

ATROFIA DA GLÂNDULA SUBMANDIBULAR DE RATOS APÓS LIGADURA DO DUCTO EXCRETOR

**John Magno de Alvarenga¹, Suellen de Alvarenga¹, Alexandre Prado Scherma²,
Maria Stella Amorim da Costa Zöllner², Carlos Eduardo Dias Colombo^{1,3}**

¹Universidade de Taubaté/Departamento de Odontologia, Rua dos Operários, 9, Centro, Taubaté – SP, jma.jrstb@gmail.com, carlosedcolombo@yahoo.com.br

²Universidade de Taubaté/Instituto Básico de Biociências, Av. Tiradentes, 500, Centro, Taubaté – SP

³Universidade do Vale do Paraíba/Faculdade de Ciências da Saúde, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, S.J.Campos – SP

Resumo- A atrofia da glândula submandibular devido à radioterapia, sialolitíase e sialadenite é um importante problema clínico, podendo causar xerostomia. O objetivo do trabalho foi estudar histologicamente a atrofia da glândula submandibular de ratos após ligadura do ducto excretor. Foram utilizados 20 ratos Wistar, sendo que em 15 animais a glândula submandibular direita foi submetida à ligadura ductal, utilizando fio de algodão. Esses animais foram sacrificados em grupos de 5, nos períodos de 1, 7 e 10 dias após a ligadura. Como controle foram sacrificados 5 ratos não operados. Após sacrifício, a glândula submandibular direita foi excisada e submetida a estudo histológico (HE). Após 1 dia de ligadura ductal, observou-se desorganização do parênquima, dilatação de ductos, vasos sanguíneos congestos, edema e moderado infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico. Aos 7 e 10 dias, verificou-se acentuada redução do número de ácinos, persistência de estruturas ductais e intenso infiltrado inflamatório mononuclear. Aos 10 dias, foram notadas áreas de fibrose intersticial. Portanto, a ligadura do ducto excretor da glândula submandibular de ratos provocou sialadenite com redução expressiva do parênquima glandular.

Palavras-chave: glândula submandibular, atrofia, rato.

Área do Conhecimento: Ciência da Saúde

Introdução

Os processos de atrofia das glândulas salivares podem ocorrer devido à obstrução ductal causada por cálculo salivar, infecção, processos neoplásicos, sialadenites, síndrome de Sjögren e tratamento radioterápico, representando um importante problema clínico (BURGESS; DARDICK, 1998).

A atrofia glandular pode ser obtida experimentalmente através de ligadura de seu ducto excretor (BURFORD et al., 1993; SOUZA et al., 1995; BURGESS et al., 1996; BURGESS; DARDICK, 1998; TAKAHASHI et al., 1998; SCOTT et al., 1999; OKAZAKI et al., 2000; HARRISON et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2000).

A submandibular é a glândula salivar que produz a maior quantidade de saliva (FAUSTINO; STIPP, 2003), sendo que um processo de atrofia nesta glândula, em casos provocados por tratamento radioterápico por exemplo, pode causar xerostomia, ou seja, diminuição ou falta do fluxo salivar. Além disso, a submandibular é a glândula salivar mais acometida por sialolitíase, apresentando conseqüente sialadenite com atrofia de seu parênquima (NEVILLE et al., 2004).

Diante do exposto a proposta do presente trabalho foi estudar histologicamente a atrofia da glândula submandibular após ligadura do ducto excretor em ratos.

Metodologia

Foram utilizados 20 ratos adultos da raça Wistar (*Rattus norvegicus var. albinus*), com 90 dias de idade e peso aproximado de 300g, fornecidos pelo Biotério da Universidade de Taubaté – UNITAU, mantidos e alimentados no laboratório de Farmacologia da Universidade com ração e água *ad libitum*, após aprovação do Comitê de Ética para Experimentação Animal da UNITAU sob o Protocolo nº 0009/07.

