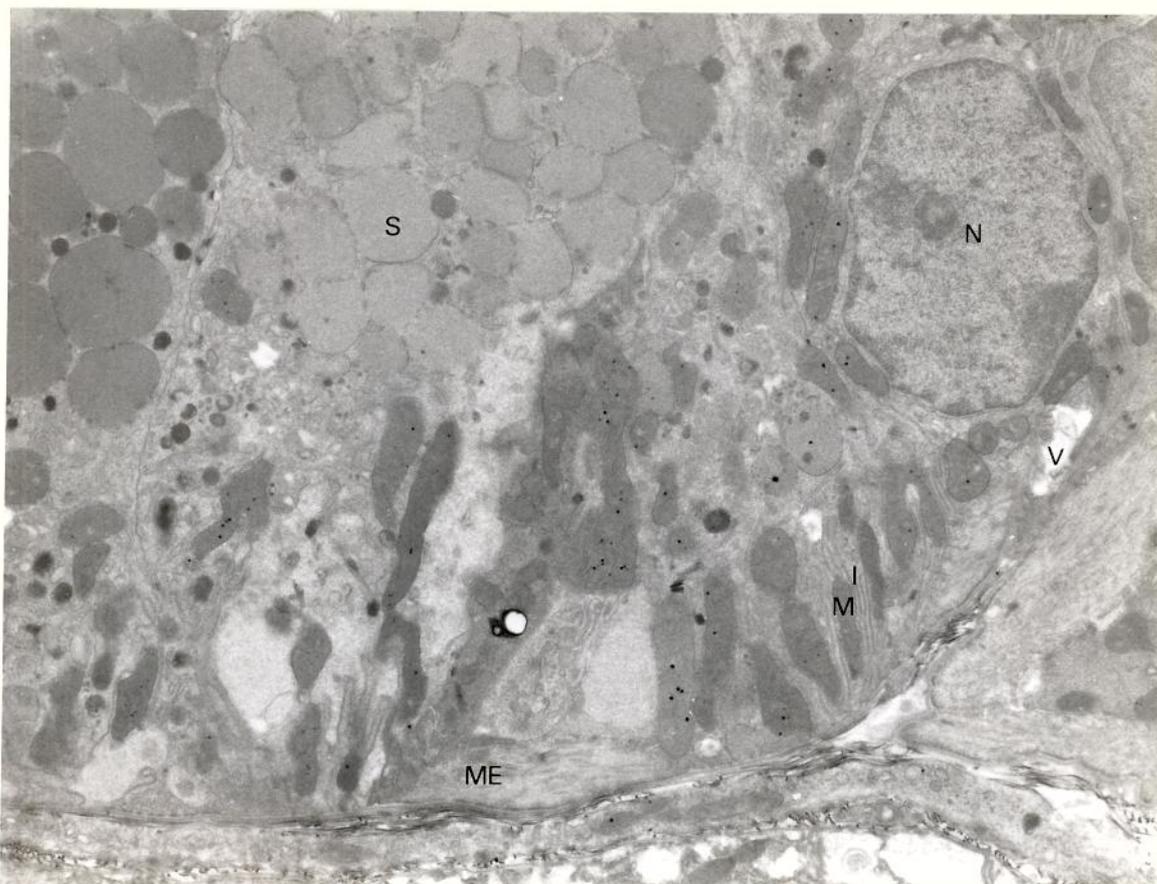


Fig. 25 - GSM de camundongo macho, tratado com aloxana. Maior aumento da região basal das células dos ductos granulosa. Os grânulos de secreção ( S ) apresentam-se comprimidos entre si, perdendo sua matriz bem definida. As mitocôndrias ( M ), aumentadas de tamanho e alongadas, concentram-se mais na região basal das células, as quais associam-se intimamente às extensas invaginações ( I ) da membrana basal. Os perfis de retículo endoplasmático rugoso são escassos ou desaparecem juntamente com outras organelas. Podem-se observar alguns vacúolos ( V ). Núcleo ( N ) e células mioepiteliais ( ME ). 8.000 X

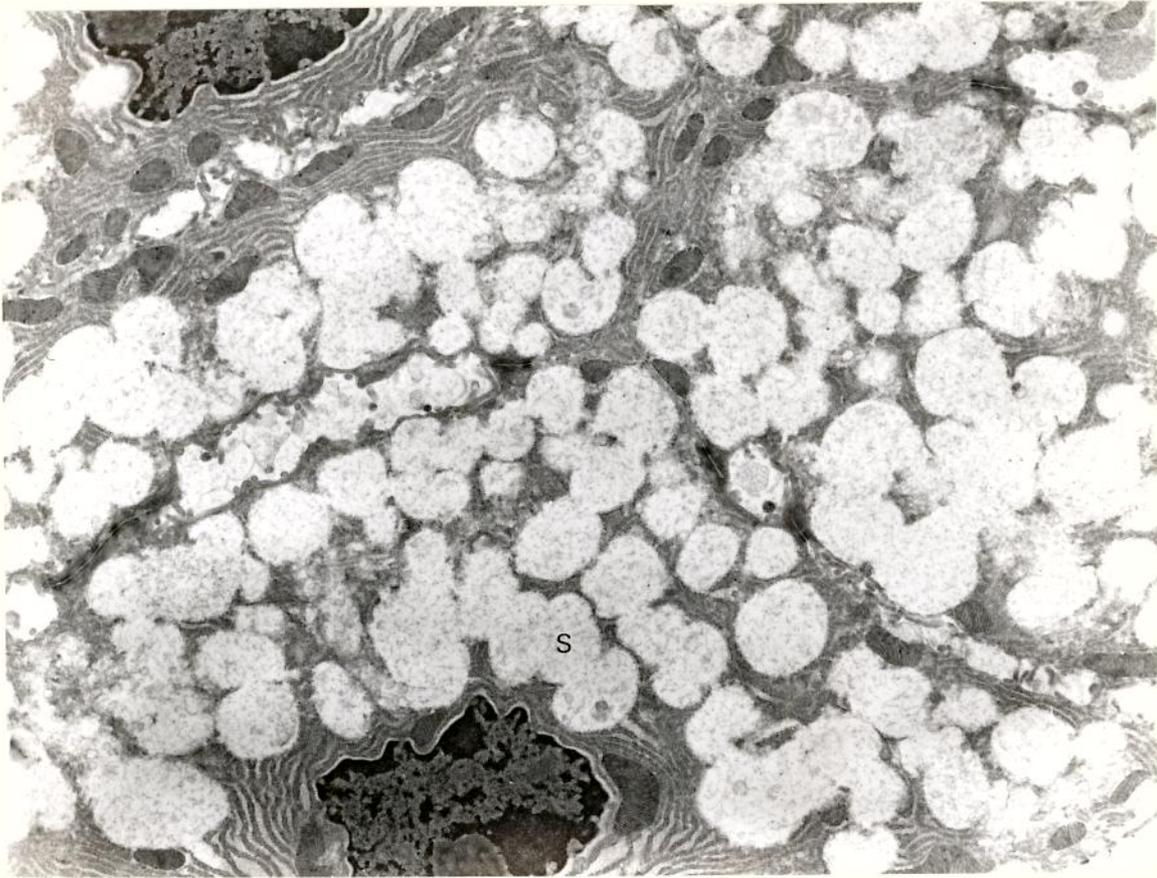


Fig. 26 - GSM de camundongo macho, tratado com aloxana. Células acinosas. Os grânulos secretores ( S ) de eletron densidade fraca ou claros apresentam-se na sua maioria fusionados um com o outro, perdendo a sua matriz bem definida, mas sem formar lagoas de material secretor. O aspecto sugere o início de um processo semelhante ao da Fig. 23. 8.000 X

