

CRESCIMENTO DE GLÂNDULAS PARÓTIDAS DE RATOS ESTIMULADO POR TRATAMENTO CRÔNICO COM ISOPROTERENOL. ESTUDO DAS MODIFICAÇÕES MORFOLÓGICAS QUANTITATIVAS NOS DUCTOS ESTRIADOS*

GROWTH OF RAT PAROTID GLANDS INDUCED BY CHRONIC ISOPROTERENOL ADMINISTRATION. A QUANTITATIVE MORPHOLOGICAL STUDY OF THE MODIFICATIONS IN THE STRIATED DUCTS

Mirian Aparecida ONOFRE

Profª. Dra. do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

Rumio TAGA

Prof. Associado do Laboratório de Histologia, Departamento de Morfologia, Faculdade de Odontologia de Bauru - USP; Pesquisador do CNPq.

As modificações que sofrem os ductos estriados durante o enorme crescimento das glândulas parótidas do rato induzido por tratamento diário com cloridrato de isoproterenol por 14 dias, foram estudadas pela estereologia. Avaliamos em glândulas provenientes de ratos tratados durante 0, 3, 5, 7 e 14 dias, a densidade de volume, volume total, diâmetro externo, comprimento total, volume celular e número absoluto de células dos ductos estriados. A análise dos resultados obtidos mostrou que após 3 dias de estímulo com a droga, os ductos estriados haviam modificado a altura das células, o diâmetro externo e o comprimento total; voltando aos valores do grupo controle no 14º dia do experimento.

*Parte da tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, para obtenção do grau de Doutor - área de Patologia Bucal.

Unitermos: Ducto estriado; Glândula parótida; Isoproterenol.

INTRODUÇÃO

A administração diária de isoproterenol, um agonista β -simpatomimético sintético, durante duas semanas, provoca um significativo aumento na massa ou volume à fresco das glândulas salivares maiores de roedores^{2,4,6,17,20,23,24,29}. O percentual de aumento é maior nas glândulas parótidas do que nas submandibulares^{6,23}, sendo que as sublinguais não apresentam aumento significativo^{6,20}, e depende da dose administrada e da duração do tratamento.

Análises subjetivas aos microscópios óptico e eletrônico^{2,3,6,9,11,12,15,16,22,25,26,27} e histométricas ao microscópio óptico^{17,27} mostraram que este crescimento deve-se principalmente ao aumento no compartimento dos ácinos.

Quanto às modificações que ocorrem no sistema de ductos intra-lobulares durante esse crescimento induzido, poucas são as informações disponíveis na literatura. Assim, sabe-se que na glândula parótida, os ductos estriados apresentam-se com lume dilatado e as células comprimidas na base do ducto e que na glândula submandibular, os ductos granulosos são menos evidentes, perdem os seus grânulos e mostram-se atrofiados^{1,6,9,27}.

Na presente pesquisa determinou-se nos vários grupos experimentais submetidos a tratamento diário com o isoproterenol, os vários parâmetros morfométricos do sistema de ductos estriados. Com isso, procurou-se verificar a ocorrência de modificações nesses ductos durante o enorme crescimento glandular induzido.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedimentos experimentais

No presente experimento, foram utilizados 15 ratos adultos (linhagem *Wistar*) com 200 a 240 g de massa corporal obtidos no Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP. Esses animais foram divididos em 5 grupos de 3 ratos e mantidos em gaiolas separadas com alimentação constituída de ração comercial peletada e água fornecida à vontade.

O primeiro grupo recebeu 1 ml de solução de cloreto de sódio 0,9%, em dose única, por via intraperitoneal e os demais grupos receberam injeções diárias de cloridrato de isoproterenol do Laboratório Wintrop (10 mg/ml) na dose de 4 mg/100g de massa corporal, durante 3, 5, 7 e 14 dias.

Procedimentos histológicos

Após 30 horas da última dose da droga, os animais foram anestesiados por inalação de éter etílico e as suas massas corporais avaliadas em uma balança Mettler P.1000. À seguir, as glândulas parótidas foram cuidadosamente dissecadas e removidas; e as suas massas foram determinadas em uma balança de precisão Mettler H-20.

