

Avaliação morfométrica da glândula submandibular de *Rattus norvegicus* submetidos à dieta alcoólica – Parte I

Morphometric evaluation of submandibular gland of *Rattus norvegicus* submitted alcohol diet – Part I

Fabiane Bortoluci da SILVA

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

Simone Maria Galvão de SOUSA

Professora Doutora – Disciplina de Patologia Bucal – Faculdade de Odontologia – Universidade do Sagrado Coração - USC – Bauru

Jesus Carlos ANDREO

Professor Doutor – Centro de Pesquisa e Pós Graduação – Universidade do Sagrado Coração – USC – Bauru

RESUMO

A ingestão crônica de álcool pode provocar alterações morfológicas em diferentes tecidos. Ratos machos foram submetidos à dieta alcoólica de forma gradativa com álcool a 6%, 15% e 25%. Após o período de 120 dias os animais foram sacrificados e as glândulas submandibulares removidas para análise morfométrica. A análise morfométrica foi realizada em fotos e nas peças cirúrgicas com paquímetro convencional e paquímetro digital. Os resultados indicaram que o consumo de álcool ocasionou alterações macroscópicas nas glândulas submandibulares. O paquímetro digital foi mais preciso nas mensurações ($p < 0,05$).

UNITERMOS

Glândula submandibular, álcool, morfometria

INTRODUÇÃO

O uso de álcool é considerado um problema social sério, por acarretar conseqüências clínicas e fisiológicas na saúde da população humana. Com exceção da pele, o álcool é difundido para todas as membranas biológicas, principalmente do trato gastrointestinal. A ingestão crônica do álcool pode ocasionar cirrose, anemia ascite, hemorragia, hipoproteinemia, anemia macrocítica, e desordens neurológicas. Ademais, em excesso, esta droga também pode alterar o funcionamento das glândulas salivares.

A glândula submandibular de roedores é um importante modelo para pesquisa na biologia celular. Esta tem atraído atenção de pesquisadores desde a descoberta de que as células do ducto granular produzem muitos fatores ativos, os quais têm

importante papel na fisiologia do trato gastrointestinal. As proteases, fator de crescimento do nervo, amilase e eritropoetina são alguns destes fatores ativos. A glândula submandibular é considerada como sendo uma glândula tubuloacinososa composta, por apresentar uma porção secretora constituída por células mucosas e serosas. Ratos submetidos a uma dieta deficiente de proteína-caloria apresentam alterações na glândula submandibular, como atrofia acinar, subdesenvolvimento do ducto granular e atrofia do ducto granular, combinada com redução na quantidade de triptofano^{5,9}.

Scott et al.¹¹(1988), analisaram microscopicamente as glândulas parótidas e submandibulares de 28 indivíduos alcoólicos submetidos à necropsia. A glândula submandibular apresentou um aumento proporcional de tecido adiposo, mas não ocorreu redução nos ácinos. Houve aumento da glân-

dula parótida, mas não ocorreu hipertrofia nos ácinos.

Gómez et al.⁷(1991), realizaram análise histológica e histoquímica das glândulas salivares maiores e menores de pacientes que faleceram de cirrose alcoólica. A glândula submandibular apresentou ácinos mucosos sem granulações, condutos excretórios dilatados com epitélio atrofico, leve edema intersticial e congestão vascular. Foi notado nas glândulas salivares menores e sublingual hipertrofia acinar com ductos amplos contendo secreção ligeiramente basófila. Estes resultados sugerem que o parênquima e estroma das glândulas salivares, tanto maiores quanto menores, são afetados em diversos graus pelo consumo crônico de álcool.

Numa análise morfométrica dos ácinos seromucosos e dos ductos granulares das glândulas submandibulares de ratos submetidos a alcoolismo crônico, Tirapelli et al.¹³ observaram que o consumo crônico desta droga reduz significativamente a área das células acinosas e das células dos ductos granulares.