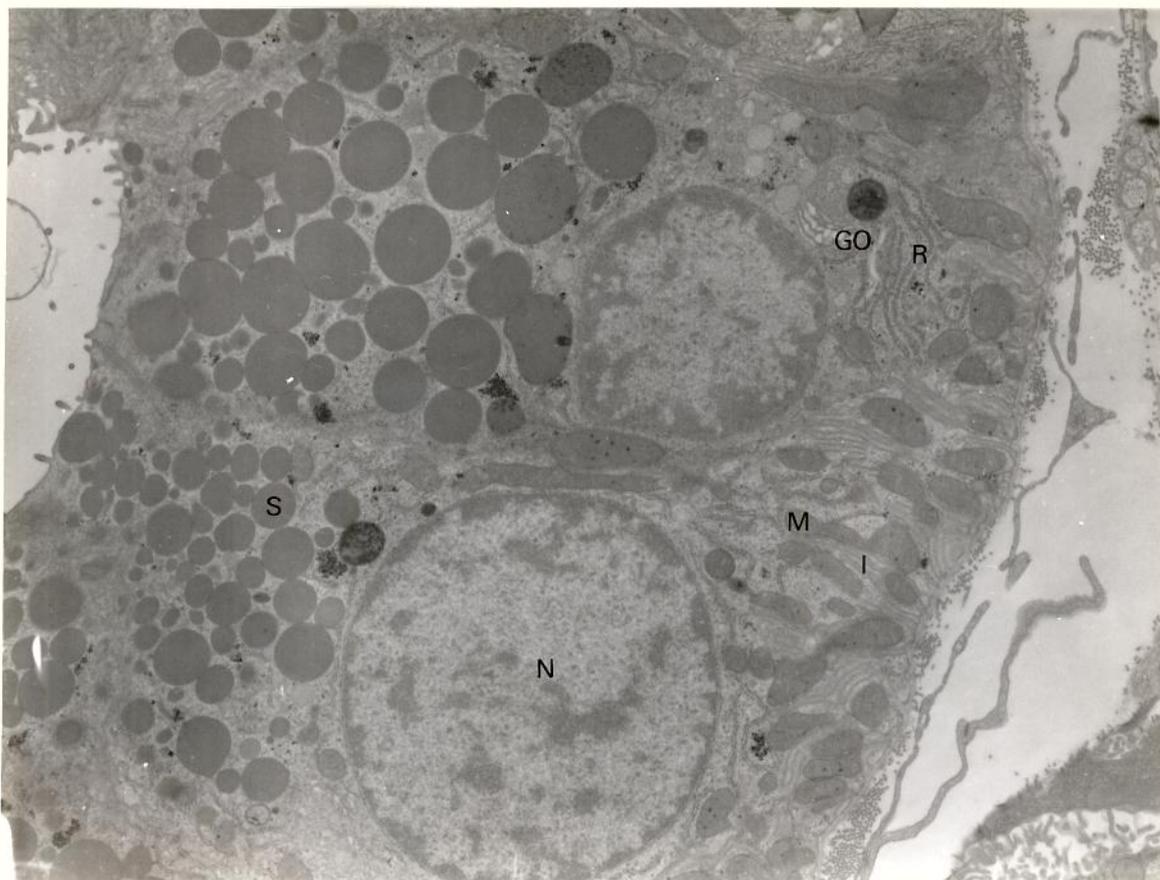


Fig. 27 - GSM de camundongo macho diabético ( db/db ). Ducto granuloso. Os grânulos secretores ( S ) eletrondensos localizam-se na região apical das células e são menos numerosos do que nos machos normais. A região basal das células estão repletas de mitocôndrias ( M ) as quais estão intimamente associadas às invaginações ( I ) da membrana basal. Os perfis de retículo endoplasmático rugoso ( R ) são escassos e espalhados. Os núcleos ( N ) estão aparentemente localizados mais próximos da região central das células, provavelmente devido à menor quantidade de grânulos. Aparelho de Golgi ( GO ). 8.000 X

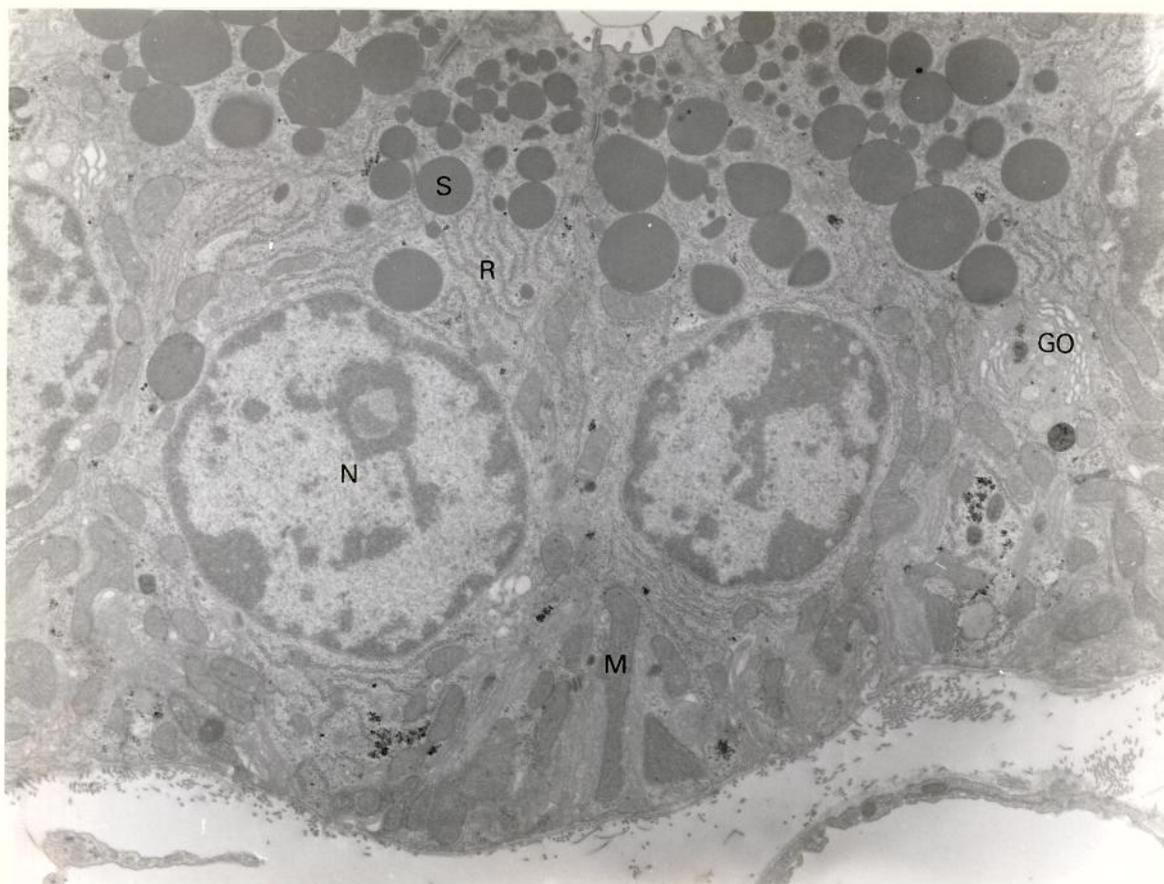


Fig. 28 - GSM de camundongo fêmea normal. Ducto granuloso. Os grânulos secretores ( S ) eletrondensos são es cassos e localizados na região apical das células. As mitocôndrias ( M ) estão localizadas na região basal e orientadas perpendicularmente à membrana dessa região. Os perfis de retículo endoplasmático rugoso ( R ) são relativamente escassos e espalhados, quando comparados aos machos normais. Os nú cleos ( N ) estão aparentemente localizados mais próximos da região central das células, devido à menor quantidade de grânulos secretores. Aparelho de Golgi ( GO ). 8.000 X