As glândulas receberam o seguinte processamento padronizado: a) fixação em líquido de Helly por 3 horas; b) lavagem em água corrente por 20 horas; c) 30 minutos em etanol 70%; d) 30 minutos em etanol 95%; e) dois banhos de 30 minutos cada um, em etanol 100%; f) dois banhos em xilol até a completa diafanização; g) dois banhos de 30 minutos cada um em parafina fundida à 58°C; h) inclusão em parafina fundida nova; i) microtomia semi-seriada com obtenção de cortes com 5 μ m; j) coloração pela hematoxilina-cosina.

Estimativa do volume processado das glândulas

O volume processado (V_p) das glândulas foi estimado através da sua massa fresca (m), da sua densidade (d) e do fator de retração (fr) provocado pelo processamento histológico, pela relação: $V_p = m/d \cdot fr$ (PARDINI, ACHÓA e TAGA¹⁸).

A densidade (d) utilizada foi de 1,089g/cm³, valor este obtido por PARDINI, ACHÓA e TAGA¹⁸ em glândulas submandibulares de ratos adultos. O fator de retração (fr) utilizado foi de 0,7, valor este obtido por TAGA em parótida de hamster (citado em DE LUCA¹⁶).

Avaliação da densidade de volume (V_{DDE}), volume total (V_{TDE}), densidade de superfície (S_{DDE}), superfície externa total (S_{TDE}) e número absoluto de células (N_{DE}) dos ductos estriados.

Em 50 campos histológicos selecionados por sistema de amostragem sistemática (WEIBEL,²⁸) realizamos em um microscópio Leitz com objetiva de imersão 100x e ocular Zeiss kpl 8x contendo no seu plano focal, um graticulo de integração II Zeiss com 10 linhas paralelas e 100 pontos, a contagem de: a) pontos sobre os ductos estriados (P_{DE}), anotando-se separadamente aqueles que caíram sobre os núcleos (P_{NDE}), os citoplasmas (P_{CIDE}) e lume, e o número total de pontos sobre a glândula (P_t); b) interseções das linhas paralelas com as bordas dos núcleos (c) e dos ductos estriados (I_{DE}); e c) o número de imagens de núcleos (n).

Conhecendo-se o volume processado (V_p), a área total examinada (A), o comprimento total das linhas (L), a distância entre as linhas (d) e a espessura do corte (t), calculamos (segundo indicações de WEIBEL²⁸; AHERNE; DUNNILL¹):

a) $V_{VDE} = P_{DE}/Pt$; b) $V_{TDE} = V_{VDE} \cdot V_p$; c) $SV_{DE} = 2 \cdot I_{DE}/L$; d) $ST_{DE} = SV_{DE} \cdot V_p$; e) $N_{DE} = 2n \cdot V_p/A (c/n \cdot d + 2t)$.

Além disso, com o número de pontos que caíram sobre o núcleo e citoplasma das células dos ductos estriados calculamos a densidade de volume celular do núcleo (ρ_{NDE}) e do citoplasma (ρ_{citDE}) pelas relações:

a) $\rho_{NDE} = P_{NDE}/P_{NDE} + P_{citDE}$ e b) $\rho_{citDE} = P_{citDE}/P_{NDE} + P_{citDE}$.

Avaliação do diâmetro externo (D_{DE}) e do comprimento total (C_t) dos ductos estriados

Em 5 cortes histológicos escolhidos ao acaso para cada animal, foram medidos com auxílio de uma ocular micrométrica Olympus 10x tipo Filar e uma objetiva de imersão (100x), 20 transeções de ductos estriados (D_{DE}), escolhendo-se sempre aqueles seccionados transversalmente e medindo-se o menor diâmetro de cada transeção.

Conhecendo-se o raio médio (R_{DE}) do ducto estriado ($R_{DE} = D_{DE}/2$) e o seu volume total (V_{TDE}) calculamos o seu comprimento total (C_t) pela relação: $C_t = V_{TDE}/\pi R_{DE}^2$ (PARDINI; ACHÔA; TAGA¹⁸).

Avaliação do volume nuclear (V_{NDE}) e citoplasmático (V_{citDE}) de células dos ductos estriados.