Faustino & Stipp⁴(2003), analisando os efeitos do alcoolismo crônico e da desintoxicação alcoólica em glândulas submandibulares de ratos, os resultados mostraram uma diferença significativa no que se refere à massa corpórea dos animais e da glândula submandibular. Ocorreu uma redução tanto no grupo alcoolizado quanto no grupo desintoxicado em relação do grupo controle. O grupo alcoolizado também apresentou menor volume absoluto de estruturas glandulares.

A forma de qualquer ser vivo e de suas partes, é específica e própria dele. Assim, é possível considerar diversos parâmetros de medidas, relacionando-as entre si e obtendo uma tabela de índices específicos para cada espécie. Segundo Gallego et al.⁶ (1995), na organização de uma base de dados deve-se introduzir a informação de três campos diferentes: (1) qual a estrutura, (2) a que espécie pertence e (3) quais são os dados biométricos. Por conseguinte, serão calculados os valores dos possíveis índices biométricos, assim como a média e o desvio-padrão.

Desde a antiguidade, o homem vem desenvolvendo a sua habilidade para reproduzir as formas encontradas na natureza. No entanto, para isso ele teve que desenvolver a capacidade de efetuar medidas precisas. Em biomedicina, morfometria é a atividade de medir estruturas anatômicas. O paquí-

metro, régua, fita métrica, ultrassonografia, tomografia computadorizada e microscópio são alguns dos equipamentos que podem ser utilizados na morfometria^{3, 7, 10, 12, 15}.

Devido à importância das glândulas salivares na Biologia Oral e do consumo de álcool ser um problema social relevante, este trabalho teve como objetivo verificar o efeito da ingestão crônica de álcool na morfologia das glândulas submandibulares de ratos.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 15 ratos (*Rattus norvegicus*), machos adultos, com aproximadamente três meses de idade, da linhagem Wistar, com peso médio de 200g. Os animais, após a idade de noventa dias, foram criados em gaiolas individuais com comedouros e bebedouros individuais, para melhor controlar o consumo de sólido e líquido. A iluminação artificial foi comandada por *timer*, que controlou o ciclo claro/escuro de 12 horas e a temperatura média preestabelecida do ambiente, controlada por um termômetro (Incoterm), foi de 21° C.

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

Grupo controle Normal (GN) – os animais receberam água de torneira como dieta líquida.

Grupo Alcoolizado (GA) – os animais receberam álcool etílico 25% diluído com água de torneira.

Grupo Controle Nutricional Pareado – isocalórico (GI) – os animais receberam água com sacarose como dieta líquida.

Todos os animais receberam a mesma dieta sólida caracterizada pela ração Nuvilab CR 1 (NUVIAL), durante o decorrer do experimento. O modelo de alcoolismo usado foi o “semi-voluntário”, onde a administração de álcool diluído foi o único alimento líquido disponível para o animal. O álcool utilizado nesta pesquisa foi o etílico absoluto, do laboratório MERCK (CH₃CH₂OH; PM 46.07).

O grupo alcoolizado (GA) foi submetido a um período de adaptação gradativa ao álcool, para caracterizar o alcoolismo crônico e, também evitar a morte dos mesmos. Esta adaptação foi realizada fornecendo uma dieta líquida de álcool etílico diluído a 6% na primeira semana, 15% na segunda semana e, na terceira semana, uma dieta líquida de

álcool etílico a 25%. Os animais continuaram a receber esta última solução por mais 120 dias.

A quantidade da dieta sólida e líquida ingerida diariamente pelos animais foi controlada. Os animais recebiam diariamente 30gr de ração, onde decorrido 24 horas a sobra era pesada e o valor subtraído das 30gr iniciais. Posteriormente, era fornecido novamente as 30gr de ração e assim, sucessivamente. Quanto à dieta líquida, os animais receberam 50mL de líquido, 24 horas após foi medida a sobra, o valor subtraído dos 50mL e a diferença acrescida ao líquido para totalizar 50mL, e assim sucessivamente.

Os animais do GN e GI receberam diariamente a média (ração e líquido) ingerida pelos animais do GA. No GI, o tratamento foi iniciado um dia após o do alcoolizado, para que a quantidade de álcool e de ração do grupo alcoolizado fosse conhecida e a dieta de sacarose pudesse ser calculada.