Os ratos foram pesados e anestesiados com a mistura de 13mg/Kg de cloridrato de xilasina 2% (Rompun – Bayer do Brasil), substância sedativa analgésica e relaxante muscular, com 33mg/Kg de cloridrato de Ketamina (Dopalen – Vetbrands), anestésico geral, por via intramuscular para a realização de todos os procedimentos cirúrgicos, os quais serão efetuados com materiais estéreis, utilizando-se os devidos recursos anti-sépticos.

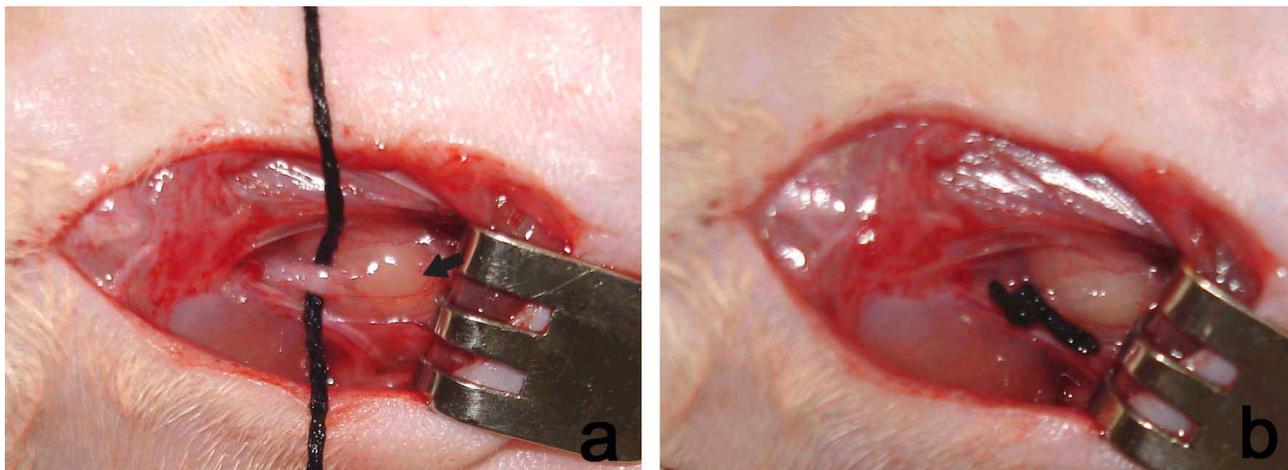


Figura 1 – Procedimentos cirúrgicos: a) glândula submandibular (➤) e fio de algodão passado por trás de seu ducto excretor; b) ligadura ductal após realização do nó com fio de algodão.

Em 15 ratos, foi realizada tricotomia na região ventral do pescoço e incisão sagital mediana de aproximadamente 3cm de comprimento. A glândula submandibular direita foi identificada e seu ducto excretor principal foi dissecado com tesoura de ponta rômbrica e isolado dos vasos sangüíneos que irrigam a glândula. Um fio de algodão (Âncora nº 8.0) foi passado ao redor do ducto e amarrado firmemente, obstruindo-se o ducto e tomando-se o cuidado de não incluir os vasos que nutrem a glândula na ligadura. Os tecidos foram reposicionados e a incisão suturada com fio de seda (Ethicon/ Johnson & Johnson nº 4) (Figura 1).

Os animais foram sacrificados com dose excessiva do anestésico em grupos de 5, nos períodos de 1, 7 e 10 dias após a ligadura ductal. Como controle foram sacrificados 5 ratos não operados. Após o sacrifício, a glândula submandibular direita de cada animal foi excisada.

Todas as peças removidas foram fixadas em solução de formol a 10% e incluídas em blocos de parafina. Foram feitos cortes histológicos com cerca de 5µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro previamente limpas e desengorduradas, para a posterior coloração rotineira pela hematoxilina e eosina (HE).

Os cortes histológicos corados foram analisados qualitativamente através de microscópio de luz.

Resultados

Segue a descrição morfológica das glândulas submandibulares.

