

ESTUDO ESTEREOLÓGICO DO CRESCIMENTO DE GLÂNDULAS SUBMANDIBULARES DE RATOS INDUZIDO PELO ISOPROTERENOL. I. MODIFICAÇÕES NO COMPARTIMENTO ACINAR.

STEREOLOGICAL STUDY OF THE RAT SUBMANDIBULAR
GLANDS GROWTH INDUCED BY ISOPROTERENOL. I. CHANGES IN
THE ACINAR COMPARTMENT.

Luana Campos ANDRADE*

Mirian Aparecida ONOFRE**

Rumio TAGA***

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi de verificar, através de quantificações estereológicas ao microscópio óptico, a participação dos processos hiperplásico e hipertrófico no crescimento do compartimento dos ácinos de glândulas submandibulares de ratos machos, induzido por injeções diárias de cloridrato de isoproterenol por 14 dias. A análise dos resultados obtidos mostrou que: a) a massa glandular aumentou 135,8% entre 0 a 14 dias, sendo que entre 0 a 3 dias foi observada a maior velocidade de crescimento; b) a densidade de volume, ou seja, o percentual de volume glandular ocupada pelos ácinos aumentou nos períodos de 0 a 3 e 5 a 7 dias, respectivamente, de 1,33 e 1,10 vezes; c) o volume absoluto desse compartimento passou de 131,9 mm³ aos 0 dias para 522,5 mm³ aos 14 dias de tratamento, o que representou um aumento de 296,1%; d) o volume celular médio exibiu um soberbo crescimento de 585,4% após 14 dias de tratamento, sendo que entre 0 a 3 e 5 a 7 dias, os aumentos foram, respectivamente, 286,3% e 45%; e) o número absoluto de células acinosas não exibiu aumento estatisticamente significativo durante todo o período analisado. Esses resultados ora apresentados, mostraram que o crescimento do volume total do compartimento acinar de glândulas submandibulares de ratos induzidos pelo isoproterenol, ocorre essencialmente por um mecanismo hipertrófico.

UNITERMOS

Glândula submandibular; Células acinosas; Isoproterenol.

* Bolsista da FAPESP Proc. 91/4457-4

** Profa. Doutora do Depto de Diagnóstico e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP

*** Prof. Adjunto do Laboratório de Histologia, Depto de Morfologia, Faculdade de Odontologia de Bauru, USP; Pesquisador do CNPq

INTRODUÇÃO

A aplicação em roedores de doses diárias de isoproterenol por duas semanas, provoca um soberbo crescimento nas massas frescas de suas glândulas salivares maiores^{3,5,8,9,10,11,14,19,23}.

Apesar de ainda existirem dúvidas sobre os mecanismos que levam a esse significativo aumento de massa glandular, hoje é aceito que nos primeiros 5 dias de tratamento o crescimento é hiperplásico, e que nos dias subsequentes, a atividade proliferativa cae e sobressai o crescimento hipertrófico^{3,4,5,7,13}.

Em grande parte desses trabalhos que estudaram esse crescimento glandular induzido, a hiperplasia é avaliada por marcação radioautográfica do contingente de células presente na fase S do ciclo celular, utilizando-se de timidina- H^3 como substância marcadora. Assim, um aumento no percentual de células marcadas, indicaria a ocorrência de elevação na taxa proliferativa. Por outro lado, a hipertrofia é avaliada pela análise subjetiva de imagens de células acinosas ao microscópio.

Como em glândulas salivares maiores induzidas ao crescimento pelo isoproterenol ocorre alta taxa de poliploidia^{18,21}, a utilização de marcação radioautográfica por timidina H^3 não indicaria com exatidão a hiperplasia.

Um caminho isento de maiores críticas para avaliar-se tanto o processo hiperplásico como o hipertrófico, é estudar através de métodos estereológicos de contagens e de medidas diretas ao microscópio óptico, do número e volume celular absoluto das células acinosas durante todo período de tratamento.

