

Histomorfometria da glândula submandibular de rato (*Rattus norvegicus*) submetidos à dieta alcoólica – Parte II

Morphometric evaluation of submandibular gland of rat (*Rattus Norvegicus*) submitted to the alcohol diet – Part II

Jesus Carlos ANDREO

Antônio de Castro RODRIGUES

Professor Livre Docente – Departamento de Ciências Biológicas – Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo – Bauru – SP – Brasil

Fabiane Bortoluci da SILVA

Bióloga – Especialista em Ciências – Laboratório de Biologia – Universidade do Sagrado Coração – USC – Bauru – SP – Brasil

Geraldo Marco ROSA JÚNIOR

Luis Henrique Rapucci MORAES

Mestrando – Programa de Pós Graduação – Biologia Oral – Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo – Bauru – SP – Brasil

Simone Maria Galvão de SOUSA

Cirurgiã-Dentista, PhD

RESUMO

A literatura mostra que o alcoolismo é um dos maiores problemas médicos e sociais de quase todas as sociedades neste século, e que ele produz alterações na cavidade oral, por isso pensou-se em realizar este trabalho para observar, histomorfométricamente, se esta substância produz alterações nas glândulas submandibulares de ratos. Para isso foram utilizados 15 ratos machos adultos, que foram divididos em três grupos de cinco animais cada um. Grupo Controle (GC), os animais receberam água e ração “*ad libitum*”; Grupo Alcoolizado (GA), os animais receberam uma mistura de água e álcool numa concentração de 25%; e Grupo Isocalórico (GI), onde os animais receberam uma solução de água e sacarose, com a mesma quantidade de calorias que os animais do grupo alcoolizado. Após 120 dias, de tratamento os animais foram eutanaziados e tiveram suas glândulas submandibulares removidas bilateralmente para análise histomorfométrica. Os resultados mostraram que nos animais do grupo GA ocorreu: menor crescimento na área dos ácinos seromucosos e seus núcleos; e maior crescimento nas áreas nos ductos granulares e estriados. Baseado nestes dados pode-se concluir que o álcool altera a morfologia das estruturas das glândulas submandibulares de ratos.

UNITERMOS

Glândula submandibular; álcool; morfometria, ácino seromucoso; ducto granular; ducto estriado.

INTRODUÇÃO

O consumo crônico de bebidas alcoólicas é um costume social aceito mundialmente, mas que segundo a Organização Mundial da Saúde pode transformar-se em uma doença farmacodependente, a qual até o século passado já atingia mais de oito milhões de pessoas só nos Estados Unidos e nos países do Reino Unido, lembrando que este número pode ser muito maior, uma vez que muitos indivíduos omitem o uso desta substância^{16, 17, 19}.

Apesar do consumo crônico de bebidas alcoólicas ser um costume social aceito mundialmente, tem sido alertado que ele está associado, do ponto de vista epidemiológico, com um risco aumentado de câncer no trato gastrointestinal superior^{16, 17}.

No Brasil o abuso do álcool, sozinho ou combinado com outras substâncias, afetam aproximadamente 8% da população brasileira, gerando um grande custo social⁴.

O álcool se difunde facilmente através da maioria das membranas biológicas, atingindo principalmente a mucosa do trato gastrointestinal^{2,7,8,18,22}, induzindo alterações morfológicas, metabólicas e funcionais, nesta região^{16, 17}.

Durante décadas foi observada uma ligação clínica entre o consumo crônico de álcool e câncer de cabeça e pescoço. Inicialmente o álcool foi descrito como um agente intensificador de risco só em fumantes, mas vários estudos epidemiológicos atuais têm mostrado evidência suficiente que o consumo de álcool crônico aumenta o risco de câncer na região da cabeça e pescoço, independente de exposição à fumaça de cigarro. Além disso, o álcool conduz ao acúmulo de micróbios patológicos na mucosa, conduzindo a infecções crônicas. Portanto, pode-se dizer que a cavidade bucal pode apresentar uma série de sinais e sintomas clínicos, que se originam pelo efeito direto ou indireto do álcool, como por exemplo, um maior número de cáries, cálculos nos ductos das glândulas salivares, sialismo e bruxismo^{16, 17}.

