

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA – RADIOLOGIA**

Marta Dexheimer

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DAS GLÂNDULAS
PARÓTIDAS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À RADIAÇÃO X AO LONGO
DO ENVELHECIMENTO**

Porto Alegre

2005

Marta Dexheimer

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DAS GLÂNDULAS
PARÓTIDAS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À RADIAÇÃO X AO LONGO
DO ENVELHECIMENTO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós - Graduação em Odontologia Clínica Radiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Heloísa Emília Dias da Silveira

Co-orientadora: Anna Christina Medeiros Fossati

Porto Alegre

2005

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por estar sempre ao meu lado em mais esta jornada.

À minha família, **Telmo, Ruth, Leila, Augusto** e os “enxertos” **Ricardo e Marília** que são os alicerces da minha vida, meus portos seguros.

Ao meu marido **Jorge Augusto**, pelo amor, pela paciência e ajuda incondicional.

À minha orientadora **Dra. Heloísa Emília Dias da Silveira**, pela oportunidade, pelo aprendizado e exemplo de profissionalismo.

À minha co-orientadora **Dra. Anna Christina Medeiros Fossati**, que contagia a todos com seu amor pela ciência. Obrigada por tudo que me ensinaste com muita paciência e dedicação.

Ao amigo e colega **Marcelo Lazzaron Lamers**, pelo pioneirismo, pelos ensinamentos, por toda a ajuda, em todos os momentos, mesmo a distância. Obrigada.

À minha amiga e colega **Nádia Assein Arús**, que como ela mesmo já sabe, foi minha mestre em várias ocasiões. Gostaria de te agradecer pelos momentos científicos e não tão científicos que compartilhamos, com certeza ficarão marcados para sempre.

Ao meu colega **Júlio César Córdoba Maciel**, excelente representante da radiologia gaúcha, que apesar do jeitão paternal, nunca deixou o moleque que tem dentro de si apagar.

Aos professores da disciplina **Profº Reni Raimundo Dalla-Bonna**, pela cedência dos animais, e ao **Profº Heraldo Luís Dias da Silveira**, pelos conselhos dados.

À professora **Dra. Dalva Maria Pereira Padilha**, pelas contribuições e pela disponibilidade em participar das discussões científicas quando nos deparávamos com dificuldades.

Ao colega e amigo **José Miguel Amenábar Céspedes**, esse caribenho que não mede esforços para ajudar ninguém. Não tenho palavras para agradecer por todas as dicas que deste a este trabalho, com toda a certeza foram de grande valor.

Ao colega e amigo **Rafael Dall Moro**, pelas várias contribuições estatisticamente significantes que fizestes.

Aos colegas **Gabriela Liedke, Maíra Cavaletti de Abreu, Rodrigo Martins e Rafael Lazzaron Lamers** pela ajuda prestada durante etapas importantes do experimento.

À colega **Letícia Mattuella** pelo auxílio nas etapas laboratoriais do estudo.

À **Isabel da Silva Lauxen**, do Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS, pela confecção das lâminas em PAS.

A **Cláudio Oliveira** pela ajuda nas lâminas em H/E.

À **Raquel Mattos de Oliveira**, do Laboratório de Envelhecimento Celular do IPB-PUCRS, pela maneira acolhedora como nos recebeu e pelos empréstimos prestados.

Às amigas **Anelise Bruxel** e **Anielle Schmidt** (quase Grafulha) que acompanharam de perto todo meu esforço.

Ao pessoal do CAB de Capão da Canoa, em especial, às amigas **Cleci Rosinei Reis** e **Ivone Clementina Cunha**.

RESUMO

A saliva, secreção produzida pelas glândulas salivares, é de vital importância à manutenção da saúde bucal. Com o avançar da idade, as glândulas salivares sofrem mudanças estruturais e funcionais. A exposição das mesmas, durante tomadas radiográficas de interesse odontológico, também pode gerar algum tipo de alteração. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi avaliar as alterações morfológicas e morfométricas das glândulas parótidas de camundongos submetidos à radiação X ao longo do envelhecimento. Para tanto, selecionou-se 20 animais que posteriormente foram divididos aleatoriamente em dois grupos, sendo um teste (10 animais) e outro controle (10 animais). Os camundongos do grupo teste foram expostos a 0,12Gy semanais durante 30 semanas, enquanto que os camundongos do grupo controle foram submetidos às mesmas condições, excetuando-se a exposição à radiação. Transcorridas as 30 semanas, os animais foram mortos, após a remoção das glândulas parótidas. Essas foram processadas, cortadas e coradas pela técnica histoquímica de H/E. Análises qualitativa e quantitativa foram realizadas para verificar a existência de possíveis diferenças entre as parótidas pertencentes aos animais do grupo teste em relação às mesmas do grupo controle. Através dos resultados obtidos, por meio da metodologia empregada neste estudo, concluiu-se que não houve alterações morfológicas e morfométricas substanciais nas glândulas parótidas de camundongos expostos à radiação X durante o envelhecimento.

Palavras-chave: radiação X, camundongos, glândula parótida, envelhecimento, morfologia.

ABSTRACT

The saliva, secretion produced by salivary glands, has the most important to oral health maintenance. In aging, the salivary glands have structural and functional changes. The exposition of the glands during radiographic exposure with odontologic interest also can make some kind of alteration. So, the aim of the present study was to evaluate the mice parotid glands morphologic and morphometric alterations proposed to X radiation, at the aging. For this, was selected 20 animals, which were have aleatory divided in two groups, one test (10 animals) and other control (10 animals). The mice test group were exposed to 0,12 Gy weekly during 30 weeks, while the mice control group were submitted to the same conditions, except to X radiation. Past 30 weeks, the animals were been killed after the displacement of the parotid glands. These were process, cut and colored by H/E histochemical technique. Qualitative and quantitative analisys were released to see the existence of possible differences between the parotids from the animals test group in relation to the same of control group. Through the obtained results, by the methodology used in this study, was concluded that there is no morphologic and morphometric essential alterations in the mice parotid glands that were exposed to X radiation during their aging.