Deste modo, no presente trabalho procuramos avaliar através desses métodos, a participação da hiperplasia e da hipertrofia de células acinosas no crescimento final de glândulas submandibulares de ratos submetidos a tratamento diário com isoproterenol. Além disso, caracterizamos o crescimento do compartimento acinar em relação a evolução da sua densidade de volume, do seu volume absoluto, da sua relação superfície-volume e da sua superfície externa total.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenvolvimento do Experimento

Foram utilizados 20 ratos albinos da linhagem *Wistar*, machos, com massa corporal de 200 a 240 g, procedentes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP.

Os animais foram separados em cinco lotes de 4 ratos, conforme o período de tratamento.

O 1^o lote foi considerado controle e recebeu 1 ml de solução fisiológica (solução de cloreto de sódio a 0,9%) em dose única por via intraperitoneal. Os demais grupos receberam cloridrato de isoproterenol (IPR) do laboratório Wintrop diluído em água bi-distilada, na concentração de 10 mg/ml e administrado na dose de 4 mg/100g de massa corporal. Esta administração foi realizada diariamente, obedecendo os períodos de 3, 5, 7 e 14 dias.

Procedimentos Histológicos

Os animais 30 horas após a última dose em cada grupo, foram submetidos à anestesia por inalação de éter etílico. A massa corporal dos animais foi avaliada em uma balança Mettler P1000. As glândulas submandibulares foram cuidadosamente dissecadas e removidas, a seguir as suas massas foram avaliadas em uma balança de precisão Mettler H-20. Todas as coletas foram realizadas entre 10:00 a 12:00 horas da manhã. Após fixação em líquido de Helly por 3 horas à temperatura ambiente, as glândulas sofreram tratamento estandardizado de desidratação diafanização e inclusão em parafina. Cortes semi-seriados com 5 μ m foram obtidos e submetidos a coloração pela técnica do tricrômico de Masson.

Obtenção do Volume Processado das Glândulas

O volume processado das glândulas de cada animal foi estimado através da seguinte relação: $V_p = m/d$. fator de retração, onde V_p = volume processado em cm^3 , m = massa glandular em g e d = densidade em g/cm^3 . Nesses cálculos utilizamos $d = 1,089 g/cm^3$ e fator de retração = 0,86, valores estes obtidos em glândulas submandibulares de ratos adultos por Pardini, Achôa e Taga¹⁶.

Avaliação estereológica da densidade de volume (V_{vac}), volume total (V_{tac}), densidade de superfície (S_{vac}), superfície externa total (S_{tac}), relação superfície-volume (s/vac) e número total de células (Nac) dos ácinos e da densidade de volume do núcleo da célula acinosa (ρNac).

A partir das glândulas de cada animal, foram obtidas 10 lâminas contendo 10 cortes histológicos

semi-seriados em cada uma. Através de sorteio, foram escolhidos 5 lâminas para as quantificações, sendo que, de cada lâmina selecionamos por critério de qualidade 1 corte histológico.

Em 50 campos histológicos por animal escolhidos por esquema de amostragem sistemática^{15,24}, realizamos com uma ocular Kpl 8x Zeiss contendo no seu plano focal um graticulo de integração II Zeiss constituído de 10 linhas paralelas e 100 pontos simetricamente distribuídos, e objetiva de imersão 100x, a contagem de: a) número de pontos sobre os ácidos (Pac), anotando-se os que caíram sobre o núcleo (PNac) e o citoplasma (Pcitac), e o número total de pontos sobre a glândula (Pt), b) o número de intersecções das linhas do sistema-teste com os contornos dos ácidos (Iac) e com os contornos dos núcleos de células acinosas (c); e c) o número de imagens de transecções nucleares e de núcleos inteiros de células acinosas (n).

Conhecendo-se área total examinada (A), a distância entre as linhas do sistema-teste (d); o comprimento total das linhas do sistema-teste (L), a espessura do corte (e) é o volume glandular processado (Vp), calculamos segundo indicações de Weibel²⁴ e Aherne & Dunnill¹, os seguintes parâmetros morfométricos:

(a) densidade de volume do ácido:
 $V_{vac} = Pac/Pt$ (%);

(b) volume total dos ácidos:
 $V_{tac} = V_{vac} \cdot Vp$ (mm³);

(c) densidade de volume do núcleo da célula acinosa:
 $\rho_{Nac} = PNac/Pac$ (µm⁰)

(d) densidade de superfície dos ácidos:
 $S_{vac} = 2Iac/L$ (cm²/cm³);

(e) superfície total dos ácidos:
 $Stac = S_{vac} \cdot Vp$ (cm²);

(f) relação superfície-volume dos ácidos:
 $s/vac = S_{vac}/V_{vac}$ (cm²/cm³)

(g) número total de células acinosas:
 $Nac = 2n \cdot Vp/A(c/n.d+2e)$ (por glândula).