Em cortes histológicos escolhidos ao acaso, realizamos com a mesma ocular micrométrica Olympus 10x e objetiva de imersão 100x, as medidas ortogonais (D_1 e D_2) de 100 núcleos de células ductais, procurando-se transeções nucleares com o seu equador contido no corte histológico.

De posse das medidas ortogonais de cada núcleo, calculamos o seu diâmetro geométrico médio D ($D = \sqrt[3]{D_1 \cdot D_2}$). A média aritmética dos 100 valores de D , foi utilizada na correção da densidade de volume celular do núcleo (ρ_{NDE}) que se encontra super-estimada pelo efeito Holmes (WEIBEL²⁸) pela relação: $\rho_{NDE, corrigida} = \rho_{NDE}/1 + 3t/2D$, onde t = espessura do corte e D = diâmetro médio do núcleo.

A densidade de volume corrigida do citoplasma ($\rho_{citDE, corr.}$) foi calculado do seguinte modo: $\rho_{citDE, corr.} = 1 - \rho_{NDE, corr.}$

Sabendo-se o valor do volume nuclear ($V_{NDE} = 4/3 \pi R^3$) e da densidade de volume corrigida do núcleo ($\rho_{NDE,$

corr.) e do citoplasma ($\rho_{citDE, corr.}$), o volume citoplasmático foi calculado pela relação:

$V_{citDE} = V_{NDE} \cdot \rho_{citDE, corr.} / \rho_{NDE, corr.}$

Tratamento estatístico

Os dados morfométricos de um grupo foram confrontados com os demais grupos pela análise de variância, segundo indicações de LISON¹³. No caso da densidade de volume, os testes estatísticos foram feitos após transformação arco-seno dos dados originais.

RESULTADOS

As diferentes dimensões morfométricas dos ductos estriados de glândulas parótidas do rato submetidos a tratamento diário com isoproterenol, estão apresentadas na Tabela 1.

A evolução dos parâmetros morfométricos absolutos (massa glandular, volume e superfície totais, número total de células, volume celular, diâmetro e comprimento total), estão apresentados nas Figuras 1 e 2A, B, C, D, E, F.

A análise dos resultados apresentados na tabela e nas figuras mostrou que: a) massa glandular aumentou de 186% ($P < 0,01$) e de 35% ($P < 0,05$), respectivamente, nos períodos de 0 a 3 e 3 a 7 dias de tratamento; entre 7 a 14 dias o aumento observado não foi estatisticamente significativo ($P > 0,05$) (Figura 1); b) a densidade de volume dos ductos estriados ou seja, a fração de volume glandular ocupada pelos ductos estriados decresceu de 79% em todo período analisado ($P < 0,01$); c) o volume total dos ductos estriados diminuiu cerca de 41% ($P < 0,05$) durante os primeiros 5 dias do tratamento, aumentando a seguir, de tal maneira, que no 14º dia, voltou a um valor semelhante ao do grupo 0 dias (Figura 2A); d) em termos percentuais, a densidade de superfície diminuiu de 75% ($P < 0,05$) no período de 0 a 5 dias, mantendo-se constante após este período; e) a superfície externa total dos ductos estriados não apresentou modificações estatisticamente significante ($P > 0,05$) durante todo tratamento (figura 2B); f) o número absoluto de células ductais também não mostrou diferenças significantes, mantendo-se estável durante todo período analisado ($P > 0,05$) (Figura 2C); g) o volume nuclear decresceu de 31% ($P < 0,01$) até o 3º dia de tratamento, aumentando a seguir linearmente em 86,9% ($P < 0,01$) no restante do período; h) o volume celular exibiu uma queda de 40,9% ($P < 0,05$) até o 5º dia, aumentando posteriormente, chegando no 14º dia com um valor semelhante ao do grupo 0 dias (Figura 2D); i) o diâmetro Sdo ducto estriado mostrou uma diminuição altamente

TABELA 1 - Média e erro-padrão da média dos vários parâmetros dos ductos estriados de glândulas parótidas de ratos submetidos a tratamento diário com isoproterenol