As glândulas salivares são classificadas em dois grupos: maiores e menores. As glândulas salivares menores possuem fluxo salivar contínuo enquanto nas maiores a secreção é controlada principalmente pelo Sistema Nervoso Autônomo, portanto, mais susceptíveis a alterações pelo consumo crônico de álcool⁸.

As informações encontradas sobre o efeito do álcool nas glândulas salivares apresentam algumas divergências. Segundo Borsanyi⁶ (1962) e Rausch e Gorli¹⁵ (1970) o álcool produz uma diminuição no fluxo salivar, no entanto, de acordo com Abelson et

al.¹ (1976) o álcool pode ocasionar um aumento no fluxo salivar.

Este desencontro de informações ocorre também com relação ao tamanho das glândulas salivares. Alguns trabalhos afirmam que o volume das glândulas salivares aumenta entre 60 e 80% em pacientes com cirrose^{8, 9, 13,19}, outros afirmam que o álcool produz uma redução na massa glandular^{8,12}.

O parênquima da glândula submandibular de roedores é composto por ácinos seromucosos, ductos granulares, ductos estriados, ductos intercalares e ductos excretorios. Os ácinos seromucosos são formados por células piramidais com núcleos esféricos na porção basal. Os ductos granulosos representam um segmento ductal altamente desenvolvido e convoluto, os túbulos são formados por uma camada de células prismáticas altas e com grande quantidade de grânulos esféricos e serosos, os núcleos estão localizados na base da célula e tendem ao formato esférico. Os ductos estriados são revestidos por um epitélio prismático, os núcleos são esféricos, e as células apresentam grande quantidade de estriações longitudinais^{3,22}.

Devido à importância das glândulas salivares na Biologia Oral e do consumo de álcool ser um problema social relevante, o trabalho teve como objetivo verificar alterações histomorfométricas relacionadas ao consumo de álcool em glândulas submandibulares de ratos submetidos ao alcoolismo crônico experimental.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 15 ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, machos adultos, com aproximadamente três meses de idade, com peso médio de 200g.

Os animais foram separados em três grupos de cinco animais cada um, da seguinte maneira:

Grupo Controle (GC) – os animais receberam água e ração “ad libitum”.

Grupo Alcoolizado (GA) – As dietas, líquida e sólida, foram “ad libitum”. O modelo de alcoolismo usado foi o “semi-voluntário”, onde o álcool diluído era o único alimento líquido disponível para o animal. Os animais deste grupo foram submetidos a uma dieta crescente semanal de alcoolização de 5%, 15% e 25%, para que eles fossem se adaptando. Após este período de adaptação os animais receberam solução de álcool etílico à 25%, por um período de 120 dias. A metodo-

logia adotada foi semelhante à pesquisa anteriormente realizada por outros autores¹⁹, afim de que os dados pudessem ser comparados mais efetivamente.

O álcool utilizado nesta pesquisa foi o etílico absoluto, do laboratório MERCK (CH₃CH₂OH; PM 46.07).

Grupo Isocalórico (GI) – os animais receberam como dieta líquida uma mistura de água com sacarose, e como dieta sólida ração. A quantidade de calorias na solução de água com sacarose e de ração foram às mesmas que os animais do grupo alcoolizados receberam no dia anterior.

Todos os animais receberam a mesma dieta sólida caracterizada pela ração Nuvilab CR 1 (NUVIAL), durante o decorrer do experimento.

Para controlar o consumo de sólido e líquido os animais foram criados em gaiolas individuais com comedouros e bebedouros individuais.