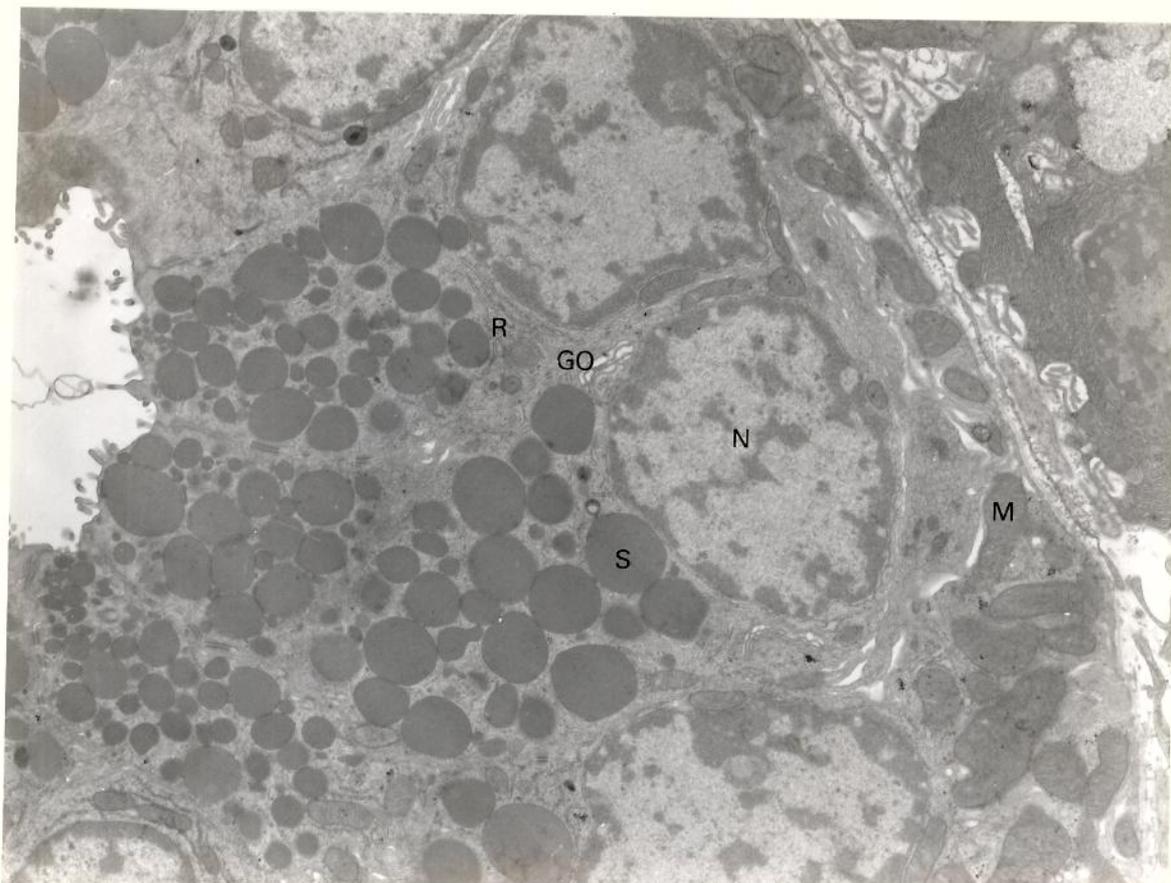


Fig. 29 - GSM de camundongo fêmea diabético ( db/db ). Ducto granuloso. Os grânulos secretores ( S ) são bem mais numerosos do que nas fêmeas normais. No citoplasma basal, as mitocôndrias ( M ) apresentam-se espalhadas e orientadas ao acaso. Os perfis de retículo endoplasmático rugoso ( R ) são pouco numerosos. Os núcleos ( N ) estão localizados mais próximos da região basal das células, provavelmente pelo aumento da granulação secretora. Aparelho de Golgi ( GO ). 8.000 X

## DISCUSSÃO

Tendo sido considerada a escolha do animal modelo para a indução química da diabetes, a dosagem dos agentes diabetogênicos, preconizada por nós, foi aquela que estava dentro dos limites mais usados, após uma extensa consulta da literatura. NACE et al ( 1956 ) preconizou para hamster alimentado, 10 a 50 mg/kg, como ineficaz, e 60 a 70 mg/kg de peso, como diabetogênica, usando como via de administração o seio orbital venoso. Por outro lado, HUNT & BAILEY ( 1961 ) usaram em ratos não alimentados 250 a 350 mg/kg de peso, por via subcutânea. Para camundongos, HILTON & GRAVISS ( 1967 ) injetaram, em uma única dose, 100 mg/kg de peso, de aloxana, na veia jugular externa. A maioria dos autores que trabalham com ratos e usaram a aloxana ou estreptozotocina, a dosagem mais usada foi entre 60 a 75 mg/kg de peso.

O fato de se ter administrado cinco doses, num período de 30 dias, assegura um estado diabético irreversível dos animais. Segundo LAZAROW ( 1952 ), a diabetes por aloxana pode ser reversível, principalmente quando produzida por pequenas doses. Doses excessivas causam a morte do animal antes mesmo de causar lesões nas células beta do pâncreas, como também os animais refratários à primeira dose, geralmente, também o são às doses subsequentes ( GOMORI & GOLDNER,

1943 e KASS & WAISBREN, 1945 ), fatos que não ocorreram com nossos animais, pois todos sobreviveram até o momento do sacrifício e em estado diabético comprovado.

A perda de peso dos camundongos deve-se, provavelmente, ao estado diabético dos animais, visto que sempre ocorre a perda de peso em pacientes humanos diabéticos.

A redução de peso e tamanho das glândulas submandi**u**bulares e dos rins dos animais tratados com aloxana ou estreptozotocina está de acordo com os resultados de HANKER et al. ( 1980 ). Nos camundongos diabéticos ( db/db ), esses efeitos são compostos pelo hipogonadismo associado com a doença. Para os rins de ratos, WEIL III et al. ( 1976 ) atribuíram aos efeitos da diabetes a perda de peso dos animais e a redução do tamanho dos rins, embora ROSS & GOLDMAN ( 1971 ), MOGENSEN et al. ( 1973 ), MOGENSEN & ANDERSEN ( 1975 ) e FOY & SALIH ( 1979 ) entendam que haja um grande aumento no tamanho dos rins, tanto na diabetes juvenil como na experimental.

As glândulas supra-renais dos animais tratados apresentaram um aumento de peso, quando comparadas aos controles, ao contrário dos resultados apresentados com relação aos outros órgãos. Segundo HELLERSTROM et al. ( 1962 ), camundongos com gens db/db exibem uma hiperadrenalcorticalismo refletida pela hipertrofia da supra-renal cortical, e DUBOC et al. ( 1975 ) observaram um aumento dos níveis de corticosterona no plasma. NAEYE ( 1968 ) relatou que, aos 32-50 dias de idade, o peso das glândulas supra-renais de camundongos

diabéticos eram somente 71% daquelas dos camundongos controles. Além do que ele observou que a massa citoplasmática das células da supra-renal cortical nos camundongos diabéticos era somente 75% daquelas dos controles. Contudo, os estudos feitos por RATSIMAMANGA ( 1969 ), em camundongos diabéticos de 2 a 4 meses de idade, atestam que o peso do par das supra-renais nos camundongos diabéticos ( db/db ) era em média 11 mg, quase duas vezes o valor para os controles, acompanhado de uma hipertrofia da córtex e medula da glândula supra-renal.