No grupo controle, a glândula submandibular apresentou-se como uma glândula tubuloacinososa composta, constituída por diversos lóbulos delimitados por estroma de tecido conjuntivo fibroso. O parênquima glandular exibiu unidades secretoras predominantemente serosas, bem como um sistema de ductos bem desenvolvido. As unidades secretoras foram identificadas como ácinos serosos, mucosos e mistos, sendo também observados os ductos intercalares, granulares e excretores. Os ácinos, assim como os ductos intercalares, granulares e estriados, estavam localizados no interior dos lóbulos. Os ductos excretores, por sua vez, foram encontrados basicamente nos septos conjuntivos interlobulares (Figura 2).

No grupo de 1 dia após ligadura ductal, os ductos e ácinos apresentaram desorganização estrutural. Em algumas regiões glandulares, estando mais afastados uns dos outros, por conta do edema intersticial instalado. Ductos dilatados, principalmente estriados e excretores, foram identificados com acúmulo de secreção em sua luz. No estroma foram observados, além do edema, vasos sanguíneos dilatados e congestionados e moderado infiltrado inflamatório misto, composto predominantemente por polimorfonucleares neutrófilos, porém também por células mononucleares, principalmente macrófagos e linfócitos. Esse infiltrado localizou-se, basicamente, nas regiões periductal e perivascular (Figura 3a, b).

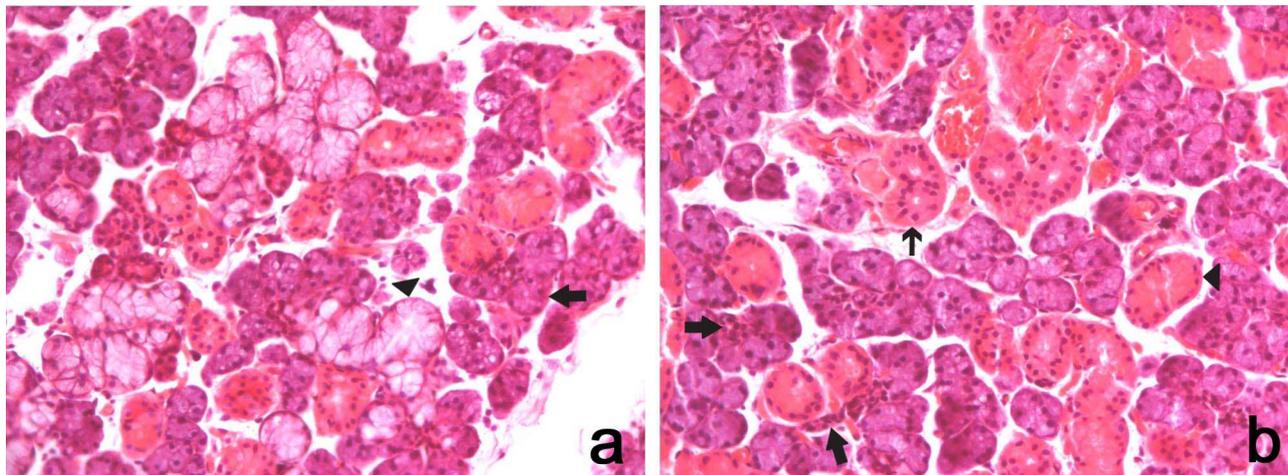


FIGURA 2 – Glândula submandibular controle: a) ácinos serosos (→) e mucosos (▶) HE, aumento original 200X.; b) ductos intercalares (→), granulares (▶) e estriados (→). HE, aumento original 200X.

Após 7 dias de ligadura ductal, verificou-se redução acentuada da quantidade dos ácinos, sendo que os remanescentes estavam atróficos e presentes principalmente na periferia dos lóbulos. Observou-se persistência de ductos, os quais muitos permaneceram dilatados, bem evidentes, por vezes apresentando células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares e menor quantidade de secreção em seu interior. Os ductos apresentaram ainda discreta vacuolização citoplasmática sugestiva de degeneração hidrópica. No estroma foram observados vasos sanguíneos dilatados e congestionados, edema acentuado, bem como intenso infiltrado inflamatório difuso basicamente mononuclear. Discreta fibrose intersticial foi também observada (Figura 3c, d).