Keywords: X radiation, mice, parotid gland, aging, morphology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Camundongo dentro da seringa, posicionado a uma distância foco-animal de 20 cm.....	36
Figura 2 - Contorno mais externo de ácinos e ductos realizados através do Programa Image-Pro® Plus Version 4.5 for Windows™ para definir a proporção parênquima/estroma.....	39
Figura 3 - Ductos intralobulares com aumento da luz de seus lúmens (setas pretas), degeneração hialina (setas verdes) e área em destaque com presença de células do processo inflamatório. (H/E). Aumento: 200X. Zoom digital: 2,3.....	44
Figura 4 - Magnificação da fotografia anterior, mostrando através da seta o aumento da luz ductal. (H/E). Aumento: 400X. Zoom digital: 2,3.....	44
Figura 5 – Presença de vacuolização citoplasmática em ácinos de parótida de camundongo irradiado. (H/E). Aumento: 400X. Zoom digital: 2,3.....	45
Figura 6 – Marcação PAS positiva em glândula parótida de camundongo de 36 semanas. Aumento: 200X. Zoom digital: 2,3.....	45
Figura 7 – Marcação para Sudam Black, mais evidente próximo aos núcleos e à membrana basal das células acinares. Aumento: 200X. Zoom digital: 2,3.....	45

Figura 8 – Parótida de camundongo exposto à radiação que apresenta degeneração hialina (setas verdes), aumento da luz dos ductos (setas amarelas) e presença marcante de células do processo inflamatório (setas pretas). (H/E). Aumento: 200X. Zoom digital: 2,3..... 46

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Peso inicial e final dos camundongos dos grupos teste e controle. Porto Alegre, 2005..... 41
- Gráfico 2** – Variação do ganho de peso dos animais do grupo teste em relação ao grupo controle. Porto Alegre, 2005..... 41

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Análise Histológica Descritiva das Glândulas Parótidas de Camundongos Expostos e Não Expostos á Radiação X durante o Envelhecimento. Porto Alegre, 2005.....47
- Quadro 2** – Análise Quantitativa da Relação Parênquima/Estroma em Glândulas Parótidas de Camundongos Expostos e Não Expostos à Radiação X durante o Envelhecimento. Porto Alegre, 2005.....48

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Å – Angström

Cl⁻ - íon cloro

cm – centímetro

DNA – ácido desoxirribonucléico

FEPPS – Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Estado do Rio Grande do Sul.

g – grama

Gy – Gray

H/E – hematoxilina e eosina

IgA – imunoglobulina A

K⁺ - íon potássio

kg - quilograma

kVp – quilovoltagem

mA – miliamperagem

MEC – matriz extracelular

ml – mililitro

Na⁺ - íon sódio

O.C.T. - Optimal Cutting Temperature

PAS – ácido periódico de Schiff

pH – potencial de hidrogênio

R – Röntgen

rad – radiation absorbed dose (quantidade de radiação absorvida pelos tecidos irradiados)

µm – micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 GLÂNDULAS SALIVARES.....	17
2.1.1 Generalidades.....	17
2.1.2 Parênquima Glandular.....	19
2.1.3 Estroma Glandular.....	21
2.1.4 Glândula Parótida.....	22
2.1.5 Glândulas Salivares e Envelhecimento.....	23
2.1.5.1 Alterações das Glândulas Salivares Humanas com a Idade.....	24
2.1.5.2 Alterações das Glândulas Salivares em Animais com a Idade.....	25
2.2 RADIAÇÃO X.....	26
2.3 EFEITO BIOLÓGICO DA RADIAÇÃO X.....	27
2.4 EFEITO BIOLÓGICO DA RADIAÇÃO X EM GLÂNDULAS SALIVARES DE MODELOS ANIMAIS.....	29
3. OBJETIVOS.....	34
3.1 OBJETIVO GERAL.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4. MATERIAIS E METÓDOS.....	35
4.1 Descrição da Amostra.....	35
4.2 Procedimentos Experimentais.....	35
4.3 Análise Qualitativa.....	37
4.3.1 Presença ou ausência de infiltrado inflamatório	37
4.3.2 Presença ou ausência de vacuolização	37
4.3.3 Presença ou ausência de degeneração hialina.....	37
4.4 Análise Quantitativa.....	38
4.5 Análise Estatística.....	40
4.6 Considerações Éticas.....	40
5. RESULTADOS.....	41
5.1 Peso dos Animais.....	41
5.2 Análise Qualitativa.....	42
5.3 Análise Quantitativa.....	48
6. DISCUSSÃO.....	49

7. CONCLUSÕES.....	54
REFÊRENCIAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

As glândulas salivares são glândulas exócrinas, fazem parte do trato digestivo, e sua função é a produção da saliva. A saliva tem importância vital para a manutenção da saúde bucal, uma vez que é a responsável pela proteção da cavidade bucal através da lubrificação, formação de película adquirida e manutenção de um pH adequado. Essa também tem relação com o crescimento e a maturação dos corpúsculos gustativos, devido à presença da proteína gustina. Possui, ainda, ação antimicrobiana por meio das enzimas lisozima e lactoferrina, além da presença da imunoglobulina IgA. Auxilia na maturação do esmalte dentário pela difusão de íons durante a fase pós-eruptiva. Por fim, está relacionada com a reparação tecidual, pois contém o fator de crescimento epidérmico (AVERY, 2001; TEN CATE, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Dentre as glândulas salivares maiores, a parótida contribui com 25% da secreção salivar. Está situada extra-oralmente, sua secreção é do tipo serosa e seu parênquima funcional é formado por uma rede bem estabelecida de ductos e estruturas secretórias do tipo acinar (KATCHBURIAN; ARANA, 1999; TEN CATE, 2001).

São largamente demonstrados pela literatura, os efeitos maléficos que a exposição aos raios X determinam no metabolismo celular (PRO RAD.,1998; PASLER; 1999; LANGLAND; LANGLAIS, 2002; WHAITES, 2003).

Em um exame radiográfico panorâmico, a glândula parótida recebe a maior dose de radiação quando comparada com as demais glândulas salivares maiores (UNDERHILL et al., 1988). A parótida é tida também como a glândula mais radiosensível, dentre as glândulas salivares maiores (CHERRY; GLUCKSMANN, 1959; ITO, 1964; VISSINK et al., 1990; NAGLER; BAUM; FOX, 1993 e 1996; COPPEES et al., 1997). Preston- Martin; White (1990) constataram que 15% dos casos de câncer de parótida foram atribuídos à exposição aos raios

X com finalidade de diagnóstico, sendo que desses, 85% provinham de radiografias dentais. White (1992) também observou associação entre tumores de glândulas salivares e radiografias odontológicas, constatando relação entre indivíduos que receberam doses cumulativas de 0,5 Gy ou mais na parótida e o aparecimento de tumores na mesma.

A aplicação de raios X na Odontologia é bastante difundida, a ponto de ser responsável por 20% do número total de exames radiográficos realizados no Brasil (YANCOVENCO, 2001).

Sabendo-se que existem vários fatores que podem alterar o fluxo e a produção salivar, dentre eles o envelhecimento, o uso de alguns tipos de medicamentos, o alcoolismo, a diabetes, e a exposição a tratamentos radioterápicos (RAJAKUMAR; KOLLER; SCARPACE, 1992; FIELD; SCOTT, 1993; LIMA et al., 2001; CARDA et al., 2005) buscou-se investigar o efeito morfológico e morfométrico de doses baixas e crônicas de radiação X, em glândulas parótidas de camundongos durante o envelhecimento.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 GLÂNDULAS SALIVARES

2.1.1 Generalidades

A saliva, imprescindível para a manutenção da saúde bucal, é constituída basicamente pela secreção das glândulas salivares, células orais descamadas, leucócitos, microorganismos e seus produtos, fluido do sulco gengival e restos alimentares. As glândulas salivares podem ser classificadas conforme seu tamanho em maiores e menores. Há três pares de glândulas salivares maiores – parótida, submandibular e sublingual – responsáveis por 85% a 90% da secreção salivar. O restante da saliva é produzido pelas glândulas salivares menores que são aproximadamente em número de 1000, dispersas pela cavidade bucal (BHASKAR, 1989; AVERY, 2001; TEN CATE, 2001).