Decorrido o período preestabelecido, os animais de cada grupo foram sacrificados. O método de eutanásia foi à injeção por 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). As glândulas foram removidas, dissecadas, identificadas e fixadas em formalina a 10%.

A análise morfométrica da glândula foi realizada através de três instrumentos: foto (Nikon 6006, Medical-NIKKOR 120mm f/4 IF), paquímetro convencional (Mitutoyo) e paquímetro digital (Starret, n. 727-6/150). As medições foram realizadas em todas as glândulas, em ambos os lados, analisando o comprimento e a largura das mesmas.

Os dados referentes à análise morfométrica das glândulas submandibulares foram submetidos ao teste estatístico de MANOVA¹⁴.

RESULTADOS

O presente estudo morfométrico demonstrou que a ingestão de etanol promove alterações na glândula submandibular. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística de medidas repetidas para perfis independentes com nível de 5% de significância.

As glândulas submandibulares analisadas apresentaram diferenças quanto o comprimento e a largura entre o grupo normal (GN) e o grupo alcoolizado (GA), como está ilustrado nas Figuras 1, 2 e 3. O comprimento das glândulas teve um índice de diminuição mais evidente do que a largura, sendo

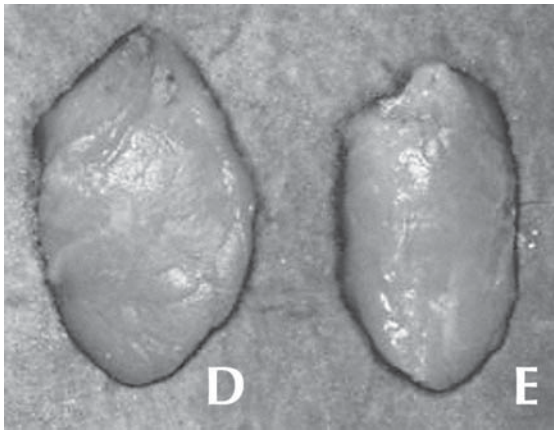


FIGURA 1 – Foto referente às glândulas submandibulares direita (D) e esquerda (E) do grupo normal (GN).

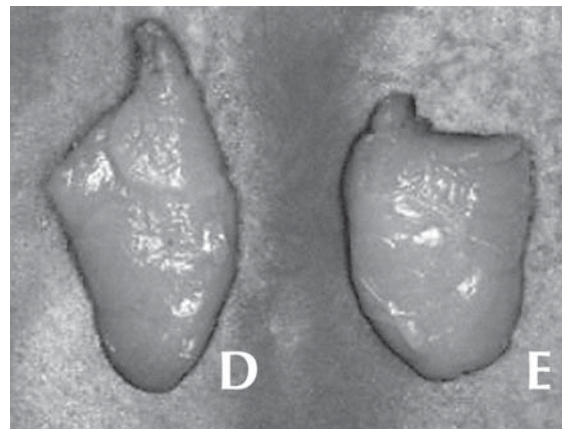


FIGURA 2 – Foto referente às glândulas submandibulares direita (D) esquerda (E) do grupo alcoolizado (GA).

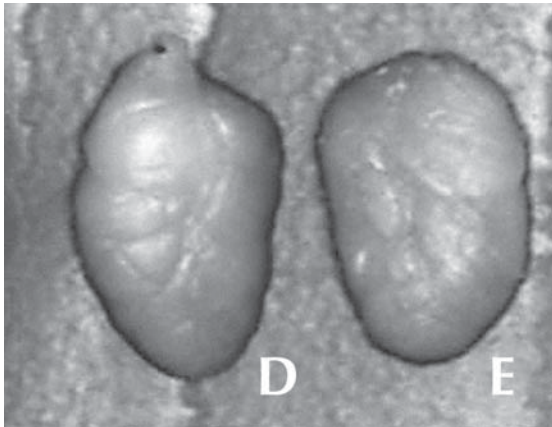


FIGURA 3 – Foto referente às glândulas submandibulares direita (D) esquerda (E) do grupo isocalórico (GI).

que o lado esquerdo apresentou a menor medida no grupo alcoolizado.