Aos 10 dias após ligadura ductal, escassos ácinos remanescentes atróficos foram encontrados na periferia dos lóbulos. Ductos dilatados com acúmulo de secreção e células inflamatórias em sua luz foram também observados. Os ductos apresentaram ainda intensa vacuolização citoplasmática. O estroma revelou vasos sanguíneos dilatados e congestionados, intenso infiltrado inflamatório mononuclear, edema persistente e aumento da fibrose, principalmente, ao redor de ductos e nos septos interlobulares (Figura 3e, f).

Discussão

Embora a glândula submandibular não seja a maior glândula salivar da cavidade bucal ela é a que produz a maior quantidade de saliva (FAUSTINO; STIPP, 2003). Portanto um processo de atrofia nesta glândula pode gerar consequências negativas para o meio bucal.

A atrofia da glândula submandibular em ratos após ligadura ductal têm sido frequentemente observada na literatura, apresentando redução do número de ácinos, presença de estruturas ductais dilatadas e aumento na quantidade de tecido conjuntivo (OKAZAKI et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2000, 2001 e 2004).

Porém, a atrofia da glândula parótida após ligadura do ducto excretor em ratos, vem sendo estudada com maior frequência (BURFORD et al., 1993; SOUZA et al., 1995; BURGESS et al., 1996; BURGESS; DARDICK, 1998; SCOTT et al., 1999; TAKAHASHI et al., 1999; SIQUEIRA et al., 2002). Harrison et al., 2000 estudaram também a atrofia de glândulas parótidas, porém utilizando gatos para o procedimento.

Alguns trabalhos na literatura revista optaram pela ligadura de glândula sublingual e observaram a atividade apoptótica das células acinares (TAKAHASHI et al., 2002, e 2003).

Os diversos estudos que abordam a atrofia e regeneração de glândulas salivares após ligadura ductal apresentam muitas semelhanças, tanto na metodologia utilizada quanto nos seus resultados. Porém algumas diferenças merecem consideração.