A saliva é importante, pois contém glicoproteínas que promovem a lubrificação das mucosas, protegendo-as contra injúrias químicas, térmicas e mecânicas. Inicia a digestão de carboidratos e lipídios através das enzimas amilase e lipase lingual, produzidas pelas glândulas parótidas e linguais serosas, respectivamente. Também é responsável pela presença na cavidade bucal de IgA, lisozima e lactoferrina, importantes barreiras de ação antimicrobianas. Auxilia na integridade dos dentes através da formação da película adquirida, tamponamento e limpeza mecânica das superfícies. Por fim, parece ser coadjuvante na reparação tecidual devido à presença do fator de crescimento epidérmico (EGF) (THESLEFF et al., 1988; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

As glândulas salivares apresentam heterogeneidade muito acentuada quando comparadas na escala animal. Estão ausentes nos peixes, primitivas nos anfíbios, organizam-se nos répteis e atingem a maior diferenciação nos mamíferos (FAVA-DE-MORAIS, 1969).

O desenvolvimento de todas as glândulas salivares é semelhante. A parótida humana tem o início de sua formação entre a quarta e a sexta semana de vida intra-uterina com a proliferação de cordões epiteliais que penetram no ectomesênquima adjacente, ramificando-se e originando cordões sólidos. Esses desenvolvem uma luz em seu interior dando origem aos ductos e, posteriormente, às porções secretoras terminais. Para uma contínua proliferação dos cordões epiteliais é indispensável a presença de filamentos de actina, colágeno tipo I, III e IV, laminina e proteoglicanas no tecido ectomesenquimático (HARDMAN; SPOONER, 1992; KATCHBURIAN; ARANA, 1999).

A maturação das glândulas salivares maiores difere quando comparada entre humanos e animais. Nos humanos, desenvolvem-se extensamente durante os estágios embrionários, estando completamente funcional ao nascimento. Em animais, este desenvolvimento ocorre basicamente após o nascimento. A maturação da glândula parótida de um rato, por exemplo, dá-se dentro das duas primeiras semanas de vida (BURFORD-MASON; NORBERG; DARDICK, 1996).

As glândulas salivares são formadas de elementos parenquimatosos sustentados por tecido conjuntivo. A estrutura do parênquima deriva do ectoderma e é constituída por unidades secretoras terminais (acinares, tubulares ou mistas) e por um sistema de ductos (intercalares, estriados e excretoras terminais). O tecido conjuntivo, que forma o estroma glandular, serve para dar sustentação ao parênquima, além de conter vasos sanguíneos e nervos. Esse forma uma cápsula em torno das glândulas salivares maiores, dividindo grupos de unidades secretoras e ductos em lóbulos e lobos. O estroma é formado por células típicas de um tecido conjuntivo frouxo, ou seja, fibroblastos, macrófagos, mastócitos, alguns leucócitos e plasmócitos; matriz celular (fibras colágenas tipo I) e substância fundamental (proteoglicanas e glicoproteínas) (KATCHBURIAN; ARANA, 1999; TEN CATE, 2001).

2.1.2 Parênquima glandular

O parênquima glandular é frequentemente comparado a um cacho de uvas, onde as unidades secretoras terminais são as uvas e os ductos, os caules. As unidades secretoras possuem grande diversidade quanto ao tamanho, à forma e à quantidade de células. Podem ser constituídas por células serosas, mucosas ou, na presença de semiluas, por ambas. Em cortes histológicos costumam aparecer como estruturas circulares, tubulares e polígonos multilobados. Normalmente as células serosas aparecem sob a forma circular, formando ácinos, enquanto que as células mucosas tendem a se arranjar em forma de túbulos. A unidade secretora terminal possui também um outro tipo de célula, as mioepiteliais que, embora não tenham função secretora, estão presentes nesta estrutura (MARTINEZ-MADRIGAL; MICHEAU, 1989; KATCHBURIAN; ARANA, 1999; BERKOVITZ, 2004).

As células serosas são especializadas na síntese, no armazenamento e na secreção de proteínas. Alguns autores não as consideram serosas puras, pois, além da produção de proteínas, há uma glicosilação dos aminoácidos, tornando-as seromucosas. Essas células têm forma piramidal com seu ápice voltado para o lúmen, possuem núcleo esférico localizado no terço basal e coram-se intensamente pela hematoxilina, dando-lhe uma característica basófila (BHASKAR, 1989; TANDLER; PHILLIPS, 1993; KATCHBURIAN; ARANA, 1999; AVERY, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

As células mucosas exibem características de células secretoras de muco, contendo glicoproteínas importantes para a função de lubrificação. Essas podem assumir aspectos distintos conforme o estágio de seu ciclo funcional. Apresentam-se com formato cilíndrico ou piramidal e com núcleo achatado ou esférico contra a periferia da célula (TANDLER, 1993; TEN CATE, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Um terceiro tipo celular encontrado nas glândulas salivares são as células mioepiteliais. Essas se encontram interpostas entre a lâmina basal e a membrana plasmática

das unidades secretoras terminais e dos ductos intercalares. Seu citoplasma assemelha-se ao das células musculares lisas, contendo numerosos filamentos de actina e miosina, assim como corpos densos. Possuem função contrátil, auxiliando no esvaziamento das secreções (MARTINEZ-MADRIGAL; MICHEAU, 1989; KATCHBURIAN; ARANA, 1999).

No sistema de ductos, as terminações secretoras se continuam com os ductos intercalares que se unem para formar os ductos estriados. Ambos são ductos intralobulares, devido à sua localização. Os ductos estriados convergem para ductos maiores localizados nos septos de tecido conjuntivo, onde se tornam ductos extralobulares ou excretores terminais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Este sistema bem definido de ductos, além de conduzir a saliva à cavidade bucal, tem a importante função de modificar seu teor iônico, tornando-o hipotônico em relação ao fluido sanguíneo. Esta modulação ocorre principalmente nos ductos estriados e terminais. Os ductos intercalares possuem o encargo da condução do fluido, além do importante papel de reservatório de células tronco. (AVERY, 2001; BERKOVITZ, 2004).

Os ductos intercalares são os menores ductos do sistema, sendo os mais próximos, às unidades secretoras, constituindo-se desta forma a continuação do lúmen. Apresentam revestimento epitelial formado por uma única camada de células cúbicas baixas, núcleo central e citoplasma escasso. Os ductos intercalares são mais proeminentes em glândulas salivares com secreção serosa sendo, portanto, mais freqüentes na parótida. Através da técnica da imunofluorescência, foi constatada a presença de lisozima e lactoferrina, importantes enzimas antibacterianas, no citoplasma das células destes ductos (KATCHBURIAN; ARANA, 1999; TEN CATE, 2001).