A iluminação artificial foi comandada em ciclo claro/escuro de 12 horas por “timer”, e a temperatura média pré-estabelecida do ambiente em 21° C foi controlada por um termômetro (Incoterm).

Após o período de alcoolização por 120 dias os animais foram eutanasiados, com injeção via intraperitoneal, de uma dose excessiva de Pentobarbital (Hypnol), na proporção de 100mg/kg. O procedimento de eutanásia foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Sagrado Coração – Bauru (SP).

Após a eutanásia, as glândulas submandibulares foram removidas, dissecadas, identificadas e fixadas em formol a 10%, passando a seguir por processamentos histológicos para coloração pela técnica de Hematoxilina/Eosina (HE).

A análise histomorfométrica foi realizada nos ácinos, ductos estriados e ductos granulares da glândula submandibular. A área dos ductos estriados e granulares e dos ácino seromucosos foram obtidos através da medição de 25 transecções transversais de cada tipo de estrutura por animal. Para a obtenção das áreas dos núcleos dos ácinos, ductos granulares e estriados, a medição foi realizada em 50 transecções transversais.

As medidas foram realizadas em microscópio óptico Olympus BX 50 acoplado a um computador, e analisado através do programa Image Pro Plus versão 4.5 (Micronal). Primeiramente, as lâminas com os cortes das glândulas submandibulares foram fotografadas, então, a partir das imagens capturadas foram realizadas as medições das estruturas.

Os dados referentes à análise morfométrica das glândulas submandibulares foram submetidos ao teste estatístico, através da análise de variância para modelo de medidas repetidas em três grupos independentes, complementada com os respectivos testes de comparações múltiplas²⁴. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística de medidas repetidas para perfis independentes com nível de 5% de significância.

RESULTADOS

Os dados da análise histomorfométrica das áreas dos ácinos, núcleo dos ácinos, ductos granulares, núcleos dos ductos granulares, ducto estriado e núcleos dos ductos estriados das glândulas submandibulares dos Grupos GC, GA e GI estão expressos, nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Média e desvio-padrão das áreas (µm²) dos ácinos, ductos granulares e ductos estriados.

Grupos	Ácino		Ducto Granular		Ducto Estriado	
	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo
G C	316,86 ± 22,50	309,75 ± 25,69	382,66 ± 55,19	378,54 ± 51,11	334,80 ± 45,88	296,60 ± 30,39
G A	308,96 ± 36,33	301,99 ± 29,79	452,55 ± 74,22	480,59 ± 58,65	335,60 ± 41,83	364,20 ± 28,02
G I	370,75 ± 57,92	356,35 ± 21,81	467,88 ± 75,41	440,61 ± 80,79	363,40 ± 30,32	342,20 ± 7,86

Tabela 2 – Média e desvio-padrão das áreas (μm^2) dos núcleos do ácino, núcleos do ducto granular e núcleos do ducto estriado.

Grupos	Núcleo do ácino		Núcleo do ducto granular		Núcleo do ducto estriado	
	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo
G C	8,17 ± 0,15	8,10 ± 0,53	11,40 ± 0,68	10,76 ± 0,98	6,34 ± 1,13	5,70 ± 1,36
G A	8,49 ± 0,77	7,67 ± 0,47	12,21 ± 0,98	12,26 ± 1,33	7,69 ± 0,92	7,52 ± 0,32
G I	8,12 ± 0,42	8,34 ± 0,29	12,30 ± 1,40	11,80 ± 1,41	6,96 ± 0,14	7,02 ± 0,38

Os dados mostram que as glândulas submandibulares apresentaram diferenças entre os grupos controle (GC), grupo alcoolizado (GA) e isocalórico (GI). Nas glândulas submandibulares do GA, ocorreu menor crescimento na área dos ácinos seromucosos e na área dos núcleos dos ácinos, sendo mais evidente no lado esquerdo da glândula. No entanto, ocorreu maior crescimento na área dos ductos granulares e estriados e de seus respectivos núcleos.