Em nossos estudos, os testículos dos camundongos com diabetes induzida pela aloxana ou estreptozotocina apresentaram uma redução de tamanho e peso. SCHÖFFLING et al. ( 1963 ) sugerem que os efeitos hipogonádicos da diabetes observados em camundongos com gens db/db são rememorativos dos distúrbios na potência e fertilidade sexual, freqüentemente verificados, na fase pré-insulínica, em seres humanos. HANKER et al. ( 1980 ) observaram efeitos marcantes da doença no tamanho e peso das gônadas dos camundongos de ambos os sexos. Várias hipóteses têm surgido tentando explicar o hipogonadismo observado em pacientes diabéticos, as quais, geralmente, propõem ser algum dano ou distúrbio do eixo hipotalâmico-hipofisário, com relação à função gonadotrófica ( WHITE, 1947; SCHÖFFLING et al., 1963; DAUBRESSE et al., 1978 ). Essas hipóteses são apoiadas por estudos "in vitro" da produção de testosterona nos testículos de camundongos normais e diabéticos, os quais não apresentaram diferenças ( COFFEY et

al., 1980 ).

A proteinúria apresentada nos animais diabéticos pela aloxana ou estreptozotocina, provavelmente, se deva a alterações glomerulares ou tubulares, cu ambos, estando de acordo com as conclusões de WEIL III et al ( 1976 ), que, trabalhando com ratos, atribuíram a proteinúria às alterações renais, que poderiam ser causadas pelo estado diabético do animal ou pela toxicidade da estreptozotocina. É notório que proteinúria é característica de doença renal ( WINTON & BAYLISS, 1970 ) e ( SODEMAN & SODEMAN, 1983 ), entretanto, as causas das lesões renais, sugeridas por diversos autores, são variadas. ARISON et al. ( 1967 ), WEIL III et al ( 1976 ) e FOY & SALIH ( 1979 ) apresentaram a aloxana e a estreptozotocina como causas de lesões renais. Já LAZAROW & PALAY ( 1946 ) e LEE et al. ( 1974 ) atribuíram essas lesões mais à própria condição diabética ou ao uso de doses excessivas do que à natureza química desses agentes.

Por outro lado, em trabalhos mais recentes, onde a estreptozotocina foi usada no tratamento dos mais variados tipos de câncer, um número significativo de pacientes apresentou proteinúria transitória durante a administração da droga ( STOLINSKY et al., 1972; SCHEIN et al., 1974; DUPRIEST JR. et al., 1975; ÖBERG et al., 1981 ). Esses autores atribuíram a proteinúria aos efeitos tóxicos da droga sobre os rins, visto que, com a suspensão da droga, a função renal se restabeleceu. A maioria dos pacientes em tratamento com a estreptozotocina apresentou proteinúria, além de outras elimina

ções anormais, contudo, somente um número bastante reduzido desses pacientes apresentou glicosúria ou elevação da taxa de glicose no soro, mas sem desenvolver uma diabetes clínica e com total restabelecimento do metabolismo, após a cessação da droga.

Aparentemente, mais contraditórios, foram os achados de LIKE et al. ( 1972 ), em que camundongos machos normais ( db/n ) excretaram quantidades significantes de proteínas pela urina, ao contrário dos camundongos machos diabéticos ( db/db ). Esses autores descartaram a possibilidade de que a proteinúria seja um resultado da patologia glomerular, mas não excluem o papel hipotético da hiperglicemia como um importante estímulo de alterações glomerulares na diabetes mellitus. HANKER et al. ( 1980 ) confirmaram aqueles achados de LIKE, para camundongos diabéticos ( db/db ) de geração espontânea.

Como pode ser observado, faz-se necessário não apenas um estudo específico relacionando a proteinúria com as lesões renais, mas, também, os vários fatores que podem causar essas lesões, ou seja, as diabetes espontânea ou induzida por drogas, ou a toxicidade dessas drogas, ou ainda, a espécie de animais utilizados ( machos ou fêmeas ).

Em nossas observações, as células acinosas das glândulas submandibulares dos camundongos tratados com aloxana ou estreptozotocina não apresentaram aquelas alterações degenerativas ou necróticas, descritas por CUTLER et al., ( 1979 ), em ratos diabéticos pela estreptozotocina no período

do de 14 a 21 dias após o tratamento. Por outro lado, as alterações observadas por esses autores, as quais tiveram início 24 horas após o tratamento, ou seja, a fusão de vários grânulos de secreção, formando grandes lagoas de material secretor e tornando-se mais proeminentes durante a segunda semana, foram observadas, também, em nosso material, nas células acinosas dos camundongos que receberam estreptozotocina como tratamento. Naqueles animais que receberam a aloxana, os grânulos secretores das células acinosas apresentaram um possível início de um processo semelhante, mas sem formar lagoas de material secretor. CUTLER et al. ( 1979 ), em seu estudo, relacionou a fase degenerativa ou necrótica em ratos diabéticos, que teve início durante o período de 14 a 21 dias após o tratamento com estreptozotocina, como coincidente com a fase do decréscimo da atividade enzimática descrita por WRIGHT & GIAMMARA ( 1976 ).

Em nossos estudos, os ácinos, os ductos intercalados e os ductos coletores das glândulas submandibulares dos camundongos diabéticos ( db/db ) de geração espontânea, machos e fêmeas, mostraram-se semelhantes aos dos respectivos animais controles, estando de acordo com os resultados de CARSON ( 1979 ).

Os ductos granulosos das glândulas submandibulares dos camundongos tratados pela aloxana ou estreptozotocina apresentaram uma redução considerável de tamanho, e esboçaram, ainda, alterações citoplasmáticas evidentes, vistos nos cortes corados pela HE e em cortes semifinos corados com

azul de metileno - azur II de Mallory. Essa redução ou con  
tração dos ductos granulosos pode ser atribuída aos efeitos  
hipogonádicos da diabetes, levando a glândula submandibular  
a apresentar aquelas características encontradas nas glându  
las dos camundongos fêmeas, descritas pela primeira vez por  
LACASSAGNE ( 1940a ), como dimorfismo sexual. LACASSAGNE  
( 1940a ) e RAYNAUD ( 1960 ) observaram, também, que a glându  
la submandibular não apresenta dimorfismo sexual antes da  
puberdade. Ainda LACASSAGNE ( 1940c ) relatou que a castra-  
ção de camundongos machos adultos resultou na regressão dos  
ductos secretores, os quais adquiriram a aparência e dimensões  
dos ductos das glândulas submandibulares das fêmeas.  
CHRETIEN ( 1977 ) observou que uma das características do de-  
senvolvimento afetadas pelo hipogonadismo nos camundongos  
diabéticos foi a diferenciação celular nas glândulas subman-  
dibulares de camundongos machos. Sob circunstâncias normais,  
o aumento na testosterona, que acompanha a puberdade nos ma-  
chos, resulta na diferenciação e hipertrofia dos ductos gra-  
nulosos dos camundongos machos.

As alterações citoplasmáticas encontradas nas célu-  
las dos ductos granulosos nos camundongos tratados com agen-  
tes diabetogênicos, assim como nos animais diabéticos ( db/  
db ) machos, apresentaram-se semelhantes ao nível da micros-  
copia óptica, quanto ao número de grânulos de secreção, de-  
sorganização do citoplasma e à predominância da área ocupada  
pelos ácinos sobre os ductos granulosos. Excetua-se dessa  
semelhança algumas regiões dos ductos granulosos daqueles

animais que receberam estreptozotocina como tratamento, tendo-se verificado que algumas células apresentaram um maior grau de severidade, com áreas necróticas ou degenerativas e grandes vacúolos o que, provavelmente, se deva à ação tóxica da droga, pois não foram observadas na diabetes espontânea. CUTLER et al. ( 1979 ) observaram que atrofia ou degeneração das glândulas salivares na diabetes pode acarretar o decréscimo da secreção salivar, como, algumas vezes, é encontrado em pacientes diabéticos. Em estudos com ratos diabéticos pela estreptozotocina, esses autores observaram degeneração, autofagia, necrose das células acinosas e substituição do tecido secretor por tecido conectivo nas glândulas submandibulares. Essas alterações ocorreram dentro de um período de 14 a 21 dias após o tratamento com a droga. Em estudos realizados por CARSON ( 1979 ), camundongos diabéticos ( db/db ) não apresentaram evidências de degeneração nas glândulas submandibulares, mesmo após 12-24 meses. Esse autor argumentou que estes aspectos merecem estudos adicionais.