Avaliação do Volume Nuclear, Citoplasmático e Celular de Células Acinosas

O volume nuclear para cada animal foi obtido à partir de medidas ortogonais de 50 núcleos de células acinosas, realizadas em um microscópio Leitz com objetiva de imersão 100X e uma ocular micrométrica Olympus de filamento deslocável 10X. Para cada núcleo medido, calculamos o seu diâmetro geométrico médio (D): $D = \sqrt{D1 \cdot D2}$. A média aritmética dos 50 valores de D, foi utilizada para correção da sobreestimativa da densidade de volume do núcleo da célula acinosa (ρ_{Nac}) e para o cálculo do volume nuclear através da fórmula geométrica do volume da esfera ($V_{Nac} = 4/3 \pi R^3$).

A sobreestimativa da densidade de volume do núcleo da célula acinosa provocada pela espessura do corte (efeito Holmes) foi corrigida pela relação:

$$Nac \text{ corrigida} = \frac{\rho_{Nac}}{1 + 3e} \cdot (Weibel^{24})$$
$$2D$$

Conhecendo-se o volume nuclear (V_{Nac}) e a densidade de volume corrigida do núcleo ($\rho_{Nac \text{ corr.}}$), calculamos o volume citoplasmático (V_{citac}) pela relação:

$$V_{citac} = \frac{(1 - \rho_{Nac \text{ corr.}}) \cdot (V_{Nac})}{\rho_{Nac \text{ corr.}}}$$

Análise Estatística

Todos os dados morfométricos para cada grupo foram confrontados com os dos demais grupos através da análise de variância, segundo indicações de Lison¹².

No caso da densidade de volume, os testes estatísticos foram realizados sempre após transformação arco-seno dos dados originais.

Na apresentação dos resultados colocaremos após a média, o seu erro-padrão (EPM), que é igual ao quociente entre o desvio-padrão (S) e a raiz quadrada do número de observações (N): $EPM = S/\sqrt{N}$

Tabela 1 - Média e erro padrão da média das diferentes dimensões morfométricas ds glândulas submandibulares de ratos tratados com isoproterenol.

Dimensão Morfométrica		Período de Tratamento em dias				
		0	3	5	7	14
massa corporal	g	223,3±7,84**	205,0±9,67	209,4±2,38	217,9±7,25	218,4±11,96
massa glandular	mg	348,3±15,46	603,0±25,04	651,0±56,31	760,8±96,22	906,3±187,90
densidade de volume dos ácinos	%	1,8046,4±	61,7±2,36	64,8±1,65	71,2±1,21	73,7±2,13
volume total dos ácinos	mm ³	131,9±4,37	293,2±11,36	334,7±35,85	428,3±47,74	522,5±109,15
densidade de superfície dos ácinos	cm ² /cm ³	749,8±31,30	838,0±30,86	840,5±19,15	790,6±20,54	835,0±34,84
superfície total dos ácinos	cm ²	226,8±17,55	398,2±15,52	422,6±25,00	472,2±51,97	592,9±117,39
relação superfície volume dos ácinos	cm ² /cm ³	16,2±0,58	13,6±0,20	13,0±0,47	11,1±0,40	11,4±0,80
nº absoluto de céls acinosas x 10 ⁶	gland	156,3±4,49	158,4±12,34	163,7±21,73	176,2±33,57	217,7±61,14
volume nuclear das céls acinosas	µm ³	55,8±3,10	85,9±2,16	97,7±7,70	135,7±8,94	127,5±16,16
volume celular das céls acinosas	µm ³	605,2±79,18	2338,2±67,14	2540,2±219,57	3686,6±273,28	4146,5±268,49

*Média de 4 animais por grupo
 ** Erro padrão da média

RESULTADOS

A média e o respectivo erro padrão da média dos diferentes parâmetros morfométricos quantificados em cada período de tratamento analisado, estão apresentados na Tabela 1.