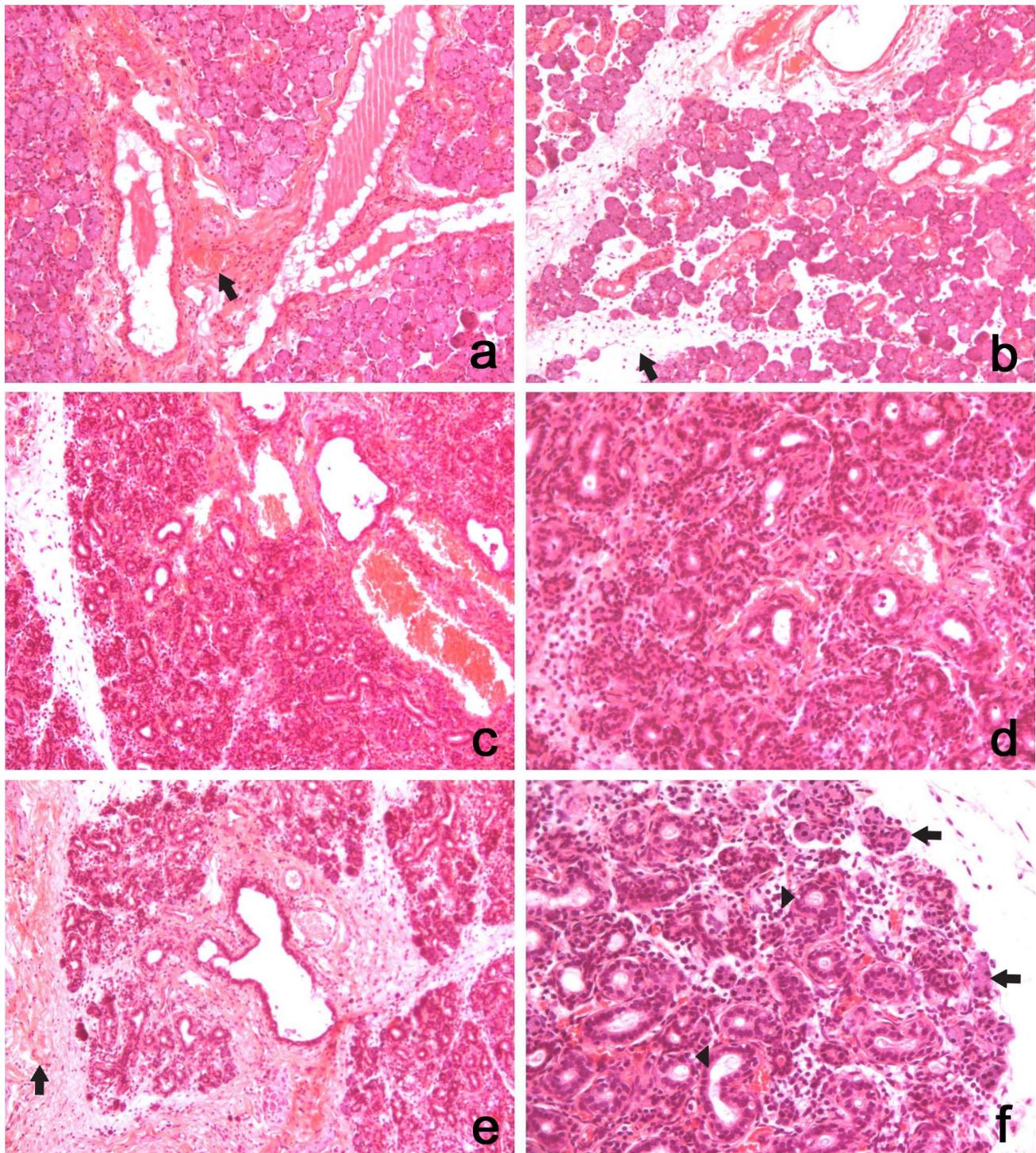


Figura 3 – Atrofia glandular: a) um dia: ductos dilatados com acúmulo de secreção e vasos sanguíneos congestionados (➔). HE, aumento original 100X; b) um dia: desorganização do parênquima, edema intersticial (➔) e infiltrado inflamatório misto. HE, aumento original 100X; c) sete dias: desaparecimento de ácinos e presença de vasos sanguíneos dilatados e congestionados. HE, aumento original 100X; d) sete dias: ductos remanescentes e infiltrado inflamatório mononuclear. HE, aumento original 200X; e) dez dias: ductos dilatados e intensa fibrose intersticial (➔). HE, aumento original 100X; f) dez dias: ácinos remanescentes na periferia do lóbulo (➔), vacuolizações em ductos (➤) e infiltrado inflamatório mononuclear. HE, aumento original 200X.

Em muitos trabalhos, realizou-se a ligadura do ducto excretor de glândulas parótidas utilizando fio de seda nº 3.0 ou 4.0, quando se queria apenas estudar atrofia glandular, sendo que esse fio não era removido posteriormente, visto que não se buscava a regeneração glandular (BURFORD et al., 1993; BURGESS et al., 1996; BURGESS; DARDICK, 1998; HARRISON et al., 2000). O fio de algodão também já foi utilizado para a ligadura ductal em trabalhos que estudavam a atrofia de glândulas submandibulares (SOUZA et al., 1999). A ligadura com fio de algodão é de difícil remoção, não servindo, portanto, para os estudos de regeneração glandular. Certamente por esse motivo, outros meios são utilizados quando se pretende, posteriormente, desobstruir o ducto. Takahashi et al. (1998, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003 e 2004) utilizaram um clip para efetuar tal ligadura. Outros trabalhos, no entanto, utilizaram no ducto excretor um pequeno grampo em forma de V, composto por arame de aço inoxidável envolvido por tubo de polietileno de diâmetro estreito, obstruindo-se assim a luz ductal para se obter atrofia glandular (BURGESS; DARDICK, 1998; SCOTT et al., 1999).