A média e desvio-padrão do comprimento e largura das glândulas submandibulares de ratos e o respectivo resultado do teste de análise de medidas repetidas para perfis independentes de lado, instrumento e grupos, estão expressos respectivamente nas Tabelas 1 e 2.

DISCUSSÃO

O álcool é umas das drogas mais antigas e populares usadas pela sociedade em geral. A ingestão crônica de álcool pode afetar a maioria dos tecidos e órgãos do corpo, dentre eles, as glândulas salivares maiores e menores.

Na cavidade bucal, o álcool ocasiona alterações nas glândulas salivares e pode estar associado com casos de câncer bucal. Há relatos que mostram alterações na composição e taxa de secreção salivar principalmente, em pacientes com cirrose alcoólica^{1, 11}.

Tabela 1 – Média e desvio-padrão do comprimento da glândula submandibular de ratos

GRUPO	LADO	INSTRUMENTO		
		FOTO	PAQUÍMETRO CONVENCIONAL	PAQUÍMETRO DIGITAL
GN	D	1,686 ± 0,095 aBβ	1,634 ± 0,040 aBβ	1,520 ± 0,068 aAβ
	E	1,620 ± 0,082 aAβ	1,592 ± 0,045 aAγ	1,486 ± 0,094 aAβ
GA	D	1,460 ± 0,070 bBα	1,372 ± 0,051 bAα	1,302 ± 0,069 bAα
	E	1,262 ± 0,043 aAα	1,218 ± 0,039 aAα	1,128 ± 0,092 aAα
GI	D	1,618 ± 0,039 aAβ	1,598 ± 0,067 bAβ	1,522 ± 0,085 aAβ
	E	1,538 ± 0,061 aAβ	1,476 ± 0,082 aAβ	1,414 ± 0,053 aAβ

* letra minúscula: comparação de lado fixados grupo e instrumento

** letra maiúscula: comparação de instrumento fixados grupo e lado

*** letra grega: comparação de grupo fixados lado e instrumento

Tabela 2 - Média e desvio-padrão da largura da glândula submandibular de ratos

GRUPO	LADO	INSTRUMENTO		
		FOTO	PAQUÍMETRO CONVENCIONAL	PAQUÍMETRO DIGITAL
GN	D	0,934 ± 0,078 bBβ	0,880 ± 0,075 bBα	0,794 ± 0,073 aAα
	E	0,794 ± 0,065 aAα	0,794 ± 0,064 aAα	0,738 ± 0,068 aAα
GA	D	0,846 ± 0,069 aAα	0,818 ± 0,060 aAα	0,776 ± 0,083 aAα
	E	0,816 ± 0,056 aAα	0,764 ± 0,065 aAα	0,726 ± 0,038 aAα
GI	D	0,890 ± 0,049 aAαβ	0,834 ± 0,066 aAα	0,794 ± 0,063 aAα
	E	0,886 ± 0,063 aAβ	0,830 ± 0,072 aAα	0,796 ± 0,046 aAα

* letra minúscula: comparação de lado fixados grupo e instrumento.

** letra maiúscula: comparação de instrumento fixados grupo e lado.

*** letra grega: comparação de grupo fixados lado e instrumento.

A morfometria tem a função de tornar mais objetiva e precisa a coleta, apresentação e análise dos resultados das pesquisas, permitindo assim relacionar as diferentes estruturas anatômicas com suas funções. Para a análise morfométrica, optouse pela utilização de três instrumentos: foto, paquímetro convencional e paquímetro digital, a fim de compararmos estatisticamente qual dos métodos seria o mais preciso para analisar as alterações nas glândulas submandibulares de ratos submetidos à dieta alcoólica.