A análise dos dados apresentados na Tabela mostrou que:

- ◆ a massa glandular aumentou de 135,8% entre 0 a 14 dias de tratamento (P<0,01), sendo que foi entre 0 a 3 dias de tratamento, que se observou a maior velocidade de crescimento;
- ◆ a densidade de volume ou a fração de volume glandular ocupada pelos ácinos aumentou nos períodos de 0 a 3 e 5 a 7 dias de tratamento, respectivamente, 1,33x (P<0,01) e 1,10x (P<0,05); nos períodos de 3 a 5 e 7 a 14 dias não se observou aumento estatisticamente significativo (P>0,05);
- ◆ o volume total dos ácinos cresceu 296,1% (P<0,05) durante todo período experimental, sendo que foi entre 0 a 3 dias que ocorreu o maior crescimento, com um aumento percentual de 122,3% (P<0,01);

- ◆ a superfície externa total dos ácinos mostrou um aumento de 161,4% (P<0,05) entre 0 a 14 dias de tratamento com o isoproterenol;

- ◆ a relação superfície-volume dos ácinos exibiu diminuição estatisticamente significativa entre 0 a 3 e 5 a 7 dias de tratamento, respectivamente, de 19,2% (P<0,01) e 16,9% (P<0,05);

- ◆ o número absoluto de células acinosas, aumentou muito pouco durante o tratamento; a análise de variância mostrou que este aumento não foi estatisticamente significativa (P>0,05), mesmo após transformação logarítmica dos dados originais;

- ◆ o volume médio dos núcleos de células acinosas aumentou nos períodos de 0 a 3 e 5 a 7 dias, respectivamente, 15,4% (P<0,01) e 11,2% (P<0,05); nos demais períodos o volume nuclear manteve-se estável (P>0,05);

- ◆ o volume celular médio mostrou um soberbo crescimento de 585,2% (P<0,01) após os 14 dias de tratamento, sendo que entre 0 a 3 e 5 a 7 dias os aumentos foram, respectivamente, de 286,3% (P<0,01) e 45,0% (P<0,05).

DISCUSSÃO

A administração diária de 4 mg/100g de massa corporal de cloridrato de isoproterenol em ratos durante 14 dias, provocou um aumento significativo de 135,8% na massa fresca de suas glândulas submandibulares, o que está de acordo com as informações já apresentadas na literatura^{2,6,8,17,19,25}. No entanto, o aumento de massa glandular obtido no presente trabalho, foi inferior aos descritos em várias publicações citadas; este aumento maior ou menor de massa sob estímulo da droga, provavelmente estaria na dependência da dose diária aplicada²⁰, do intervalo de tempo analisado^{17,25} e mesmo da qualidade do sal utilizado.

O crescimento de massa glandular está diretamente relacionado às modificações no compartimento dos ácinos, que com o tratamento aumentou substancialmente a sua participação no volume glandular. Assim, a sua densidade de volume ou fração de volume glandular que era de 46,4% no início, passou para 73,7% no final do tratamento. Esses dados relativos sugerem que os demais compartimentos glandulares cresceram menos do que os ácinos sob estímulo do isoproterenol.

Em termos de volume absoluto do compartimento acinar, este cresceu 296,1% com o tratamento, passando de 131,9 mm³ aos 0 dias para 522,5 mm³ aos 14 dias, o que representou um acréscimo diário médio no período de 27,9 mm³/dia. No entanto, foi entre 0 a 3 dias de tratamento, que ocorreu a maior velocidade de aquisição de volume pelo compartimento acinar, com um aumento percentual de 122,3% e um acréscimo diário de 53,8 mm³/dia.

A relação superfície-volume dos ácinos decresceu 31,5% nos primeiros 7 dias de tratamento. Como os ácinos não mudaram o seu formato esférico durante todo período analisado, essa queda na relação superfície-volume, mostrou que os ácinos individualmente aumentaram o seu tamanho, o que pode ser comprovado pela simples inspeção dos cortes histológicos ao microscópio. Com o aumento no tamanho dos ácinos, a sua superfície externa total também aumentou significativamente 161,4% durante todo período de tratamento.