No grupo isocalórico ocorreu maior crescimento na área dos ácinos seromucosos, ductos estriados e ductos granulares. Por outro lado, as áreas dos núcleos de ácinos e ductos não tiveram um crescimento significativo quando comparados com o grupo controle.

A figura 1 mostra fotomicrografias da glândula submandibular de ratos durante os três períodos de tratamento. Algumas alterações podem ser observadas, como aumento de tecido conjuntivo, entre as estruturas do grupo alcoólico evidente pela presença de espaços entre os ácinos e ductos.

DISCUSSÃO

No grupo alcoolizado nota-se um menor crescimento dos ácinos seromucosos e de seus núcleos, mas não houve alterações significativas nos ductos. Este achado está de acordo com Tirapelli et al.²² (2001) que a partir da análise morfométrica dos ácinos seromucosos e dos ductos granulares das glândulas submandibulares de ratos submetidos ao alcoolismo crônico constataram que o consumo crônico desta dro-

ga reduz significativamente a área das células acinosas e das células dos ductos granulares. Os trabalhos de Faustino e Stipp⁸(2003) e Lieber¹³ (1991), também demonstraram redução das glândulas submandibulares em grupos alcoolizados. Silva et al.¹⁹ (2003) analisando a morfometria da glândula submandibular de ratos submetidos à dieta alcoólica, constataram que no GA as glândulas tiveram uma diminuição no sentido longitudinal, sendo o lado esquerdo o mais afetado e a largura manteve constante.

Faustino e Stipp⁸ (2003) analisaram os efeitos do alcoolismo crônico e da desintoxicação alcoólica em glândulas submandibulares de ratos, e os resultados mostraram que as massas, corpórea e glandular dos animais sofreram uma redução nos grupos alcoólico e desintoxicado em relação ao grupo controle. Após o período de desintoxicação, os pesquisadores notaram aumento das massas corpóreas e glandulares em relação ao grupo alcoolizado. Quanto ao volume absoluto das diversas estruturas glandulares analisadas, constataram diferenças significantes nos ácinos e no ducto granuloso, onde os grupos, alcoolizado e desintoxicados apresentaram menor volume absoluto em relação ao grupo controle. Tais dados corroboram com nossos resultados de redução da área acinar, no entanto, não encontramos redução na área do ducto de células granulosas. Um dos fatores associados à perda de massa glandular é a redução do volume absoluto (mm^3) do ácino e do ducto granuloso, porção secretora da glândula. A diminuição no volume médio da célula acinosa pode ser resultado de uma atrofia do