À microscopia eletrônica, os ductos granulados dos animais tratados com aloxana ou estreptozotocina revelaram alterações, algumas devidas ao estado diabético, e outras, provavelmente, causadas pela ação tóxica das drogas. As alterações causadas pelo estado diabético são representadas por transformações morfológicas indicativas de feminização dos ductos, provocadas, talvez, pelo hipogonadismo frequentemente encontrado nas diabetes.

As alterações que aparentemente foram provocadas

pela ação tóxica da droga, ou provavelmente pelo número de doses administradas, uma vez que não foram observadas nos animais com diabetes espontânea, são aquelas encontradas nas células dos ductos granulosos dos animais tratados com estreptozotocina, em que são evidentes áreas necróticas ou de generadas e grandes vacúolos, estando de acordo com os resultados preliminares de CAMARGO et al. ( 1981 ). Outras alterações, presumivelmente provocadas pelos efeitos da droga, são aquelas apresentadas pelos grânulos secretores dos ductos, pelos perfis de retículo endoplasmático rugoso e outras organelas, as mudanças de padrão das cristas das mitocôndrias e o acúmulo de material secretor nas células acinosas dos animais tratados com estreptozotocina. Os animais que receberam a aloxana como tratamento apresentaram também alterações causadas pelo efeito da droga, mas sem atingirem as mesmas proporções de severidade, como aquelas provocadas pela estreptozotocina. CARSON ( 1979 ), em machos com diabetes espontânea, também não observou as alterações aqui descritas em animais com diabetes induzida por drogas.

As transformações morfológicas causadas pelo hipogonadismo presente nas diabetes ocorrem tanto nos camundongos machos diabéticos por indução, como naqueles diabéticos de geração espontânea. As transformações que ocorrem nas glândulas submandibulares dos camundongos machos diabéticos, além da redução dos ductos granulosos como um todo, referem-se às células dos ductos granulosos, que apresentaram relativamente poucos grânulos secretores. Os perfis de retículo en

doplasasmático rugoso são mais esparsos, menos extensos e desorganizados, as mitocôndrias são mais proeminentes, alongadas, orientadas perpendicularmente à lâmina basal e geralmente aparecem associadas com as extensas invaginações da membrana basal plasmática. Essas características que as células dos ductos granulosos dos camundongos machos diabéticos por indução ou de geração espontânea apresentaram, são semelhantes às aquelas encontradas nas fêmeas normais, sugerindo, dessa forma, a feminização dos ductos granulosos das glândulas submandibulares de camundongos machos diabéticos por indução, assim como os de geração espontânea, de acordo também com os resultados de CARSON ( 1979 ) e com os resultados preliminares de HILTON et al. ( 1981 ).

Nas fêmeas diabéticas ( db/db ) de geração espontânea, os ductos granulosos das glândulas submandibulares apresentaram transformações que diferenciam do aspecto encontrado nas fêmeas normais ( db/n ), sugerindo uma semelhança mais próxima daquela encontrada nos machos normais. Essas transformações sugerem a masculinização dos ductos granulosos das glândulas submandibulares das fêmeas diabéticas ( db/db ), confirmando os resultados de CARSON ( 1979 ) e os estudos ultra-estruturais das glândulas submandibulares de camundongos, realizados por CARAMIA ( 1966 a e b ), apresentando as diferenças sexuais das células dos ductos granulosos entre machos e fêmeas e em camundongos machos castrados.

Os resultados histoquímicos para a localização da acetilcolinesterase, na inervação parassimpática das glândulas submandibulares, demonstraram a presença dos axônios em

torno dos ductos granulosos e adjacentes às células acinosas. Nos camundongos machos normais ( db/n ), os axônios foram ni tidamente evidenciados, tornando possível acompanhar, até mesmo, um único axônio em torno dos ductos ou dos ácidos.

Nos animais diabéticos, pela administração da alo xana, pode-se observar uma diminuição aparente do número de axônios em torno dos ductos granulosos e dos ácidos. Esse aparente decréscimo em número e intensidade de reação, está de acordo com os resultados de CARSON ( 1979 ) e HANKER et al. ( 1980 ), para camundongos machos diabéticos ( db/db ) de geração espontânea.

Quanto aos camundongos diabéticos pela estreptozotocina, aparentemente parece ter havido um aumento da inervação parassimpática em torno dos ductos e dos ácidos. É provável que esse fato tenha ocorrido devido à grande redução sofrida pelos ductos granulosos e, conseqüentemente, pela glândula num todo, fazendo com que houvesse uma maior concentração de acetilcolinesterase num espaço menor de tecido. Esse mesmo aspecto pode ser observado nas glândulas submandibulares dos camundongos machos diabéticos ( db/db ) de geração espontânea, visto que elas assemelharam-se no grau de redução ou contração que as glândulas desses animais sofreram. CARSON ( 1979 ) demonstrou que o produto da reação da acetilcolinesterase estava localizado adjacente às vesículas agranulares esféricas, estruturas semelhantes às terminações nervosas. Uma outra hipótese, que não pode ser descartada e que pode ter influenciado nesse resultado, é a espessura do cor

te, mesmo porque o tecido glandular, incluído em agar a 7%, demonstrou ser difícil de cortar pelo sistema de secção feita através do "Vibratome", considerando, ainda, o estado de alterações que as glândulas submandibulares dos animais tratados com estreptozotocina apresentavam.

As glândulas submandibulares dos camundongos fêmeas diabéticas ( db/db ), de geração espontânea, apresentaram um aumento aparente da inervação parassimpática, quando comparadas àquelas das fêmeas normais. Esses achados estão de acordo com os resultados de CARSON ( 1979 ) e HANKER et al. ( 1980 ). CARSON, contudo, argumenta que, embora tenha havido um aumento nos ductos granulosos das fêmeas diabéticas, eles permaneceram ainda menores que os dos machos normais. Contudo, houve um aumento definido na atividade da acetilcolinesterase, associada aos nervos em torno dos ductos granulosos, quando comparada com as fêmeas normais.

Os resultados histoquímicos observados na inervação parassimpática das glândulas submandibulares dos camundongos diabéticos pela aloxana e nas fêmeas diabéticas ( db/db ), vêm reforçar a idéia da feminização nos camundongos machos diabéticos e a masculinização nas fêmeas diabéticas. Esse dimorfismo sexual morfológico e histoquímico que as glândulas submandibulares apresentaram, provavelmente, são consequências do hipogonadismo presente na diabetes.

Existem evidências de que a masculinização ocorre em mulheres diabéticas. SZPUNAR et al. ( 1977 ) observaram que a incidência de excesso de pelos entre mulheres diabéti

cas ( 29% ) superou aquela encontrada em pacientes mulheres não diabéticas ( 13% ). Em mulheres diabéticas com idade igual ou acima de 38 anos, foi observado que a concentração de plasmas andrôgenos, androstenediona, dehidrotosterona, testosterona e dehidroepiandrosterona era significativamente mais alta do que a dos grupos controles de mesma idade. Resultados semelhantes não foram encontrados em camundongos fêmeas diabéticas.