Dimensão Morfométrica		Período de Tratamento em Dias				
		0	3	5	7	14
Massa glandular	mg	414,3±9,38	1185,0±9,50	1399,3±151,58	1600,0±127,75	1813,0±180,60
Densidade de volume	%	7,6±1,93	2,6±0,11	1,4±0,11	1,5±0,10	1,6±0,16
Volume total	mm ³	20,1±5,19	19,8±1,01	11,8±1,92	15,2±2,27	18,9±2,51
Densidade superf.	cm ² /cm ³	134,7±35,90	40,1±11,98	33,1±5,49	35,1±3,73	33,7±6,33
Superfície total	cm ²	36,1±10,13	30,6±9,17	29,0±3,10	31,3±2,75	38,9±8,32
N ⁰ céls x 10 ⁶	glândula	19,6±4,11	18,0±4,55	18,2±2,48	24,5±5,16	19,1±5,24
Volume nuclear	µm ³	94,3±2,79	65,2±4,13	73,1±6,77	89,2±11,22	121,8±7,44
Volume celular	µm ³	813,1±141,5	528,4±78,41	518,0±45,92	662,9±176,84	876,9±61,99
Diâmetro externo	µm	30,9±0,71	24,6±0,38	23,4±1,83	25,9±1,78	28,2±0,63
Comprimento total	cm ²	635,9±650,10	4182,7±287,12	2957,3±818,55	2813,6±139,37	3067,4±552,08

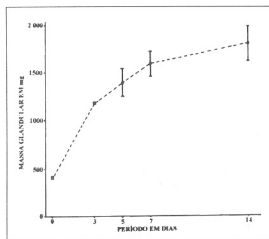


FIGURA 1 Evolução da massa fresca de glândulas parótidas de ratos submetidos a tratamento diário com isoproterenol

significante ($P < 0,01$) de cerca de 20% nos 3 primeiros dias do tratamento, porém ao final do 14^o dia, esta diferença foi de apenas 8,8% ($P < 0,05$) (Figura 2E); j) o comprimento total do ducto estriado, aumentou cerca de 59% ($P < 0,01$) após 3 dias de tratamento, mas a seguir, voltou a um valor próximo ao do controle, estabilizando-se até o final do período de tratamento (Figura 2F).

DISCUSSÃO

O tratamento crônico ou diário de ratos com o agonista β -simpatomimético sintético, isoproterenol, provoca um conspicuo crescimento na massa ou volume à fresco das glândulas parótidas e submandibulares^{23,24,29}.

Inúmeros trabalhos tem mostrado que durante esse enorme crescimento de massa glandular, os ácinos aumentam marcadamente o diâmetro, o tamanho das células, o tamanho dos grãos de secreção e a atividade sintética de DNA, RNA e proteínas de exportação^{4,5,6,12,15,21,22,25,26}.

Como os ductos estriados são as estruturas do adenômero de glândulas salivares maiores responsáveis pelas modificações qualitativas e quantitativas no conteúdo iônico e osmolaridade da saliva primária^{7,8,14,18,19}, seria de se esperar que em uma condição experimental em que as glândulas aumentam grandemente o seu volume e o fluxo salivar, esses ductos também exibissem modificações na morfologia e histofisiologia. No entanto, na pesquisa de BROWN-GRANT⁹ não observou-se nenhuma mudança no diâmetro externo e no tamanho das células desses ductos, quando comparados com as enormes modificações que ocorrem nos ácinos.

Na presente pesquisa procurou-se verificar por métodos altamente sensíveis de morfometria, se algumas das dimensões desse compartimento ductal modificavam-se durante o crescimento das glândulas parótidas do rato induzido pelo isoproterenol.