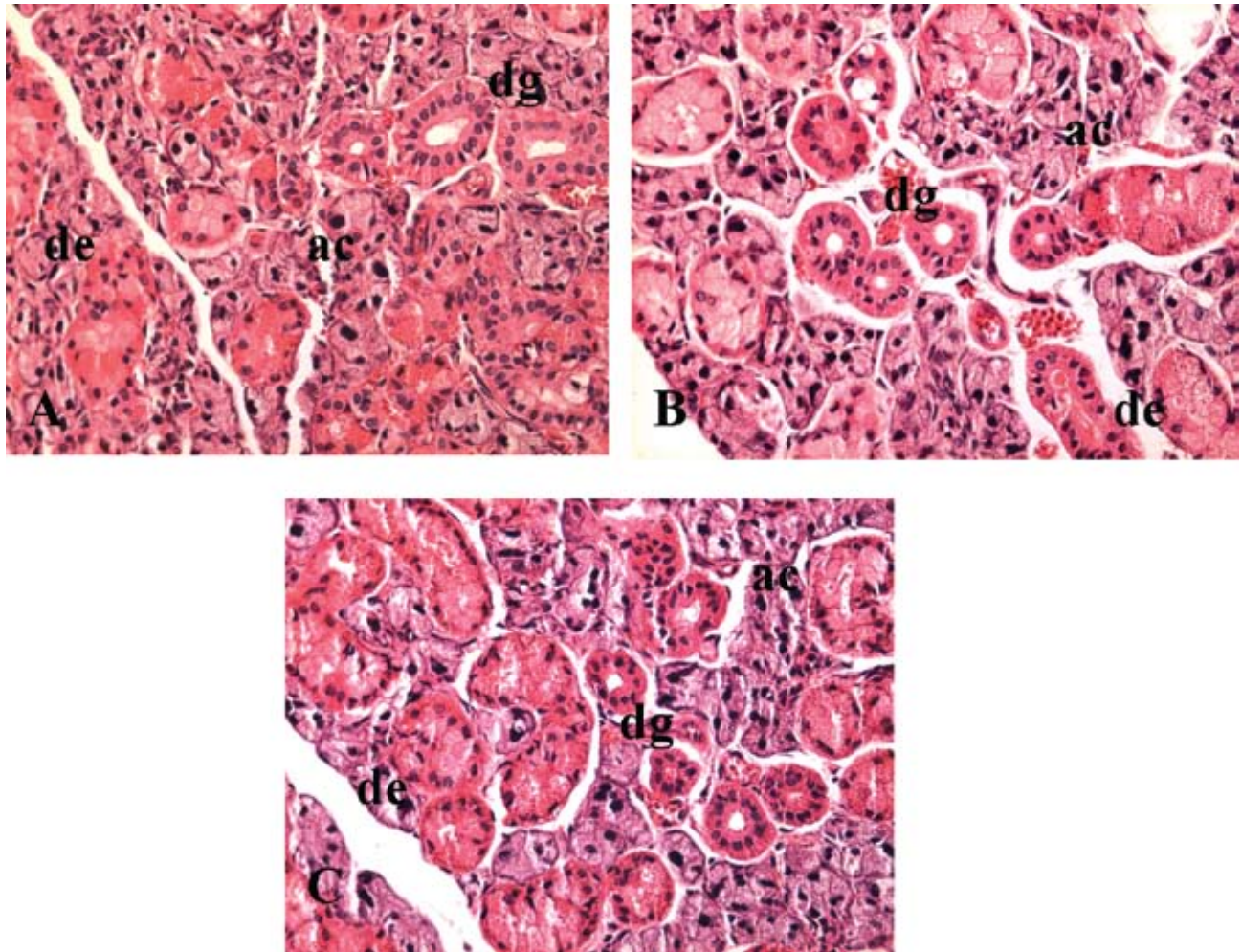


Figura 1 – Corte histológico da glândula submandibular de ratos, do grupo Controle (A), grupo alcoólico (B) e grupo isocalórico (C). ac = ácino seromucoso, dg = ducto granular, de = ducto estriado (H/E 100x).

parênquima secretor o que parece ser responsável pela diminuição da secreção salivar. Além disso, segundo Lieber¹³ (1991), a sensação de saciedade provocada pelo álcool, ocasiona uma diminuição na ingestão da dieta e, assim, há um menor estímulo das glândulas salivares, podendo levar a uma atrofia glandular.

De acordo com Bhaskar⁵ (1989), o alcoolismo pode aumentar o tamanho das glândulas salivares. Estes achados não estão de acordo com os resultados deste trabalho, pois as glândulas do grupo alcoolizado tiveram menor crescimento em relação aos demais grupos analisados.

Vários autores^{2,8,12,14,18} tem mostrado que nas glândulas submandibulares de indivíduos com cirrose ocorre aumento proporcional de tecido adiposo e redução de tecido fibrovascular, quando comparados

com grupo controle. Estas alterações acontecem concomitantemente com a redução da quantidade de parênquima glandular, principalmente dos ácinos²¹. Segundo Scott et al.¹⁸ (1988) essas alterações no metabolismo do tecido adiposo podem estar associados à deposição de tecido adiposo intraglandular, como consequência de alterações do funcionamento do fígado devido a cirrose hepática.