Os ductos estriados são revestidos por células colunares com núcleo central e citoplasma que se cora intensamente com eosina dando-lhe uma característica extremamente acidófila. Ao microscópio eletrônico de transmissão, observam-se numerosas invaginações

profundas da membrana plasmática juntamente com mitocôndrias de grande tamanho, características de células envolvidas na função de transporte ativo. Numerosos vasos sanguíneos de pequeno calibre encontram-se adjacentes aos ductos estriados, estando relacionados às trocas iônicas da secreção que passa por sua luz. A secreção proveniente dos ductos intercalares é isotônica em relação ao plasma sanguíneo, com alta concentração de Na^+ e Cl^- e baixa concentração de K^+ . Após passar pelos ductos estriados, a saliva torna-se hipotônica, com baixa concentração de Na^+ e Cl^- e alta concentração de K^+ . Os ductos excretórios têm a estrutura modificada conforme se aproximam de sua abertura para a cavidade bucal. Apresentam primeiramente células pseudo-estratificadas alternadas com basais pequenas. Ao chegarem ao estroma, na porção interlobular, o epitélio torna-se estratificado alternando com células caliciformes que acrescentam conteúdo mucoso à saliva (MARTINEZ-MADRIGAL; MICHEAU, 1989; ROSS; REITH; ROMRELL, 1993; KATCHBURIAN; ARANA, 1999).

2.1.3 Estroma Glandular

O estroma das glândulas salivares é constituído pelo mesmo tipo de células dos tecidos conjuntivos do organismo. Além de dar sustentação ao parênquima, dá passagem a vasos sanguíneos e nervos. Desempenha, ainda, importante papel na interação constante com o epitélio (KATCHBURIAN; ARANA, 1999; TEN CATE, 2001; MOROTOMI et al., 2005).

O suprimento sanguíneo é dado por uma ou mais artérias que, ao entrarem na glândula, ramificam-se formando inúmeros capilares. Esses percorrem a glândula no sentido inverso dos ductos. A maior concentração de capilares aparece nos ductos estriados responsáveis pelas trocas iônicas. O retorno venoso é realizado por vênulas e veias que drenam diretamente para a periferia da glândula (KATCHBURIAN; ARANA, 1999; TEN CATE, 2001).

A inervação das glândulas salivares é feita por nervos secretores motores pós-ganglionares de ambas as fontes do sistema nervoso autônomo (simpático e parassimpático). O estímulo parassimpático normalmente produz uma secreção abundante de saliva aquosa, ao passo que o simpático produz uma saliva mais viscosa, rica em material orgânico. Os nervos que penetram nas glândulas salivares seguem os vasos sanguíneos e ramificam-se em feixes menores até formarem um feixe final adjacente ao parênquima. Além da regulação nervosa, alguns hormônios, tais como: estrógenos, glicocorticóides e peptídicos, também podem exercer controle sobre a função glandular (BHASKAR, 1989; KATCHBURIAN; ARANA, 1999; TEN CATE, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

2.1.4 Glândula Parótida

A parótida, maior glândula em volume dentre as glândulas salivares maiores, contribui somente com 25% do total da saliva. Localiza-se anterior ao meato acústico externo, abaixo do arco zigomático e látero-posteriormente ao ramo da mandíbula e ao músculo masséter. Seu ducto excretor terminal encontra-se na cavidade bucal na altura do segundo molar superior e denomina-se ducto de Stenon. O suprimento sanguíneo desta glândula é feito pela artéria carótida externa enquanto que o retorno venoso dá-se por meio de veias que confluem à jugular externa. A inervação ocorre através do nervo aurículo temporal e do plexo simpático da carótida externa (KATCHBURIAN; ARANA, 1999; AVERY, 2001).

No estudo de Fava-de-Morais (1969), foi observada a presença de dois tipos de adenômeros nas glândulas parótidas de roedores, sendo um constituído por células serosas e outro, por seromucosas. Também foi constatado, neste mesmo estudo, que 84% do parênquima é constituído por células serosas ou seromucosas fazendo assim com que os ductos perfaçam uma parte minoritária desta estrutura glandular.

Também em humanos, as unidades secretoras terminais da parótida são basicamente do tipo ácino, constituídas por células serosas ou seromucosas (TEN CATE, 2001).

A parótida é constituída por ácinos de forma piramidal, com núcleos esféricos localizados na região basal. A porção basal do citoplasma cora-se intensamente por apresentar característica basófila e, em alguns cortes, pode ser observada a presença de grânulos de secreção. Além de secretar proteínas e pequena quantidade de carboidratos, a parótida também contém grânulos de zimogênio, precursores da enzima amilase. Os ductos intercalares são extensos e numerosos, razão pela qual aparecem em grande quantidade, quando examinados pela microscopia de luz. Os ductos estriados também se apresentam bem desenvolvidos. O estroma contém alguns acúmulos de tecido adiposo em seu interior, que aumentam com o passar da idade (MARTINEZ-MADRIGAL; MICHEAU, 1989; KATCHBURIAN; ARANA, 1999; AVERY, 2001).

Takada, Aiyama e Ikeda (2001), trabalhando com parótidas de ratos, observaram uma modificação no fenótipo glandular durante o desenvolvimento desses animais. Eles constataram que células mucosas observadas precocemente na vida pós-natal eram quase que totalmente convertidas em células serosas ao longo do envelhecimento.

2.1.5 Glândulas Salivares e Envelhecimento

Todos os tecidos e órgãos do corpo sofrem mudanças com a idade, alguns mais expressivamente que outros. As glândulas salivares não são exceção e também sofrem complexas alterações estruturais com o passar da idade. A natureza e a extensão dessas mudanças têm variações e não consistem em regras gerais para todos os tipos de glândulas, nem para todos os tipos de espécies (FIELD; SCOTT, 1993).

2.1.5.1 Alterações das Glândulas Salivares Humanas com a Idade

Quando comparadas as glândulas salivares maiores de pessoas jovens e senis, pode-se observar uma progressiva disparidade no tamanho e na forma dos lóbulos. Com o aumento da idade, há evidências de atrofia acinar e aumento na quantidade de tecido adiposo e conjuntivo envolvendo a glândula. Os ductos apresentam-se dilatados e hiperplásicos, devido à presença de gordura, de células de tecido conjuntivo e inflamatórias em seu interior (WHATERHOUSE et al., 1973; SCOTT, 1976; SCOTT, 1977; KURASHIMA; HIROWAKA, 1986; MARTINEZ-MADRIGAL; MICHEAU, 1989).

Conforme o estudo de Scott (1977), pode-se observar dois tipos básicos de inflamações crônicas focais advindas com a idade. A primeira denominada adenite obstrutiva focal que apresenta alteração e/ou perda de ácinos, dilatação ou hiperplasia dos ductos, fibrose e infiltrado de células inflamatórias crônicas. A localização preferencial dessas alterações dá-se com mais frequência na periferia dos lóbulos. O outro tipo de inflamação crônica por ele descrita é a adenite linfocítica focal que se caracteriza pela coleção de linfócitos e histiócitos junto ao tecido conjuntivo principalmente circundando ductos intra e extralobulares e vasos.