Como já foi salientado na introdução, o objetivo maior dessa pesquisa era avaliar através de métodos morfométricos de contagem do número absoluto de células e de medidas de volume celular, a participação

da hiperplasia e da hipertrofia de células acinosas no crescimento final de glândulas submandibulares de ratos induzido pelo isoproterenol.

A análise da evolução do número absoluto de células acinosas avaliado pelo método morfométrico II de Aherne, mostrou que não houve aumento estatisticamente significativo em todo período analisado. Assim, como explicar a presença de significativa população de células em mitose, principalmente nos períodos iniciais do tratamento?

Convém lembrar, que o tratamento com o isoproterenol provoca o aparecimento nas glândulas salivares de um contingente significativo de células acinosas poliploides^{18,21}, e como uma boa parte das mitoses observadas eram do tipo atípicas ou incompletas ou multipolares, acreditamos que um grande percentual das mitoses observadas, direcionariam-se à poliploidia. As mitoses bipolares também observadas, destinariam-se à renovação celular que ocorre mesmo na glândula salivar normal²² e que nas condições do enorme crescimento induzido pelo isoproterenol, provavelmente estaria significativamente aumentada.

Como não ocorreu aumento no número absoluto de células acinosas, o crescimento de volume total do compartimento acinar, só poderia dar-se por hipertrofia dessas mesmas células. A análise da evolução do volume médio da célula acinosa, mostrou um aumento de 585,2% após 14 dias de tratamento, passando de 605,2 µm³ no início para 4.146,6 µm³ no final do período, correspondendo a um acúmulo diário de 252,9 µm³/dia. Deste modo, esse soberbo crescimento de volume celular foi suficiente, com sobras para explicar o aumento observado de volume total do compartimento acinar ou mesmo o aumento de massa ou volume glandular.

ABSTRACT

In order to evaluate the role of hyperplasia and hypertrophy of the acini of the rat submandibular glands after daily injections of isoproterenol for 14 days, stereological methods applied to light microscopy were used. The analysis of the data showed that: a) the glandular mass increased 135.8% after 14 days of treatment, the greatest velocity of growth occurred in the first 3 days; b) the volume density of the acinar compartment increased 1.33 and 1.10 times, respectively, for the 0-3 and 5-7 days periods; c) the absolute volume of this glandular compartment increased substantially during whole treatment, with an increment of 296.1%; d) the mean cellular volume

exhibited an exuberant growth of 588.4% in the period of treatment; and e) the absolute number of acinar cells did not show statistically significant increase during whole experimental period. Our data showed that the growth of the acinar cells compartment stimulated by isoproterenol, was essentially caused by hypertrophy of the cells.