A presença de estruturas ductais ou ductiformes durante a atrofia glandular tem sido relatada pela maior parte dos estudos (BURFORD et al., 1993; SOUZA et al., 1995; BURGESS et al., 1996; BURGESS; DARDICK, 1998; TAKAHASHI et al., 1998; SCOTT et al., 1999; TAKAHASHI et al., 1999; SCOTT et al., 1999 OKAZAKI et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2000; SIQUEIRA et al., 2002; TAKAHASHI et al., 2002, 2003 e 2004), sendo a dilatação ductal uma característica mencionada (SOUZA et al., 1995; SCOTT et al., 1999; OKAZAKI et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2001; SIQUEIRA et al., 2002; TAKAHASHI et al., 2002 e 2003). Burford et al. (1993) verificaram persistência da maior parte de sistema de ductos intercalares, estriados e excretores. Burgess e Dardick (1998) identificaram ductos intercalares e estriados residuais. Segundo Souza et al. (1995), a presença de ductos intercalares, estriados e excretores diminui dando espaço ao aparecimento de estruturas ductiformes, sendo que o aumento dessas estruturas deve-se, provavelmente, ao fenômeno de incorporação de células acinares atroficas nos compartimentos ductais e ao processo mitótico de células ductais pré-existentes. Por outro lado, Scott et al. (1999), ao estudarem características morfológicas e funcionais das células acinares durante a atrofia e regeneração glandulares, sugeriram que as estruturas ductiformes são derivadas de ácinos atroficos sobreviventes.

Os trabalhos de atrofia glandular também relatam atrofia (SOUZA et al., 1995; SCOTT et al., 1999; SIQUEIRA et al., 2002) e degeneração dos ácinos (SOUZA et al., 1995; SIQUEIRA et al., 2002), além de perda das células acinares (BURFORD et al., 1993; BURGESS et al., 1996; BURGESS; DARDICK, 1998; TAKAHASHI et al., 1998; SCOTT et al., 1999; TAKAHASHI et al., 1999; HARRISON et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2001; SIQUEIRA et al., 2002; TAKAHASHI et al., 2002, 2003 e 2004), a qual ocorre através de apoptose (SCOTT et al., 1999; HARRISON et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2000 e 2002). Harrison et al. (2000), observaram não só ácinos atroficos, mas também ácinos com dilatação luminal, vacuolização intercelular, desintegração e extravazamento, além de células acinares diminuídas em tamanho e com vacuolização, desintegração, necrose, apoptose e atividade fagocitária.

Há controvérsias na literatura quanto ao desaparecimento ou persistência das células acinares durante a atrofia. Takahashi et al. (1998 e 1999) referem-se ao desaparecimento dessas células após 7 dias de ligadura ductal. Esses trabalhos discordam de outros estudos, como os de Burford et al. (1993), Burgess e Dardick (1998) e Scott et al. (1999), que relatam a persistência das células acinares por maiores períodos. Harrison et al. (2000), estudando atrofia parotídea em gatos, verificaram uma progressiva atrofia acinar basicamente entre 4 e 16 dias após a ligadura do ducto excretor, mas as células acinares persistiram até 365 dias, ocasionalmente, apresentando aparência semelhante às células normais. Nossos resultados também mostraram a persistência das células acinares após os períodos de 1, 7 e 10 dias de ligadura ductal.

Segundo Takahashi et al. (1998), a persistência de células acinares após a obstrução ductal pode ser consequência de uma ligadura ductal incompleta. No entanto, em nosso trabalho, encontramos células acinares remanescentes mesmo tendo utilizado uma ligadura completa do ducto excretor da submandibular.

Durante a atrofia das glândulas salivares, algumas alterações no estroma glandular têm sido relatadas, tais como: edema (TAKAHASHI et al., 2000, 2001, 2002 e 2003), infiltrado de células inflamatórias (SOUZA et al., 1995; TAKAHASHI et al., 1998; SCOTT et al., 1999; HARRISON et al., 2000; OKAZAKI et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2000, 2001, 2003 e 2004) e maior vascularização (SCOTT et al., 1999). De modo geral, verificamos em nosso estudo vasodilatação, congestão, edema, infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, focos de hemorragia e fibrose intersticial nas glândulas atrofiadas.

Conclusão

Diante dos resultados obtidos e com a metodologia empregada podemos concluir que a ligadura do ducto excretor da glândula submandibular de ratos provocou sialadenite com redução expressiva do parênquima glandular.