A análise dos resultados das quantificações mostrou que o compartimento dos ductos estriados diminuiu o seu

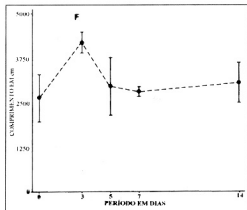
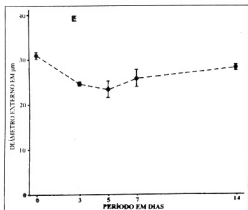
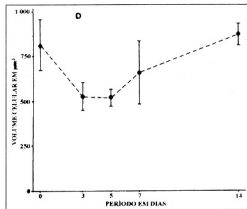
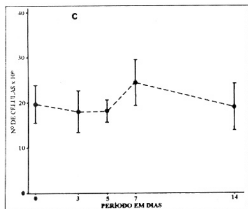
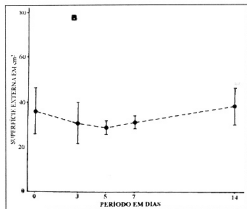
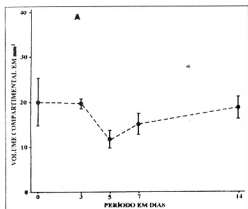


FIGURA 2- Evolução do volume total (A), superfície externa total (B), número absoluto de células (C), volume celular (D), diâmetro externo (E) e comprimento total (F) de ductos estriados de glândulas parótidas de ratos submetidos a tratamento diário com isotoproterenol

volume total em 41,2% nos 5 primeiros dias de estímulo com a droga, chegando, porém, ao final do período de tratamento, com valores próximos aos do grupo controle. A densidade de superfície, acompanhando a evolução temporal do volume total, também decresceu acentuadamente (75%) nos primeiros 5 dias, estabilizando-se à partir desse período, enquanto que, a superfície externa total desses ductos manteve-se estável em todo período. Por outro lado, o diâmetro externo desses ductos diminuiu cerca de 20% após 3 dias de tratamento, enquanto que, o seu comprimento total, neste mesmo período de tratamento, aumentou cerca de 59%.

Acompanhando essas modificações compartmentais, o volume individual médio das suas unidades celulares, decresceu aproximadamente de 41% durante os primeiros 5 dias, aumentando, à seguir, chegando ao 14^o dia de tratamento, com valores semelhantes aos do grupo controle. Deste modo, como o número absoluto de células ductais não se modificou em todo período analisado, o comportamento da evolução temporal do volume total desse compartimento, reflete tão somente a evolução do volume de suas células.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho nos permitiram concluir que, numa tentativa de adaptação da glândula à intensa atividade secretora e ao conspicuo aumento dos ácinos, os ductos estriados alongam-se e as suas células achatam-se procurando acompanhar o crescimento glandular. Após o 14^o dia de tratamento, os ductos estriados retornam aos parâmetros normais.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Sr^{te} *Beonildes Teresinha Ruiz Correia* pela digitação do manuscrito.

ABSTRACT

We studied by stereological methods the changes in the striated ducts during the growth of the rat parotid glands induced by daily treatment with isoproterenol for 14 days. The morphometric parameters: volume density, total compartmental volume, external diameter, total length, cellular volume and absolute cell number of the striated ducts were evaluated. The analysis of the data showed that after 3 days of treatment with the drug, the striated ducts exhibited changes in the cell height, external diameter and total length; returning to control group values in the

14th day of the treatment.

UNITERMS: Striated duct; Parotid gland; Isoproterenol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- AHERNE, W.A.; DUNNILL, 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- ARGONS, J.J. The action of isoproterenol on the salivary glands. *Acta Physiol. lat. Amer.*, v. 12, p. 231-42, 1962.
- 4- BARKA, T. Stimulation of DNA synthesis by isoproterenol in the salivary gland. *Exp. Cell Res.*, v. 39, p. 355-64, 1965.
- 5- BARKA, T. Stimulation of protein and ribonucleic acid synthesis in the rat submaxillary gland by isoproterenol. *Lab. Invest.*, v. 18, n.1, p. 38-41, Jan. 1968.
- 6- BROWN-GRANT, K. Enlargement of salivary gland in mice treated with isopropylnoradrenaline. *Nature*, v. 191, n.19, p. 1076-8, Sept. 1961.
- 7- BRUSILOV, S.W.; COOKE, R.E. Role of parotid ducts in secretion of hypotonic saliva. *Amer. J. Physiol.*, v. 196, p. 831-34, 1959.
- 8- BURGEN, A.S. The secretion of potassium in saliva. *J. Physiol.*, v. 132, p. 20-39, 1956.
- 9- CHAN, W.C. Enlargement of the rat's salivary glands and salivary calculus formation induced with isoprenaline. *J. Pathol. Bacteriol.*, v. 88, p. 563-74, 1964.
- 10- DE LUCA, I.M.S. *Evolução das populações celulares da glândula parótida do hamster: estudo morfométrico, radioautográfico e microestrutural*. São Paulo, 1983. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- 11- GOLDRAJ, 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.
- 12- INOUE, T. Ultrastructural study of rat submandibular gland induced by long-term repeated administration of isoproterenol. *J. Tokyo Dent. Coll. Soc.*, v. 82, n.9, p. 1267-97, Sept. 1982.
- 13- LISON, L. *Statistique appliquée a la biologie experimentale*. Paris, Gouthiers-Villars, 1958.