CARSON ( 1979 ) argumenta as várias indicações pelas quais a masculinização ocorreu nos camundongos fêmeas diabéticas ( db/db ). O padrão da reação de acetilcolinesterase e citocromo oxidase pareceu ter claramente aspecto dos machos, como também a morfologia ultra-estrutural das células dos ductos granulosos era semelhante à dos machos. Os nossos resultados em relação às fêmeas diabéticas, confirmam esses achados. Aquele autor acrescenta, ainda, que a localização imunocitoquímica do fator de crescimento do nervo nas fêmeas diabéticas tinha características dos machos. Existem ainda várias explicações para esses fenômenos em camundongos fêmeas diabéticas, incluindo a perda do equilíbrio estrógeno-andrôgeno, devido ao hipogonadismo, hipersecreção de andrôgenos da córtex da supra-renal, diminuição do catabolismo dos andrôgenos e aumento da sensibilidade andrôgena dos tecidos periféricos. COLEMAN and BURKART ( 1977 ) observaram que a presença de altos níveis de corticosteróides da supra-renal dos camundongos diabéticos sugerem que a hipersecreção pode ser a origem da masculinização nos camundongos fêmeas diabé

ticos.

SCHWAB et al. ( 1976 ) observaram que a diminuição marcante da reação dos nervos colinérgicos dos ductos estria dos menores, característica das fêmeas, quando comparada com a reação da inervação dos ductos granulosos maiores dos machos, são reminiscências das diferenças no teor do fator de crescimento do nervo desses diferentes tipos de ductos das glândulas submandibulares.

HANKER et al. ( 1980 ) também atribuíram a diminuição dos nervos colinesterase-positivas, vistos nos machos diabéticos e o aumento na inervação correspondente das fêmeas diabéticas, como diferenças nos tipos de ductos. Esses autores acrescentaram ainda que essas observações sugerem que, em áreas muito ricas em fator de crescimento do nervo, tais como nas glândulas submandibulares de camundongos, o fator de crescimento do nervo pode ter um efeito sobre o desenvolvimento da inervação parassimpática, bem como sobre a inervação simpática e sensorial. Este efeito sobre o nervo colinérgico pode ser direto ou indireto. No último caso, o fator de crescimento do nervo pode liberar um fator que pode afetar o desenvolvimento do nervo parassimpático. Alternativamente, pode ser um fator dos ductos granulosos, independente do fator de crescimento do nervo, que controla o desenvolvimento dessa inervação.

Em resumo, a diabetes induzida em camundongos, pela aloxana ou estreptozotocina, apresentou características semelhantes às encontradas nos camundongos machos dia

béticos ( db/db ) de geração espontânea. Tais características foram atribuídas ao hipogonadismo presente nas diabetes, com a feminização das células dos ductos granulosos. Outras alterações mais severas nas células dos ductos granulosos e nas células acinosas, assim como, a maior perda de peso, a redução mais acentuada das glândulas submandibulares e dos rins e a maior taxa de proteinúria, nos animais tratados com estreptozotocina, foram atribuídas à ação tóxica da droga ou ao número de doses administradas. Baseado nesses resultados, pode-se admitir que a estreptozotocina seja uma droga mais tóxica que a aloxana. As glândulas submandibulares dos camundongos fêmeas diabéticos também apresentaram características morfológicas e histoquímica da inervação parassimpática, que suportam a hipótese de que a masculinização ocorre nas fêmeas diabéticas.

## RESUMO

Camundongos machos, C57BL/KsJ db/n normais, foram submetidos a tratamento com aloxana ou estreptozotocina, agentes diabetogênicos, para indução da diabetes, e camundongos diabéticos, C57BL/KsJ db/db, machos e fêmeas, de geração espontânea, foram usados para estudos morfológico e histoquímico das glândulas submandibulares.

Os camundongos machos normais receberam cinco injeções intraperitoneais de aloxana ou estreptozotocina, em intervalos regulares de 7 dias cada uma. Antes e durante o tratamento foram feitos testes de urina com fitas reagentes (Combistix), para controle de glicose, proteína e pH. Os animais foram sacrificados por perfusão intravascular de solução salina normal, seguida de 2% de paraformaldeído em 0,1M tampão fosfato pH 7,4, completando a fixação por 2,5 horas sob imersão em 2% de paraformaldeído e 3% de glutaraldeído em 0,1 M tampão fosfato pH 7,4. Vários órgãos foram retirados e pesados.

O estudo morfológico das glândulas submandibulares foi feito através da microscopia óptica e eletrônica. Para o estudo histológico, foram empregados cortes em parafina e semifinos em resina. No estudo ultra-estrutural, foi empregada a técnica do "Wafer embedding". O estudo histoquímico da

inervação parassimpática das glândulas submandibulares foi feito através da acetilcolinesterase.

Todos os camundongos machos sob tratamento com os agentes diabetogênicos apresentaram perda de peso associada à proteinúria e glicosúria; à redução de peso e tamanho das glândulas submandibulares, rins e testículos; e ao aumento de peso e tamanho das glândulas supra-renais.

Histologicamente, as glândulas submandibulares dos camundongos machos diabéticos por indução apresentaram predominância da área ocupada pelos ácinos, decorrente da redução dos ductos granulosos, adquirindo aparência e dimensões daqueles das fêmeas normais. Visíveis alterações foram evidenciadas nas células dos ductos granulosos, com grau de severidade maior para os animais que receberam estreptozotocina do que para aqueles que receberam aloxana como tratamento, quando comparados com os animais controles. As glândulas submandibulares dos camundongos diabéticos pela ação da aloxana, apresentaram uma aparente redução dos axônios evidenciados através da acetilcolinesterase, ao contrário daqueles animais diabéticos pela ação da estreptozotocina e dos machos diabéticos de geração espontânea, que apresentaram um suposto aumento na atividade da acetilcolinesterase.

Ao nível ultra-estrutural, as glândulas submandibulares dos camundongos machos diabéticos pela administração das drogas, evidenciaram : ( 1 ) transformações nas células dos ductos granulosos, que passaram a apresentar algumas características semelhantes às encontradas nos ductos granulo

dos dos camundongos fêmeas normais; ( 2 ) algumas alterações mais severas nas células dos ductos granulosos, que provavelmente se devam à toxicidade das drogas, principalmente da estreptozotocina; ( 3 ) alterações nos grânulos das células acinosas dos animais tratados com estreptozotocina, pelo acúmulo de material secretor em forma de lagoas.

A estreptozotocina demonstrou ser um agente diabético mais severo que a aloxana.

As glândulas submandibulares dos camundongos machos diabéticos ( db/db ) de geração espontânea apresentaram características morfológicas semelhantes às encontradas nos ductos granulosos dos machos diabéticos por indução, que também são semelhantes às daquelas das fêmeas normais.

As glândulas submandibulares dos camundongos fêmeas diabéticos ( db/db ) de geração espontânea apresentaram características morfológicas e histoquímica, que sugerem semelhanças mais próximas daquelas encontradas nos machos normais.

Diante dos resultados, as glândulas submandibulares dos camundongos machos diabéticos pela indução química ou de geração espontânea ( db/db ) e também das fêmeas diabéticas ( db/db ), apresentaram transformações causadas pelo hipogonadismo presente nas diabetes, que levam a sugerir a feminização dos machos e a masculinização das fêmeas diabéticos, além de algumas alterações que são provavelmente devidas à ação tóxica das drogas.

## BIBLIOGRAFIA

- AMIES, G. & PARK, S. Dental survey in diabetic children. Aust. J. Dent., 52: 233-7, 1948.
- ARISON, R.N.; CIACCIO, E.I.; GLITZER, M.S.; CASSARO, J.A. & PRUSS, M.P. Light and electron microscopy of lesions in rats rendered diabetic with streptozotocin. Diabetes, 16: 51-6, 1967.
- BANKS Jr., S. Diabetes and its oral manifestations: a medico-dental problem. Bull. natn. dent. Ass., 4: 7, 1945.
- BELTING, C.; HINKLER, J. & DUMMETT, C. Influence of diabetes mellitus on the severity of periodontal disease. J. Periodont., 35: 476, 1964.
- BERTRAM, U. Xerostomia: clinical aspects, pathology and pathogenesis. Acta Odont. scand., 25 ( Suppl. 49 ): 1-126, 1967.
- CAMARGO, A.M. de; HANKER, J.S.; AMBROSE, W.W.; HILTON, F. & GIAMMARA, B.L. Effects of streptozotocin and alloxan on granular tubules of male mouse submandibular gland. Ann.