Os resultados desta pesquisa evidenciaram alterações macroscópicas da glândula submandibular dos ratos do grupo alcoolizado (GA) quando comparados com o grupo normal (GN) e isocalórico (GI). De modo geral, os ratos do grupo alcoolizado apresentaram uma diminuição no sentido longitudinal de suas glândulas, sendo o lado esquerdo o mais afetado. Todavia, a largura manteve-se constante, independentemente do método utilizado para análise.

De acordo com Bhaskar² (1984), o alcoolismo pode aumentar o tamanho das glândulas salivares. Já Tirapelli et al.¹³ (2001), não encontraram nenhuma alteração macroscópica na glândula submandi-

bular de ratos submetidos ao alcoolismo crônico. Estes achados não estão de acordo com nossos resultados, pois as glândulas tiveram seu tamanho reduzido em relação aos demais grupos analisados. Os trabalhos de Faustino & Stipp⁴ (2003), e Lieber¹⁰ (1991), também demonstraram a redução das glândulas submandibulares em grupos alcoolizados.

Um dos fatores associados à perda de massa glandular é a redução do volume absoluto (mm³) 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 parênquima secretor o que parece ser responsável pela diminuição da secreção salivar. Além disso, segundo Lieber¹⁰ (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.

Nos organismos vivos evidenciamos uma assimetria entre as estruturas anatômicas bilaterais, ou seja, uma assimetria normal e esperada. Nesta pesquisa, esta assimetria foi mantida em todos os grupos, apesar das variações das condições experimen-

tais. No grupo GA, o aumento na desproporção no tamanho poderia ser justificado pelas possíveis alterações na vascularização uma vez que, sugestionou-se o álcool como sendo um fator angiogênico.

Quanto à maior redução da glândula no sentido longitudinal, a quantidade e a disposição dos tecidos e estruturas, no caso dos ductos, poderiam ser entendidas com prováveis responsáveis pela redução neste sentido. A disposição da fásia e ligamentos da fossa submandibular também devem ser fatores considerados.

Independente do instrumento de análise, o GI apresentou suas médias tanto de comprimento quanto de largura bastante semelhantes. Contudo, em apenas dois momentos a glândula esquerda do GN apresentou-se maior que a do grupo GI. O lado direito foi mais sensível a variação do método, principalmente no GN.

O instrumento que se mostrou mais sensível às alterações de comprimento e largura foi o do paquímetro digital, isto pode ser explicado, por ser um aparelho de maior precisão quando comparado ao paquímetro convencional e a fotografia. O paquímetro digital apesar de ser o mais preciso é também o mais caro. Muitas vezes podemos não ter acesso a métodos mais sofisticados, no entanto, a variação entre os métodos foi bem pequena, demonstrando que tanto o paquímetro convencional como a foto, também fornecem bons resultados.

Com o avanço da ciência tecnológica no campo da saúde, diversos novos métodos têm sido introduzidos na determinação biométrica das glândulas submandibulares, dentre eles a ultrassonografia e a tomografia computadorizada^{3,8,15}. Os métodos utilizados nesta pesquisa foram mais simples e menos dispendiosos. É importante que o modo de medir seja o mais simples possível, o erro da ferramenta de medida seja mínimo. Por exemplo, se for uma régua o erro não será superior a meio milímetro e também não importa o tamanho da figura, se for a mesma pessoa que realize as medidas o erro será o mesmo e pela média e desvio-padrão será possível classificar corretamente⁷.

A pequena diferença estatística encontrada em relação aos três instrumentos talvez possa ser decorrente de algum erro. Segundo Gallego et al.⁶(1995), o erro pessoal e o erro da ferramenta são aspectos que devem ser considerados numa análise biométrica. Neste experimento, ficaria difícil afirmar qual dos erros ocorreu, pois eram instrumentos que exigiam muita atenção e habilidades manuais. Enquanto o paquímetro digital fornece uma leitura imediata, o paquímetro convencional demanda um certo tempo na análise da escala de valores, podendo ocasionar um erro de paralaxia.