As alterações estruturais das glândulas parótidas humanas relacionadas à idade são menos evidentes quando comparadas às submandibulares, principalmente no que diz respeito à perda de parênquima funcional, que é menos severo, e na quantidade de tecido adiposo. A parótida é uma glândula que apresenta adipócitos em todas as idades com larga variação de intensidade entre sujeitos da mesma faixa etária e entre diferentes lóbulos da mesma glândula. A simples presença de extensiva quantidade de tecido adiposo intralobular na parótida, não pode ser considerada como diagnóstico de desordem sistêmica. O parênquima apresenta ácinos desiguais em tamanho, forma, densidade e capacidade de coloração. A atrofia acinar parece ser mais marcante a partir da sétima década de vida, com aparente encolhimento e degranulação dos ácinos. Assim como as demais glândulas salivares maiores, a parótida

apresenta um aumento na quantidade de oncócitos, tecido conjuntivo e adiposo com o aumento da idade. Adipócitos primeiramente acumulados junto aos septos de tecido conjuntivo passam a espalhar-se para o parênquima. Aumento de tecido linfóide também é observado. Alguns estudos relatam ainda a presença de grânulos de lipofucsina localizados em células acinares e em algumas células ductais (WATERHOUSE et al., 1973; SCOTT, 1976 e 1977; KURASHIMA; HIROWAKA, 1986; FIELD; SCOTT, 1993). Conforme Waterhouse et al. (1973), esses grânulos aparecem com a idade e representam o produto final do metabolismo acumulado dos lisossomos.

2.1.5.2 Alterações das Glândulas Salivares em Animais com a Idade

Observações em animais de laboratório, como ratos e camundongos, sugerem que as mudanças histológicas relacionando a idade com as glândulas salivares são menos acentuadas nesses quando comparados a humanos. A maioria dos estudos relata basicamente mudanças degenerativas do parênquima funcional seguidas pelo aumento da quantidade de tecido conjuntivo, adiposo e infiltrado inflamatório (BAUM; KUYATT, 1981; WOLFF et al., 1991; FIELD; SCOTT, 1993; KIM; ALLEN, 1994; BODNER; GORSKY, 1995; INQUE et al., 2003; MAHAY, 2004).

Mudanças ultra-estruturais também foram observadas nestes animais. No citoplasma de células acinares de ratos senis, constatou-se a presença de anormalidades de tamanho, na forma e na distribuição de mitocôndrias, alterações no complexo de Golgi e redução do retículo endoplasmático (FIELD; SCOTT, 1993).

Segundo Kim (1981), Kim; Calkins (1983), Kim; Arisumi (1985), Kim; Allen (1994), o nível celular de proteínas secretoras, bem como a capacidade das células acinares de sintetizar proteínas, decresce com o aumento da idade em glândulas parótidas de ratos.

Da mesma forma, Baum; Kuyatt (1981), observando diferenças entre glândulas submandibulares de animais jovens e velhos, constataram a presença de uma coloração com o ácido periódico de Schiff (PAS) mais intensa nos primeiros.

2.2 RADIAÇÃO X

Os raios X foram descobertos em 1895, no Instituto de Física da Universidade de Würzburg, ao sul da Alemanha, por Wilhelm Conrad Röntgen. Apenas vinte dias após o anúncio da descoberta, Otto Walkhoff, dentista alemão, fez a primeira radiografia dental usando sua própria boca com um tempo de exposição de 25 minutos (ALVARES; TAVANO, 1998; WHAITES, 2003; FREITAS; ROSA; SOUZA, 2004).

Radiação é a propagação de energia através do espaço, da matéria ou do vácuo. Pode ser dividida categoricamente em corpuscular ou eletromagnética. A radiação eletromagnética, da qual os raios X fazem parte, é um tipo de energia que se transmite por meio de uma combinação entre campo elétrico e campo magnético, com ausência de massa, sendo, em última análise, a transferência de energia de um ponto a outro. A radiação X pode ser definida como uma radiação emitida pelo frenamento de elétrons e pela sua transição a níveis mais internos dos átomos. Os raios X são ondas eletromagnéticas semelhantes às ondas luminosas, diferindo destas apenas pelo seu comprimento que varia entre 0,1 a 0,5 Å. Esses apresentam algumas propriedades constantes que são: tornar fluorescentes numerosas substâncias, impressionar chapas fotográficas, propagar-se em linha reta com velocidade igual à da luz e provocar a ionização de gases. Sobre as células vivas, os raios X exercem ação ora benéfica, ora maléfica, segundo a sua intensidade, a sua duração e o tipo de tecido por eles atingido (ALVARES; TAVANO, 1998).

2.3 EFEITO BIOLÓGICO DA RADIAÇÃO X

Os efeitos biológicos deletérios das radiações ionizantes são classificados em dois tipos: estocásticos e determinísticos. Os determinísticos se referem à morte celular. Exigem um limiar de dose mínimo para ocorrer e seu grau de dano torna-se maior com o aumento da dose. Exemplos desse tipo de efeito são os eritemas, as epilações, a opacificação do cristalino e o aparecimento de catarata. Efeitos estocásticos dizem respeito a modificações celulares. São aqueles que independem de um limiar de dose para acontecer, sendo que sua gravidade não está relacionada com a dose. Inclui-se neste tipo as mutações genéticas e as induções tumorais. O mecanismo pelo qual estes efeitos deletérios ocorrem podem ser de forma direta, quando atingem diretamente estruturas biológicas vitais, como o DNA, ou indireta, através da formação de radicais livres advindos da quebra de moléculas de água (PORTARIA 453, 1998; WHAITES, 2003).

Bergonié e Trinbondeu em 1906 apud Freitas; Rosa; Souza (2004), avaliando o efeito das radiações em ratos, observaram que a irradiação atinge mais intensamente as células menos diferenciadas e em maior atividade reprodutiva, ou seja, a radiosensibilidade celular é diretamente proporcional à atividade mitótica da célula e inversamente proporcional ao seu grau de diferenciação. Mais tarde, em 1967, Sasaki, trabalhando com camundongos, constatou o mesmo efeito e assinalou que o metabolismo e a vascularização do tecido ou órgão também influem na radiosensibilidade.

Conforme a classificação de Ellinger, as células mais sensíveis à radiação seriam as do tecido hematopoético, seguidas pelas epiteliais, endoteliais, do tecido conjuntivo, ósseo, nervoso e, por fim, como menos sensíveis, as musculares (FREITAS; ROSA; SOUZA, 2004).

A quantidade de radiação absorvida pelos tecidos é medida em Gray (Gy), que representa a absorção de um Joule/kg. As doses de radiações podem ser agudas, quando forem grandes e aplicadas num curto espaço de tempo, ou crônicas, quando pequenas quantidades

são distribuídas num espaço de tempo longo (PORTARIA 453, 1998; PASLER, 1999; LANGLAND; LANGLAIS, 2002).