Tirapelli et al.²³ (2002) analisando alterações na glândula submandibular de ratos submetidos ao alcoolismo crônico, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, observaram várias alterações ultraestruturais no grupo alcoólico principalmente nas células seromucosas, como dilatação das cisternas do complexo de Golgi, diminuição entre as células basolaterais e aumento do tecido conjuntivo. Tais

alterações poderiam justificar o aumento da área dos ácinos seromucosos no grupo alcoólico, observações também vistas em outros estudos. Os autores não encontraram alterações nos animais dos grupos, controle e isocalórico, como também nenhuma outra parte do parênquima glandular no grupo alcoólico.

Alterações histológicas em ductos granulares de glândulas de ratos alcoolizados também foram descritas por Soubhia²⁰ (1989), como: aumento do número, volume e conteúdo citoplasmático. Estas alterações poderiam estar relacionadas com o aumento do ducto granular, como foi encontrado no presente trabalho.

De acordo Faustino e Stipp⁸ (2003), o álcool através do efeito sistêmico promove alterações nas glândulas salivares de uma forma direta ou indireta. As alterações morfológicas promovem modificações na produção e secreção salivar, causando diminuição no fluxo salivar e modificações na sua consistência, tornando-a mais viscosa.

O meio de ação do álcool nas glândulas salivares ainda é incerto. Entretanto, algumas possibilidades podem ser sugeridas: o álcool poderia alterar o con-

trole do Sistema Nervoso Autônomo, influenciando e alterando os receptores, uma vez que as glândulas dependem da inervação para manter a estrutura; o álcool poderia alterar a secreção de hormônios do crescimento, tirosina, adrenocorticoides, testosterona e insulina, responsáveis por manter a estrutura dessas glândulas; e o álcool poderia atuar diretamente nas células glandulares¹². Esta é uma dúvida que permanece e que merece uma verificação futura.

CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou que a ingestão crônica de álcool ocasiona alterações histomorfométricas nas glândulas submandibulares de ratos, mais precisamente nos ácinos seromucosos e seus núcleos.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Carlos Roberto Padovani pela realização da análise estatística.

ABSTRACT

The literature shows that alcoholism is the one of the most medical and a social problem of almost all society in this century, and that it produces alterations in the oral cavity. Therefore it was thought about carrying through this work to observe under morphological criteria, if this substance produces alterations in the rat submandibullary glands. For that purpose, 3 groups were used (5 rats in each group): control group (CG) received water and food "ad libitum"; alcoholic group (AG) received the solution containing water and 25% alcohol; and isocaloric group (IG) received a solution containing water and sucrose, with the same amount of calories as the animals in the alcoholic group. After 120 days of treatment the animals were sacrificed and had its submandibullary glands removed bilaterally for histomorphometric analysis. The results indicated that in the animals of group GA there was reduction in the area and nuclei of the seromucous acini. On the other hand, there was an enlargement in the area of the granular and striated ducts. Based in these data it can be concluded that the alcohol alters the morphology of the structures of the submandibullary glands of the rats.

UNITERMS:

Submandibular gland; alcohol; morphometric

REFERÊNCIAS

- Abelson DC, Mandel ID, Karmioli M. Salivary studies in alcoholic cirrhosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1976; 41: 188-92.
- Banderas JA, Gaitan, LA, Portilla J, Aguirre A. Effects of chronic ethanol consumption on the rat parotid gland. *Arch Bras Biol.* 1992; 37(1):69-72.
- Barbosa DB, Taga T. Estudo estereológico dos diferentes componentes estruturais de glândulas submandibulares de ratos macho e fêmeas. *Rev FOB.* 1997; 5 (3/4):51-57.
- Bau CHD. Estado atual e perspectivas da genética e epidemiologia do alcoolismo. *Ciênc. saúde coletiva.* 2002; 7 (1):183-90.
- Bhaskar SL. *Histologia e embriologia oral de Orban.* 10 ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1989. 501p.
- Borsanyi SJ. Chronic asymptomatic enlargement of the parotid glands. *Ann Otolaryngol* 1962; 71(4): 857- 86.
- Dost P, Kaiser S. Ultrasonographic biometry in salivary glands. *Ultrasound Med Biol.* 1997; 23 (9):1299-303.
- Faustino SES, Stipp ACM. Efeitos do alcoolismo crônico e da desintoxicação alcoólica sobre a glândula submandibular de ratos. Estudo morfométrico. *J Appl Oral Sci.* 2003; 11(1):21-6.
- Ferraris ME, Carranza M, Ferraris R, Fili T. Variaciones estructurales en glândulas salivales de pacientes alcoholistas crônicos. *Rev Fac Odontol.* 1991; 19/20 (1/2): 59-68.
- Johnson RA, Wichern DW. *Applies multivariate statistical analysis.* 4rd. New Jersey: Prentice-Hall;1998, 642p.
- Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. 414p.
- Lamano Carvalho TL, Zucoloto S, Rossi MA, Sala MA, Lopes RA. Estudo estereológico das alterações determinadas pelo etanol nas glândulas salivares submandibular e parótida de rato. *Rev Odontol Univ São Paulo.* 1993; 7:219,25.
- Lieber CS. Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res.* 1991; 15(4):573-92.
- Maier H, Born IA, Veith S, Adler D, Seitz HK. The effect of chronic ethanol consumption on salivary gland morphology and function in the rat. *Alcohol Clin Exp Res.* 1986; 10:425-27.
- Rausch S, Gorli R. Diseases of the salivary glands. In: Thoma's Oral-pathology. 6ª ed. St Louis: Mosby; 1970. v.2 p. 992-3.
- Riedel F, Goessler U, Hormann K. Alcohol-related diseases of the mouth and throat. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2003; 17 (4):543–55.
- Ruiz AF, Peláez MAC, Lapiedra RC, Gómez GE, López LAM. Efectos del consumo de alcohol etílico en la cavidad oral: Relación con el cáncer oral. *Medicina y Patología Oral / Oral Medicine and Pathology* 2004; 9:14-23.
- Scott J, Burns J, Flower EA. Histological analysis of parotid and submandibular glands in chronic alcohol abuse: a necropsy study. *J Clin Pathol.* 1988; 441(8): 837-40.
- Silva FB, Sousa SMG, Andreo JC. Avaliação morfométrica da glândula submandibular de *Rattus novergicus* submetidos à dieta alcoólica – Parte I. *Cienc Odontol Bras.* 2003; 6(4): 41-7.
- Soubhia AMP. Estudos morfológicos e histoquímico da glândula submandibular de ratos tratados com aguardente de cana [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista; 1989.
- Ten Cate ART. *Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função.* 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan; 1985. 395p.
- Tirapelli LF, Tirapelli CR, Tirapelli DPC, Cassel FD, Petroni S, Tamega OJ. Morphometric análisis of seromucous acini and granular ducts of submandibular glands from rats (*Rattus novergicus*) submitted to experimental chronic alcoholism. *Rev Chil Ana.* 2001; 19(3):263-9.
- Tirapelli LF, Tirapelli DPC, Tamega OJ. Ultrastructural alterations in submandibular glands of rats (*Rattus novergicus*) submitted to experimental chronic alcoholism. *Rev Chil Ana.* 2002; 20 (1):5-12.
- Yonetsu K, Yuasa K, Kanda S. Quantitative análisis of the submandibular gland using computed tomography. *Dentomaxillofac Radiol.* 1996; 25(2): 97-102.

Recebido em 05/02/07

Aprovado em 28/11/07

Correspondência

Fabiane Bortoluci da Silva
Rua Mário Gonzaga Junqueira, 255
17051-080 Bauru SP
e-mail:bortoluci@uol.com.br