Resumidamente, notamos que as glândulas submandibulares do lado esquerdo mostraram-se mais sensíveis às variações da dieta ao passo que o GN teve maior influência da variação do método. Na segunda parte deste estudo serão analisados, microscopicamente, quais os efeitos morfológicos das três condições experimentais nas glândulas submandibulares.

CONCLUSÕES

Com base na metodologia e nos resultados obtidos, podemos concluir que:

- a) Os ratos do grupo alcoolizado apresentaram uma diminuição de suas glândulas no sentido longitudinal, sendo o lado esquerdo o mais afetado;
- b) A largura manteve-se constante, independentemente do instrumento utilizado para análise;
- c) O instrumento mais sensível às alterações de comprimento e largura foi o paquímetro digital;
- d) Os ratos do grupo normal tiveram maior influência da variação do instrumento.

AGRADECIMENTOS

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

ABSTRACT

Chronic alcohol ingestion can produce morphological changes in different tissues. In the present research, it was realized morphological analysis of the submandibular glands of rats submitted to alcoholic diet. Male Wistar rats received an alcoholic diet containing crescent ethanol concentrations of 6%, 15% and 25%. After 120 days, the animals were sacrificed and the glands removed. The morphological analysis used was photo, caliper and digital caliper. It was also studied which method should be more effective to analyze gland alteration. The results indicated that chronic ethanol consumption caused macroscopic alterations in the submandibular glands. The digital caliper was the most effective instrument.

UNITERMS

Submandibular gland, alcohol, morphometry, analysis

REFERÊNCIAS

1. Banderas Ja, Gaitan, LA, Portilla J, Aguirre A. Effects of chronic ethanol consumption on the rat parotid gland. Arch Bras Biol 1992; 37: 69-72.
2. Bhaskar SL. Histologia e embriologia oral de Orban. 10 ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1989.
3. Dost P, Kaiser S. Ultrasonographic biometry in salivary glands. Ultrasound Med Biol 1997; 23 (9): 1299-303.
4. 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.
5. Ferreira AML, Piza IG, Fava-De-Moraes, F. Histological, morphometric and histochemical changes in the submandibular gland of the rat under experimental protein-calorie malnutrition. Jour Biol Buccale 1985; 13:45-53.
6. Gallego L, Mira A, Pou MN, Lambea R, Bernat G. La biometría y la informática, herramientas para la determinación de piezas anatómicas. Historia Natural '93. Jaca y Huesca 1995; 309-18.
7. Gómez de Ferraris ME, Carranza M, Ferraris R, Fili T. Variaciones estructurales en glándulas salivales de pacientes alcoholistas crónicos. Rev Fac Odontol 1991; 19/20 (1/2): 59-68.
8. Heo MS, Lee SC, Lee SS, Choi HM, Choi SC, Park TW. Quantitative analysis of normal major salivary glands using computed tomography. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001; 92 (2): 240-4.
9. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
10. Lieber CS. Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol. Alcohol Clin Exp Res 1991; 15(4): 573-92.
11. Scott J, Burns J, Flower EA. Histological analysis of parotid and submandibular glands in chronic alcohol abuse: a necropsy study. J Clin Pathol 1988; 41 (8): 837-40.
12. Teixeira VP, Pereira SAL, Rodrigues DBR, Lino RSJ, Oliveira FA, Castro ECC, et al. Princípios básicos e aplicações da Morfometria. Disponível em: <<http://www.mednet.com.br/instpub/paige/morfometria01.htm>> acesso em 2002.
13. 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 norvegicus*) submitted to experimental chronic alcoholism. Rev Chil Ana 2001; 19 (3).
14. Wichern DW, Johnson RA. Applied multivariate statistical analysis. 3 ed. New Jersey: Prentice Hall; 1992.
15. Yonetsu K, Yuasa K, Kanda S. Quantitative análisis of the submandibular gland using computed tomography. Dentomaxillofac Radiol 1996; 25 (2): 97-102.

Recebido em: 14/03/03

Aprovado em: 03/10/03

Endereço para correspondência
Fabiane Bortoluci da Silva
Rua Mário Gonzaga Junqueira, 255
17051-080 Bauru SP
fbortolucci@usc.br