Danforth; Gibbs (1980) classificaram os efeitos biológicos deletérios das radiações em genéticos, embrionários-fetais e carcinogênicos. Segundo eles, a dosagem de radiação que atinge as gônadas durante exames radiográficos dentais é tão baixa que a probabilidade de causar danos genéticos e embrionários-fetais é praticamente nula. Sendo assim, a maior preocupação para radiologia odontológica é possivelmente o efeito carcinogênico. Dentre os órgãos de maior risco para radiografia dentária consideram a tireóide, a medula óssea, o cérebro e as glândulas salivares.

Underhill et al. (1988) consideraram tecidos moles, ossos, medula óssea, e tireóide como órgãos críticos para radiologia odontológica. Concordaram com os autores acima referidos quanto a possíveis efeitos carcinogênicos das radiações, citando inclusive o levantamento periapical completo com colimador redondo como sendo o exame de maior risco. Conforme esses autores, dentre as glândulas salivares maiores, a parótida recebe a maior dose de radiação quando comparada com as demais, durante um exame panorâmico.

Preston-Martin; White (1990), em estudos epidemiológicos realizados em Los Angeles (USA), observaram relação entre o aparecimento de tumores malignos em parótida e exposição à radiação durante exames radiográficos para diagnóstico. Em 15% dos casos de câncer de parótida atribuídos à exposição para diagnóstico, 85% provinham de radiografias dentais.

White (1992) também observou associação entre tumores de glândulas salivares e radiografias odontológicas, constatando relação entre indivíduos que receberam doses cumulativas de 0,5Gy ou mais na parótida e o aparecimento de tumores na mesma.

Segundo Langland; Langlais (2002), o tipo de radiação usado para produzir radiografias odontológicas é esparsamente ionizante e essa tem menor efeito biológico quando

comparado às radiações densamente ionizantes (partículas alfa). Esses autores consideram o cristalino, as gônadas, o feto, a medula óssea, as glândulas tireóide e salivares, a pele e os ossos como órgãos críticos para tomadas radiográficas dentárias.

2.4 EFEITO BIOLÓGICO DA RADIAÇÃO X EM GLÂNDULAS SALIVARES DE MODELOS ANIMAIS

A quase totalidade dos estudos que analisaram os efeitos adversos da radiação X em glândulas salivares maiores foi realizada em animais, especificamente em ratos ou camundongos, e empregaram para isso doses agudas semelhantes àquelas usadas em radioterapia de cabeça e pescoço (CHERRY; GLUCKSMANN, 1959; ITO, 1967; PHILLIPS; TEX, 1970; SODICOFF et al., 1977; SASAKI; YAMAMOTO; TAKEDA, 1980; RICE et al., 1982; BODNER et al., 1984; VISSINK et al., 1990; VISSINK et al., 1991; KOHN et al., 1992; ROSSIE, 1993; NAGLER; BAUM; FOX, 1993 e 1996; COPPES et al., 1997; GUSTAFSSON et al. 1998; ROESINK et al., 1999; PELISSER, 2005).

O estudo do efeito de doses idênticas, porém recebidas de formas diferentes, única e fracionada, mostrou que os danos da radiação são mais intensos quando usadas doses agudas (ITO, 1967; SODICOFF et al., 1977).

Conforme Vissink et al. (1990), as mudanças induzidas pela radiação nas glândulas salivares maiores dependem da dose e do tempo transcorrido após a exposição.

Vários experimentos concordaram em considerar a parótida como a mais radiosensível dentre as glândulas salivares maiores (CHERRY; GLUCKSMANN, 1959; ITO, 1967; VISSINK et al., 1990; NAGLER; BAUM; FOX, 1993 e 1996; COPPES et al., 1997).

Segundo Nagler; Baum; Fox (1993 e 1996), a submandibular é mais radiorresistente quando comparada à parótida em períodos precoces. Nos experimentos por eles realizados,

puderam observar que, três dias após doses de 15Gy, a parótida teve sua função limitada, após 14 dias, teve seu fluxo salivar diminuído, enquanto que a submandibular continuava normal. No entanto, passados 40 dias das irradiações, ambas as glândulas apresentavam hipofunções semelhantes.

Existem hipóteses que tentam explicar o porquê da parótida ser a glândula mais radiosensível, porém até o momento não há nada comprovado definitivamente. Conforme Vissink et al. (1990) e Rossie (1993), a parótida é mais afetada porque suas células serosas são mais sensíveis. Glicoproteínas mucosas poderiam promover algum tipo de proteção à submandibular. Outra hipótese sugere serem os grânulos secretores responsáveis pelo aumento da radiosensibilidade das células serosas, visto que o decréscimo desses acarretaria menos danos induzidos pela radiação. Metais pesados presentes nestes grânulos poderiam contribuir para a patogenia induzida pela radiação devido à catalisação oxidativa de lipídios (ABOK et al., 1984 apud ROSSIE, 1993). Esta hipótese foi contestada por Coppes et al. em 1997, quando os autores realizaram a depleção dos grânulos das células serosas e verificaram em seu experimento, ser infundada esta suposição. Observaram que os grânulos secretores não determinavam a radiosensibilidade das glândulas salivares.

A primeira injúria observada, após doses agudas de radiação, é o decréscimo do peso dos animais (ITO, 1967; SODICOFF et al., 1977; RICE et al., 1982; BODNER et al., 1984; KOHN et al., 1992; NAGLER; BAUM; FOX 1993 e 1996, PELISSER, 2005).

Conforme Phillips; Tex (1970), as mudanças que podem ser observadas em glândulas parótidas devido à radiação são divididas em três fases. A primeira onde ocorrem alterações de funções associadas com aguda atrofia e necrose. A segunda ou também chamada fase reparativa onde há um retorno das funções e das estruturas próximas ao normal. E a terceira e última fase em que ocorrem perdas severas de função e atrofia.

As alterações morfológicas não ocorrem da mesma forma em todas as partes da glândula. Mudanças degenerativas no parênquima são as primeiras a serem observadas, sendo seus efeitos mais marcados nos ácinos e nos ductos estriados. Os ductos extralobulares praticamente não são atingidos (ITO, 1967).

Rice et al. (1982), após exposição de ratos a 1800R, observaram que a proporção ácino/ducto pareceu variar em função da diminuição do primeiro em relação à permanência do segundo.

Gustafsson et al. (1998) observaram o efeito de doses de radiação X fracionadas e constataram, passados 180 dias, uma perda acinar detectável. Conforme esses autores, os ácinos foram substituídos por ductos menores e por estroma fibroso. Os ácinos que permaneciam apresentavam-se dilatados e desorganizados, ou seja, com perda da estrutura normal.