- 14- MANGOS, J. A.; MC SHERRY, N. B.; NOUSIA-ARVANITAKIS, D. Autonomic regulation of secretion and transductal fluxes of ions in the rat parotid. *Amer. J. Physiol.*, v. 225, n.1, p. 683-3, 1973.
- 15- MATSUURA, S.; HAND, A.R. Quantitative immunocytochemistry of rat submandibular secretory proteins during chronic isoproterenol administration and recovery. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 39, n.7, p. 945-54, July 1991.
- 16- MEDNIEKS, M.J.; HAND, A.H. Microheterogeneity of rat parotid gland protein after chronic treatment with isoproterenol. *J. dent. Res.*, v. 63, n.2, p. 87-93, Feb. 1984.
- 17- ONOFRE, M.A. **Estudo estereológico do crescimento da glândula parótida de rato induzido pelo isoproterenol.** Bauru, 1991. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
- 18- 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. Ciênc. morfol.*, v. 63, p. 93-7, 1993.
- 19- PINKSTAFF, C.A. The cytology of salivary glands. *Int. Rev. Cytol.*, v. 63, p. 141-61, 1980.
- 20- POHTO, P. Catecholamine-induced salivary gland enlargement in rats. *Acta odont. scand.*, v. 24, p. 1-73, May 1966. Supplement 45.
- 21- RADLEY, J.M. DNA synthesis in the rat submaxillary gland following injections of isoprenaline. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, v. 46, p. 795-7, 1968.
- 22- RADLEY, J.M. Ultrastructural changes in the rat submaxillary gland following isoprenaline. *Z. Zellforsch.*, v. 97, p. 196-211, 1969.
- 23- SCHNEYER, C. A. Salivary gland changes after isoproterenol-induced enlargement. *Amer. J. Physiol.*, v. 203, p. 232-6, Aug. 1962.
- 24- SELYE, H.; VEILLEUX, R.; CANTIN, M. Excessive stimulation of salivary gland growth isoproterenol. *Science*, v. 133, p. 44-5, Jan. 1961.
- 25- SHEETZ, J.H.; MORGAN, A.H.; SCHNEYER, C.A. - Morphological and biochemical changes in the rat parotid gland after compensatory and isoproterenol-induced enlargement. *Arch. oral Biol.*, v. 28, n.5, p. 441-5, May 1983.
- 26- SIMSON, J.A.V. Alterations in salivary glands of rats following isoproterenol administration as revealed by electron microscopy. *Anat. Rec.*, v. 157, p. 321-2, Apr. 1967.
- 27- VAN DEN BRENK, H.A.S.; SPARROW, N.; MOORE, V. Effect of x-irradiation on salivary gland growth in the rat. II. Quantitative studies of sialadenotrophism induced with isopropylnoradrenaline and its modification by single doses of x-rays. *Int. J. radiat. Biol.*, v. 17, n.2, p. 135-61, 1970.
- 28- WEIBEL, F. R. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int. Rev. Cytol.*, v. 26, p. 235-302, 1969.
- 29- WELLS, H. Submandibular salivary gland weight increase by administration of isoproterenol to rats. *Amer. J. Physiol.*, v. 202, n.3, p. 425-8, Mar. 1962.

Endereço dos autores:**Prof. Dr. Rumio Taga****Faculdade de Odontologia de Bauru, USP****Departamento de Morfologia****Caixa postal, 73****17.043-101 - Bauru - SP**