UNITERMS

Submandibular gland; Acinar cell; Isoproterenol.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos à FAPESP pela bolsa de iniciação científica concedida e a Sr^a. Beonildes Teresinha Ruiz Correia pelos serviços de digitação do texto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHERNE, W.A.; DUNNIL, M.S. *Morphometry*. London, Edward Arnold, 1982.
2. ANSEL, D.G. Rat salivary glands after long-term isoproterenol administration. *Arch. Otolaryngol.* v. 100, n. 4, p. 256-61, Oct. 1974.
3. BARKA, T. Induced cell proliferation: the effect of isoproterenol. *Exp. Cell Res.*, v. 37, p. 662-79, 1965.
4. BARKA, T. Stimulation of protein and ribonucleic acid synthesis in rat submaxillary gland by isoproterenol. *Lab. Invest.* v. 18, n. 1, p. 38-41, 1968.
5. BROWN-GRANT, K. Enlargement of salivary gland in mice treated with isopropylnoradrenaline. *Nature*, v. 191, n. 19, p. 1076-8, Sept. 1961.
6. CATALDO, E.; SHKLAR, G.; REID, D.P. Submaxillary salivary glands treated with isoproterenol. *Arch. Pathol.*, v. 80, p. 3-8, July 1965.
7. CATANZARO-GUIMARÃES, S.A. Glândulas salivares estimuladas pelo isoproterenol: um modelo de proliferação celular. *Cienc. Cult.*, v. 26, n. 8, p. 729-44, ago. 1974.
8. GOLDRAIJ, A.; RINS DE DAVID, M.L. Effects of isoproterenol on the submaxillary gland of castrated male rats. *Arch. Int. Physiol. Biochem.*, v. 90, n.2, p. 123-7, 1982.
9. HAND, A.R.; HO, B. Mitosis and hypertrophy of intercalated duct cells and endothelial cells in the isoproterenol-treated rat parotid gland. *J. dent. Res.*, v. 64, n.8, p. 1031-8, Aug. 1985.
10. HORIUCHI, T. An ultrastructural study of rat submandibular gland induced by long-term repeated administration of isoproterenol. Morphological changes in acinar cell after the administration. *J. Tokyo Dent. Coll. Soc.*, v. 84, n.10, p. 1663-94, Oct. 1984.
11. INOUE, T.; YAMANE, H.; YAMAMURA, T.; SHIMONO, M. Morphological changes of intercellular junctions in the rat submandibular gland treated by long-term repeated administration of isoproterenol. *J. dent. Res.*, v. 66, n.8, p. 1303-9, Aug. 1987.
12. LISON, L. *Statistique appliquée a la biologie experimentale*. Paris, Gouthiers-Villars, 1958.
13. MATSUURA, S.; HAND, A.R. Quantitative immuno cytochemistry of rat submandibular secretory proteins during chronic isoproterenol administration and recovery. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 39, n.7, p. 945-54, July. 1991.
14. MEDNIEKS, M.J.; HAND, A.R. Microheterogeneity of rat parotid gland proteins after chronic treatment with isoproterenol. *J. dent. Res.*, v. 63, n.2, p. 87-93, Feb. 1984.
15. PARDINI, L.C. "Estudo morfométrico da glândula submandibular do camundongo. Comparação entre sexos". Bauru, 1985 - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; Dissertação (Mestrado) -
16. PARDINI, L.C.; ACHÔA, A.S.; TAGA, R. Morphometric evaluation of the total length of the striated ducts in the rat submandibular glands. *Rev. bras. Cienc. morfol.*, v. 10, n. 2, p. 93-7, 1993.
17. POHTO, P. Catecholamine-induced salivary gland enlargement in rats. *Acta odont. Scand.*, v. 24, p. 1-73, 1966. Supplement 45.
18. RADLEY, J.M. Changes in ploidy in the rat submaxillary gland induced by isoprenaline. *Exp. Cell Res.*, v.48, p. 679-81, 1967.
19. SCHNEYER, C.A. Salivary gland changes after isoproterenol-induced enlargement. *Amer. J. Physiol.*, v. 203, p. 232-6, 1962.
20. SCHNEYER, C.A. Beta-adrenergic effects by autonomic agents on mitoses and hypertrophy in rat parotid. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, v. 131, p, 71-5, 1969.
21. SCHNEYER, C.A.; FINLEY, W.H.; FINLEY, S.C. Increased chromosome number of rat parotid cells after isoproterenol. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, v. 125, p. 722-8, 1967.
22. SCHWARTZS-ARAD, D.; ARBER, L.; ARBER, N.; ZAJICEK, G.; MICHAELI, Y. The parotid gland - a renewing cell population. *J. Anat.*, v. 161, p. 143-51, Dec. 1988.
23. WAKADE, A.R. Parallel changes in the size and nor epinephrine content of the rat salivary glands after teeth amputations, papain or isoproterenol treatment, or duct ligation. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, v. 209, n.2, p. 249-55, 1979.
24. WEIBEL, E.R. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int. Rev. Cytol.*, v. 26, p. 235-302, 1969.
25. WELLS, H. Submandibular salivary glands weight increase by administration of isoproterenol to rats. *Amer. J. Physiol.*, v. 202, n. 3, p. 425-8, Mar.1962.

Endereço para correspondência

Dr. Rumio Taga, Dep. Morfologia, FOB-USP.

Bauru, CEP 17043-101 - CP 73, SP, Brasil