No estudo de Cherry; Glucksmann (1959), analisando o efeito de doses de radiação X em glândulas salivares de ratos, constataram que, na dose de 2400R, a parótida apresentava picnoses e cromatólises dos núcleos e degeneração albuminosa do citoplasma de suas células acinares. Os ductos mostravam-se relativamente não afetados. Doses de 3000R ou mais demonstraram, nos três primeiros meses, predomínio de mudanças degenerativas. Os ácinos da parótida apresentavam extensiva degeneração nuclear (núcleos picnóticos) seguido pela perda de suas células. Os citoplasmas das células acinares apresentavam-se alguns vacuolizados, enquanto outros estavam hialinizados devido à confluência de grânulos secretores. Após sete ou mais meses, somente alguns poucos ácinos persistiam e a glândula parecia largamente composta de tecido fibroso denso e com algumas alterações nos ductos intercalares. Mudanças nesses ductos parecem ser posterior ao efeito da radiação nos ácinos. Também pareceu haver perda dos grânulos PAS positivos das células da parótida.

As principais injúrias histológicas observadas por Ito (1967) incluíam núcleos picnóticos, atrofia das células acinares (degeneração e desaparecimento de ácidos), decréscimo do número de grânulos, vacuolização das células e aumento de tecido fibroso.

O estudo de Sasaki (1967), realizado em camundongos, constatou que os danos latentes da radiação em células de glândulas salivares persistem até 90 dias após dose de 1000rad. Esses efeitos são manifestados apenas quando as células estão estimuladas na síntese de DNA e/ou em divisão celular.

Phillips; Tex (1970) analisaram o efeito de 1160rad em parótidas de ratos e, observaram dentre as alterações morfológicas decréscimo do tamanho (atrofia), necrose das células acinares e mudanças degenerativas nucleares. Nos ductos constataram metaplasia das células, passando de cubóides a estratificadas, além da dilatação do lúmen dos mesmos.

Kasbourn (1953) e Garrett (1962) apud Watherhouse et al. (1973) relatam um aparente aumento de tecido adiposo em glândulas salivares após as mesmas sofrerem exposição à radiação.

Após dose única de 2000R em ratos, Bodner et al. (1984) observaram vacúolos autofágicos de vários tamanhos, células acinares necróticas, núcleos fragmentados e picnóticos. Macrófagos foram vistos no estroma e até ocasionalmente no parênquima.

Conforme Rossie (1993) em seu estudo, os lóbulos das glândulas salivares tornaram-se atróficos com interposição de tecido fibroso devido à radiação. Observou ainda que, nas células serosas, houve formação de vacúolos, degranulação e necrose. Mais posteriormente ocorreu perda de ácidos. Os ductos apresentavam dilatação de seus lúmens e suas células pareciam sofrer metaplasia. Células inflamatórias eventualmente infiltravam-se no parênquima glandular.

Carda et al. (2005) observaram, comparando diferenças estruturais de glândulas parótidas com sialose de pacientes diabéticos e alcoolistas crônicos que, nos primeiros, havia a presença de vacuolização das células acinares contendo abundante inclusões lipídicas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi analisar as alterações microscópicas morfológicas e morfométricas das glândulas parótidas de camundongos, submetidos à radiação X, durante o envelhecimento.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Fazer uma análise descritiva qualitativa das alterações morfológicas, quanto à presença ou ausência de infiltrado inflamatório, vacuolização e degeneração hialina, além dos aspectos dos ácinos e ductos, presentes em glândulas parótidas de camundongos submetidos à radiação X durante o envelhecimento e compará-las com as alterações do grupo não exposto (controle).

3.2.2. Avaliar quantitativamente a relação parênquima/estroma das glândulas parótidas de camundongos submetidos à radiação X durante o envelhecimento e compará-la com a relação existente no grupo não exposto (controle).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi experimental em animais, controlado, cego, randomizado e em paralelo.

4.1 Descrição da Amostra

Para a realização deste trabalho, foram utilizados vinte camundongos machos suíços albinos da linhagem CF1, livres de qualquer patologia, com seis semanas de vida no início do experimento.

Os animais foram obtidos e confinados junto ao biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Estado do Rio Grande do Sul (FEPPS), em condições controladas de iluminação (doze horas de luz / doze horas de escuridão), sob temperatura de aproximadamente 20°C, recebendo dieta composta por ração da marca NUVILAB CR1 e água destilada (*ad libitum*).

4.2 Procedimentos Experimentais

Os camundongos utilizados neste estudo procederam de uma amostra composta por 80 animais utilizados em outro projeto de pesquisa. Deste total, foram selecionados aleatoriamente 20 animais (10 pertencentes ao grupo teste e 10 ao grupo controle). Os animais foram pesados no início e no final do experimento. O grupo teste foi submetido a doses de 12 rad ou 0,12 Gy semanais de radiação, valor esse estimado para um levantamento periapical completo, durante 30 semanas, totalizando ao final do experimento 360 rad ou 3,6 Gy. Essas foram realizadas através de um aparelho de raios-X da marca Dabi Atlante com 70kVp e 10mA. Os animais foram colocados dentro de uma seringa plástica de 60 ml (Injex) para haver padronização das tomadas radiográficas. A seringa era suportada por anteparos confeccionados com resina acrílica ficando a distância

foco-animal de 20 cm. Os animais eram irradiados de forma que o longo eixo esquerdo desses ficasse perpendicular ao feixe principal de radiação X (figura 1). O grupo controle foi submetido aos mesmos procedimentos do grupo teste excetuando a exposição à radiação X.



Figura 1 – Camundongo dentro da seringa, posicionado a uma distância foco-animal de 20 cm.

Transcorridas as 30 semanas, os animais foram pesados e anestesiados com Ketamina e Rompum (proporção de 1/1 e 0,2ml por 100g de peso corporal) para a remoção de suas glândulas parótidas, sendo esses, posteriormente mortos por decapitação.

As glândulas parótidas do lado esquerdo foram dissecadas. Parte desse material foi destinado à técnica histológica de congelamento. Para isto, foi fixado em paraformaldeído a 2% por 6 horas, crioprotetido em concentrações crescentes de sacarose (10, 20 e 30%) e incluído em O.C.T. compound (Sigma). Posteriormente foram obtidos cortes de 7 μ m de espessura em criostato Shandon (Inglaterra). Esses foram coletados em lâminas previamente gelatinizadas e estocados. Desta amostra, foram escolhidas aleatoriamente 10 lâminas de

cada grupo e coradas pela coloração histológica de Sudam Black para evidenciação de lipídios.

O restante foi fixado em solução de Metacarn (solução de Canoy modificada – metanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%) durante três horas em temperatura ambiente. Após a fixação, o material foi convenientemente processado por meio de quatro banhos no álcool absoluto seguidos pela clarificação em três banhos de xilol, durante 15 minutos cada, para a inclusão em parafina. Cada bloco correspondia à glândula parótida esquerda de um animal teste ou de um animal controle. Foram feitos três cortes seriados de 5µm de espessura, com micrótomo rotatório (Jung RM 2055, Leica). Os cortes foram coletados em lâminas de vidro previamente cobertas com Poly-Lysine e aquecidos durante uma hora e meia, sob temperatura de 60°C. Uma lâmina de cada animal foi submetida à técnica histoquímica do PAS para evidenciação das mucinas neutras (BRANCOFF e STEVENS, 1996). As outras duas foram então coradas pelo H/E (hematoxilina/eosina) para observação morfológica.