Proc. Electron Microscopy Soc. Amer., 39: 596-7, 1981.

CARAMIA, F. Ultrastructure of mouse submaxillary glands I. Sexual differences. J. Ultrastruct. Res., 16: 505, 1966a.

CARAMIA, F. Ultrastructure of mouse submaxillary glands II. Effect of castration in the male. J. Ultrastruct. Res., 16: 524, 1966b.

CARSON, K.A. Cytochemical and cytopathological studies of nerve, vascular and salivary gland tissues in an hereditary mouse model for diabetes mellitus. A dissertation submitted to the faculty of the University of North Carolina at Chapel Hill. Doctor of Philosophy. Chapel Hill, N.C. USA, 1979.

CAUSSE, R. & LACASSAGNE, A. Rapport de formations tubuleuses et acineuses de la glande sous-maxillaire de la souris. C. r. Soc. Biol., 136: 413, 1942.

CHAULIN-SERVINIÈRE, J. Castration et la glande sous-maxillaire de la souris femelle. C. r. Soc. Biol., 136: 335, 1942.

CHRETIEN, M. Action of testosterone on the differentiation and secretory activity of a target organ: the submaxillary gland of the mouse. Int. Rev. Cytol., 50: 333-96, 1977.

- COFFEY Jr., J.C.; CARSON, K.A. & HANKER, J.S. In vitro androgen metabolism in submaxillary glands of normal and diabetic C57BL/KsJ db/db mice. Apud HANKER et al. (1980)
- COHEN, M.M. Clinical studies of dental caries susceptibility in young diabetes. J. Am. dent. Ass., 34: 239, 1947.
- COLEMAN, D. & BURKART, D. Plasma corticosterone concentrations in diabetic mice. Diabetologia, 13: 25-6, 1977.
- CONNER, S.; IRANPOUR, B. & MILLS, J. Alteration in parotid salivary flow in diabetes mellitus. Oral Surg., 30: 55, 1970.
- CREUTZFELDT, W.; KOBBERLING, J. & NEEL, J. eds. The Genetics of Diabetes Mellitus. New York, Springer Verlag, 1976.
- CUTLER, L.; PINNEY, H.; CHRISTIAN, C. & RUSSOTO, S. The effects of streptozotocin induced diabetes on the rat submandibular gland. J. Dent. Res., 56B: 151, 1977.
- CUTLER, L.S.; PINNEY, H.E.; CHRISTIAN, C. & RUSSOTTO, S.B. Ultrastructural studies of the rat submandibular gland in streptozotocin induced diabetes mellitus. Virchows Arch. path. Anat. Hist., 382: 301-11, 1979.
- DAUBRESSE, J.C.; MEUNIER, J.C.; WILMOTTE, J.; LUYCKX, A.S.;

- & LEFEBVRE, P.J. Pituitary-testicular axis in diabetic men with and without sexual impotence. Diabetes Metabol. 4: 233-7, 1978.
- DUBOC, P.; MOBLEY, P.W.M. & MAHLER, R.J. Elevated glucocorticoids in obese-hyperglycemic mice. Horm. metab. Res., 7: 102, 1975.
- DUPRIEST Jr., R.W.; HUNTINGTON, M.C.; MASSEY, W.H.; WEISS, A.J.; WILSON, W.L. & FLETCHER, W.S. Streptozotocin therapy in 22 cancer patients. Cancer, 35: 358-367, 1975.
- ELLENBERG & RIFKIN, 1962. Apud CARSON, K.A. Cytochemical and cytopathological studies of nerve, vascular and salivary gland tissues in an hereditary mouse model for diabetes mellitus. A dissertation submitted to the faculty of the University of North Carolina at Chapel Hill. Doctor of Philosophy. Chapel Hill, N.C. USA, 1979.
- FEKETE, E. Submaxillary glands of the mouse. In: Biology of the Laboratory Mouse, ed. G. D. Snell. Philadelphia, The Blakiston Company, 1941, p. 112.
- FLATLAND, R.F.; SCHNEYER, L.H. & SCHNEYER, C.A. Amylase activity of acinar cells separated from guinea pig submaxillary gland. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 131: 243-6, 1969
- FOY, J.M. & SALIH, A.K.M. Glomerular filtration rate and

- Kidney blood flow in alloxan and streptozotocin diabetic rats. Experientia, 35: 1084-6, 1979.
- GOMORI, G. & GOLDNER, M.G. Production of diabetes mellitus in rats with alloxan. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 54: 287-90, 1943.
- HANKER, J.S.; THORNBURG, L.P.; YATES, P.E. & MOORE III, H.G. The demonstration of cholinesterases by the formation of osmium blacks at the sites of Hatchett's brown. Histochemie, 37: 223-42, 1973b.
- HANKER, J.S.; CARSON, K.A.; YATES, P.E.; PREECE, J.W.; DOE, D.A.; AMBROSE, W.W. & COFFEY Jr., J.C. Cytochemical correlates of structural sexual dimorphism in glandular tissues of the mouse. II. Hypogonadic effects in the submandibular gland and kidney due to diabetes mellitus. Histochemistry, 68: 99-118, 1980.
- HARVEY, H. A comparative study of salivary gland and pancreatic amylolytic activity. Anat. Rec., 128: 560, 1957.
- HELLERSTROM, D.; HELLMAN, B. & LARSSON, S. Some aspects of the structure and histochemistry of the adrenals in obese hyperglycemic mice. Acta Path. microbiol. Scand., 54: 365-72, 1962.
- HERBERG, L. & COLEMAN, D. Laboratory animals exhibiting obe

- sity and diabetes syndromes. Metabolism, 26: 59-99, 1977
- HILTON, F.K. & GRAVISS, E.R. Effect of hyperglycemia on fructose biosynthesis in mouse seminal vesicles. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 124: 956-9, 1967.
- HILTON, F.; GIAMMARA, B.; WRIGHT, B.; CAMARGO, A.M. de & HANKER, J.S. Effects of spontaneous and alloxan diabetes on mouse submandibular glands. J. Dent. Res., 60: 357, 1981
- HUNT, E.L. & BAILEY, D.W. The effects of alloxan diabetes on the reproductive system of young male rats. Acta Endocrinol., 38: 432-40, 1961.
- JUNQUEIRA, L.C.U. Cytochemical studies on the sexual dimorphism of the submaxillary glands of mice. Anat. Rec., 100: 682, 1948.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; FAJER, A.; RABINOVITCH, M. & FRANKENTHAL, L. Biochemical and histochemical observations on the sexual dimorphism of mice submaxillary glands. J. cell. comp. Physiol., 34: 129-58, 1949.
- KASS, E.H. & WAISBREN, B.A. A method for consistent induction of chronic hyperglycemia with alloxan. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 60: 303-6, 1945.

- KLAPPER, C.E. The effect of salivary gland extirpation on experimental dental caries in the Syrian hamster. J. Am. Coll. Dent., 23: 186-7, 1956.
- LACASSAGNE, A. Dimorphisme sexual de la glande sous-maxillaire chez la souris. C.r. Séanc. Mens. Soc. Biol. Fil. Ass., 133: 180-1, 1940a.
- LACASSAGNE, A. Réactions de la glande sous-maxillaire à l'hormone mâle chez la souris et le rat. C. r. Soc. Biol., 133: 539, 1940c.
- LAZAROW, A. & PALAY, S.L. The production and course of alloxan diabetes in the rat. J. Lab. clin. Med., 31: 1004-15, 1946.
- LAZAROW, A. Spontaneous recovery from alloxan diabetes in the rat. Diabetes, 1: 363-72, 1952.
- LEE, C.S.; MAUER, S.M.; BROWN, D.M. et al. Renal transplantation in diabetes mellitus in rats. J. exp. Med., 139: 793-800, 1974. Apud WEIL III, et al. ( 1976 ).
- LIKE, A.A.; LAVINE, R.L.; POFFENBARGER, P.L. & CHICK, W.L. Studies in the diabetic mutant mouse. VI. Evolution of glomerular lesions and associated proteinuria. Am. J. Path., 66: 193-224, 1972.