Referências

- BURFORD-MASON, A.P. et al. Immunohistochemical analysis of the proliferative capacity of duct acinar cells during ligation-induced atrophy and subsequent regeneration of rat parotid gland. **J Oral Pathol**, v.22, n.10, p.440-6, Nov. 1993.
- BURGESS, K. L.; DARDICK, I. Cell population changes during atrophy and regeneration of rat parotid gland. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v.85, n.6, p.699-706, June 1998.
- BURGESS, K. L. et al. Myoepithelial cells actively proliferate during atrophy of rat parotid gland. **Oral Surg. Oral Méd. Oral Pathol.**, v.82, n.6, p.674-80, Dec. 1996.
- FAUSTINO, S.E.S.; STIPP, A.C.M. Efeitos do alcoolismo crônico e da desintoxicação alcoólica sobre a glândula submandibular de ratos. Estudo morfométrico. **J. Appl. Oral Sci.**, v.11, n.1, p. 21-26, Jan/Mar. 2003.
- HARRISON, J.D.; FOUAD, H.M.A.; GARRETT, J.R. The effects of ductal obstruction on the acinar cells of the parotid of cat. **Arch. Oral Biol.**, v.45, n.11, p.945-9, Nov. 2000.
- NEVILLE, B.W. et al. Patologia das glândulas salivares. In_. **Patologia oral & bucomaxilofacial**. 1ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap.11, p.373-417.
- OKAZAKI, Y. et al. Acceleration of rat salivary gland tissue repair by basic fibroblast growth factor. **Arch. Oral Biol.**, v.45, n.10, p.911-9, Oct. 2000.
- SCOTT, J.; LIU, P.; SMITH, P.M. Morphological and functional characteristics of acinar atrophy and recovery in the duct-ligated parotid gland of the rat. **J. Dent. Res.**, v.78, n.11, p.1711-9, Nov. 1999.
- SIQUEIRA, T.V. et al. Atrofia e regeneração da glândula parótida após ligadura do ducto excretor: estudo histológico e histoquímico em ratos. **Pós-Grad. Rev. Fac. Odontol. São José dos Campos**, v.5, n.1, p.27-34, jan./abr. 2002.
- SOUZA, L.B. et al. Estudo esterológico da atrofia da glândula parótida do rato após ligadura do ducto excretor principal. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v.9, n.1, p.1-9, jan./mar. 1995.
- SOUZA, A.P. et al. Análise bioquímica das metaloproteases da matriz extracelular durante atrofia experimental das glândulas salivares submandibulares de ratos. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v.13, n.2, p.135-9, abr./jun. 1999.
- TAKAHASHI, S.; SCHOCH, E.; WALKER, N.I. Origin of acinar cell regeneration after atrophy of the rat parotid induced by duct obstruction. **Int. J. Exp. Pathol.**, v.79, n.5, p.293-301, Oct. 1998.
- TAKAHASHI, S. et al. Changing myoepithelial cell distribution during regeneration of rat parotid glands. **J. Exp. Path.**, v.80, n.5, p.283-290, Oct. 1999.
- TAKAHASHI, S. et al. Apoptosis and mitosis of parenchymal cells in the duct-ligated rat submandibular gland. **Tissue & Cell**, v.32, n.6, p.457-63, Dec. 2000.
- TAKAHASHI, S. et al. Apoptosis and proliferation of myoepithelial cells in atrophic rat submandibular glands. **J. Histochem. Cytochem.**, v.49, n.12, p.1557-63, Dec. 2001.
- TAKAHASHI, S. et al. The roles of apoptosis and mitosis in atrophy of the rat sublingual gland. **Tissue & Cell**, v.34, n.5, p.297-304, Oct. 2002.
- TAKAHASHI, S. et al. Proliferation and distribution of myoepithelial cells during atrophy of the rat sublingual gland. **J. Oral Pathol. Med.**, v.32, n.2, p.90-4, Feb. 2003.
- TAKAHASHI, S. et al. Cell death and cell proliferation in the regeneration of atrophied rat submandibular glands after duct ligation. **J. Oral Pathol. Med.**, v.33, n.1, p.23-9, Jan. 2004.