- LIU, F.T. & LIN, H.S. Role of insulin in body growth and the growth of salivary and endocrine glands in rats. J. Dent. Res., 48: 559-67, 1969a.
- LIU, F.T. & LIN, H.S. Relationship between insulin and growth hormone in growth and development of rat submandibular glands. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 131: 175-9, 1969b.
- MASI, I.; POCCHIARI, F. & SZYMCZYK, T. Metabolismo del glucosio nella ghiandola sottomacellare di ratta in vitro. Effecto dell'insulina. Ann. Ist. Super. sanit., 2: 287-95, 1966.
- MOGENSEN, C.E.; ANDERSEN, M.J.F. & DENMARK, A. Increased kidney size and glomerular filtration rate in early juvenile diabetes. Diabetes, 22: 706-12, 1973.
- MOGENSEN, C.E. & ANDERSEN, M.J.F. Increased kidney size and glomerular filtration rate in untreated juvenile diabetes: Normalization by insulin-treatment. Diabetologia, 11: 221-4, 1975.
- NACE, P.F.; HOUSE, E.L. & TASSONI, J.P. Alloxan diabetes in the hamster: Dosage and blood sugar curves. Endocrinology, 58: 305-8, 1956.

NAEYE, R. Organ abnormalities in diabetic mice. Am. J. Path., 52: 41a-2a, 1968.

ÖBERG, K.; LUNDQVIST, G. & BOSTRÖM, H. The effects of streptozotocin in the treatment of endocrine pancreatic, tumours and carcinoids. In: AGARWAL, M.K. ed. Streptozotocin: Fundamentals and Therapy. Amsterdam, Elsevier and North-Holland Biomedical, 1981, Cap. 19.

PEARSE, A.G.E. Histochemistry, theoretical and applied, 3. ed., Edinburgh, Churchill Livingstone, 1968, v.1.

RATSIMAMANGA, A.R. Variations de l'activite de la surrenale dans differentes formes de diabete chez la souris. C.r. Acad. Séanc. D, 269: 1781-4, 1969.

RAYNAUD, J. Etat de developpment du segment tubuleux de la glande sous-maxillaire chez les souris castrées a la naissance. Ann. Endocr., 5: 94-6, 1944.

RAYNAUD, J. & REBEYROTTE, P. Difference de l'activité amylique de la salive des Souris males et des Souris femelles; son conditionnement hormonal. C.r. Soc. Biol., 228: 433, 1949.

RAYNAUD, J. Controle hormonal de la glande sous-maxillaire de la souris. Bull. biol. Fr. Belg., 94: 399-523, 1960.

Apud CARSON ( 1979 ).

RICHARDSON, K.C.; JARETT, L. & FINKE, E.H. Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. Stain Technol., 35: 313-23, 1960.

ROMANOVICZ, D.K. & HANKER, J.S. Wafer embedding: specimen selection in electron microscopy citochemistry with osmophilic polimers. Histochem. J., 9: 317-27, 1977.

ROSS, J. & GOLDMAN, J.K. Effect of streptozotocin-induced diabetes on kidney weight and compensatory hypertrophy in the rat. Endocrinology, 88: 1079-82, 1971.

SCHEIN, P.S.; CONNELL, M.J.O.; BLOM, J.; HUBBARD, S.; MARGRATH, I.T.; BERGEVIN, P.; WIERNIK, P.H.; ZIEGLER, J.L. & DEVITA, V.T. Clinical antitumor activity and toxicity of streptozotocin. Cancer, 34: 993-1000, 1974.

SCHNEYER, L.H. & SCHNEYER, C.A. Apparent synthesis of submaxillary gland amylase during pilocarpine stimulation. Am. J. Physiol., 187: 404, 1956.

SCHNEYER, L.H. & SCHNEYER, C.A. Increase in amylase in rat submaxillary gland in response to acetylcholine or feeding. Am. J. Physiol., 193: 1, 1958.

- SCHNEYER, L.H. & SCHNEYER, C.A. Regulation of salivary gland amylase activity. Ann. N.Y. Acad. Sci., 85: 189, 1960.
- SCHÖFFLING, K.; FEDERLIN, K.; DITSCHUNEIT, H. & PFEIGER, E. Disorders of sexual function in male diabetes. Diabetes, 12: 519-27, 1963.
- SCHWAB, M.; STOCKEL, K. & THOENEN, H. Immunocytochemical localization of nerve growth factor in the submandibular gland of adult mice by light and electron microscopy. Cell Tissue Res., 169: 289-99, 1976.
- SHACKLEFORD, J.M. & KLAPPER, C.E. Casein degrading ability of hamster, rat and mouse salivary glands. Archs oral Biol., 7: 337-42, 1962a.
- SHAFFER, W.G. & MUHLER, J.C. Endocrine influences upon the salivary glands. Ann. N.Y. Acad. Sci., 85: 215-27, 1960.
- SHEPPARD, J. Oral manifestations of diabetes mellitus: A study of 100 cases. J. Am. dent. Ass., 29: 1188, 1942.
- SHERIDAN, R.; CHERASKIN, E.; FLYNN, F. & HUTTO, A. Epidemiology of diabetes mellitus. II. A study of 100 dental patients. J. Periodont., 30: 298-323, 1959.
- SODEMAN Jr., W.A. & SODEMAN, T.M. Fisiología Patológica de

Sodeman. Trad. de Ana Maria de Andrade e outros. Rio de Janeiro, Interamericana, 1983. p. 392-393.

SREEBNY, L.M.; MEYER, J.; BACHEM, E. & WEINMAN, J.P. Postnatal changes in proteolytic activity and in the morphology of the submaxillary gland in male and female albino rats. Growth, 19: 57, 1955.

SREEBNY, L.M.; ROSEN, S.; BACHEN, E.; HUNT, P.H. & HOPPERT, C.A. The effect of castration on submaxillary glands of Hunt-Hoppert caries-resistant and caries-susceptible rats J. Dent. Res., 38: 67-71, 1959.

SREEBNY, L.M. Studies of salivary gland proteases. Ann. N.Y. Acad. Sci., 85: 182-8, 1960.

STOLINSKY, D.C.; SADOFF, L.; BRAUNWALD, J. & BATEMAN, J.R. Streptozotocin in the treatment of cancer: Phase II study Cancer, 30: 61-7, 1972.

SZPUNAR, W.; BLAIR, A. & McCANN, D. Plasma androgen concentrations in diabetic woman. Diabetes, 26: 1125-9, 1977.

WEIL III, R.; NOZAWA, M.; KOSS, M.; WEBER, C.; REEMTSMA, K. & McINTOSH, R. The kidney in streptozotocin diabetic rats: Morphologic, ultrastructural, and function studies. Arch Path. Lab. Med., 100: 37-49, 1976.

WHITE, P. Pregnancy complicating diabetes. Pa. Med. J.,  
50: 705-8, 1947. Apud HANKER ( 1980 ).

WILLIAMS, R.H. & ENSINCK, J.W. Secretion, fates and actions  
of insulin and related products. Diabetes, 15: 623-54,  
1966.

WINTON, F.R. & BAYLISS, W. Fisiologia Humana. Trad. de  
Eduardo Oswaldo Cruz e outros. Rio de Janeiro, Cultura  
Médica, 1970. p. 707.

WRIGHT, B. & GIAMMARA, B. Morphologic and enzymatic altera-  
tions in alloxan diabetic mouse submandibular glands. J.  
Dent. Res., 55B: 231, 1976.