4.3 Análise Qualitativa

Foi realizada uma análise descritiva dos cortes por três examinadores, previamente calibrados e cegados, em microscópio de luz (Olympus BX-41) nos aumentos de 40X, 100X e 400X, para verificar:

4.3.1. presença ou ausência de infiltrado inflamatório

4.3.2. presença ou ausência de vacuolização

4.3.3. presença ou ausência de degeneração hialina

Além destas variáveis, foi observada a aparência dos ácinos e dos ductos.

As lâminas foram analisadas, uma a uma, pelos três examinadores, num mesmo momento, e os dados anotados em uma planilha seguindo a seqüência dos itens acima

citados. No caso de divergência entre um dos examinadores, este item foi discutido pelos três até existir consenso na avaliação.

4.4 Análise Quantitativa

Para a análise quantitativa, foi realizada uma seleção prévia das lâminas onde eram excluídas aquelas que apresentavam problemas de fixação, coloração, corte e material insuficiente para exame. Tal procedimento foi necessário para não prejudicar a qualidade da análise e comprometer os resultados. Através desta seleção, a amostra ficou composta por cinco animais pertencentes ao grupo controle e por oito animais do grupo teste. Cinco é o número mínimo de animais necessários para uma análise estatística adequada, visto que a probabilidade de uma variável aumentar ou diminuir é de 0,5. Então $P = (0,5)^{\# \text{ de eventos}}$, ou seja, $P = (0,5)^5$ que resulta num $P = 0,03$, portanto estatisticamente significativa (CRUZ – ORIVE; WEIBEL, 1990). Foram então obtidos seis campos aleatórios de cada lâmina. Com a parte fosca da lâmina voltada para esquerda, os campos foram selecionados da esquerda para a direita indo da extremidade superior para a inferior. Esses foram fotografados através da máquina digital (Sony Cyber-shot DSC-P73) com zoom de 3X adicionado ao aumento de 400X do microscópio. Com isso, foram avaliados um total de 30 campos pertencentes ao grupo controle e 48, ao grupo teste.

Para a mensuração da proporção parênquima/estroma, foi utilizado o programa Image-Pro® Plus Version 4.5 for Windows™. Com a ferramenta *measures*, foram delimitados todos os ácinos e ductos presentes no campo, usando o contorno mais externo de ambos (figura 2). A soma das áreas dos ácinos e dos ductos resulta no parênquima glandular. A delimitação da área total do campo também foi realizada. Sendo assim, tem-se a proporção parênquima/ estroma visto que, se subtraído o parênquima da área total, obtém-se o valor correspondente ao do estroma.

As mensurações foram feitas em ambiente escuro, para facilitar a visualização e realizadas por um examinador previamente calibrado. A calibração constou da mensuração da área de dez ácinos pertencentes a seis campos diferentes medidas em dois momentos com intervalo de uma semana. Usando o teste *t de Student*, foi verificada a inexistência de diferenças significativas ($p = 0,50$) entre as medidas tomadas. As lâminas apresentavam-se codificadas, a fim de mascarar a qual grupo pertenciam.

Os valores obtidos com a utilização do programa eram enviados para uma planilha no programa Excel da Microsoft. Os dados eram então transformados em valores percentuais para posteriormente serem comparados através de testes estatísticos, a fim de se avaliar a existência de diferença na proporção parênquima/estroma do grupo teste em relação a mesma do grupo controle.

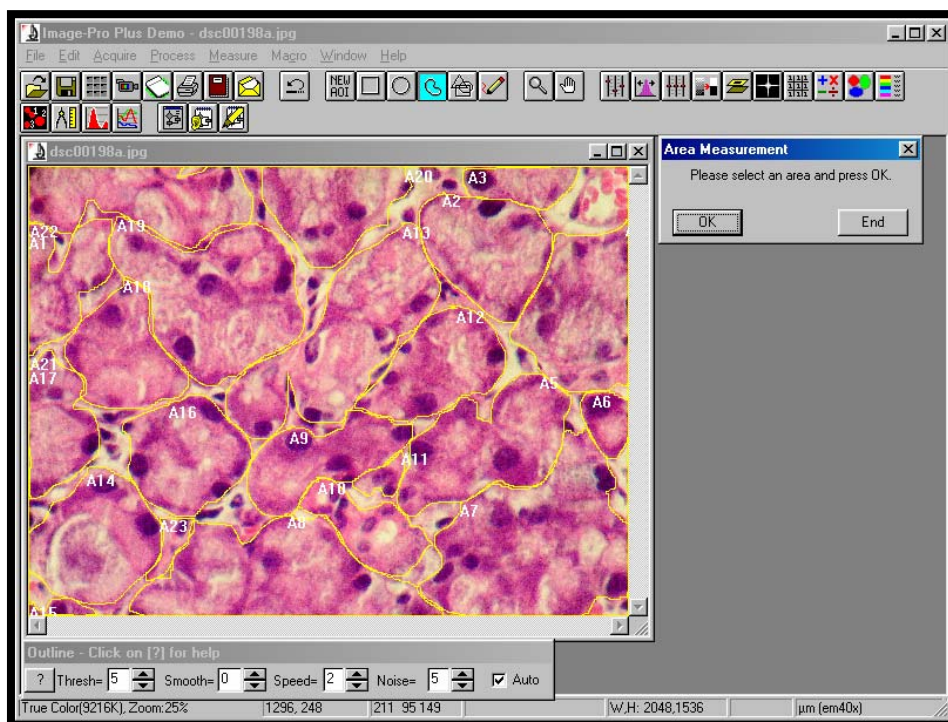


Figura 2 – Contorno mais externo de ácinos e ductos realizados através do Programa Image-Pro® Plus Version 4.5 for Windows™ para definir a proporção parênquima/estroma.

4.5 Análise Estatística

A proporção parênquima/estroma foi avaliada pelo teste t de *Student* para amostras independentes. De acordo com Callegari-Jacques (2003) e com o R Development Core Team (2005), os pressupostos para a utilização do teste t foram previamente verificados quanto á:

- Homocedasticidade, mediante teste de Levene;
- Distribuição normal, mediante teste Shapiro-Wilk.

Foi definido o nível de significância estatística em 5%. A análise foi realizada mediante o ambiente e a linguagem para estatística computacional R (R Development Core Team, 2005).

4.6 Considerações Éticas

Esta pesquisa obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, visto que os animais utilizados foram os mesmos de uma tese de doutorado daquela Instituição. O presente estudo também obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFRGS.

Por tratar-se de um estudo com animais esse foi acompanhado por um Médico Veterinário, pertencente à Fundação de Pesquisa e Experimentação Animal do Rio Grande do Sul.

5. RESULTADOS

5.1 Peso dos Animais

Quanto ao peso dos animais, foi feita uma comparação isolada entre as médias iniciais e finais dos pesos e ainda a diferença entre o ganho de peso de ambos os grupos. Verificou-se a inexistência de associação estatisticamente significativa entre peso e grupo, mediante teste *t* de Student ($p > 0,05$) (gráficos 1 e 2).

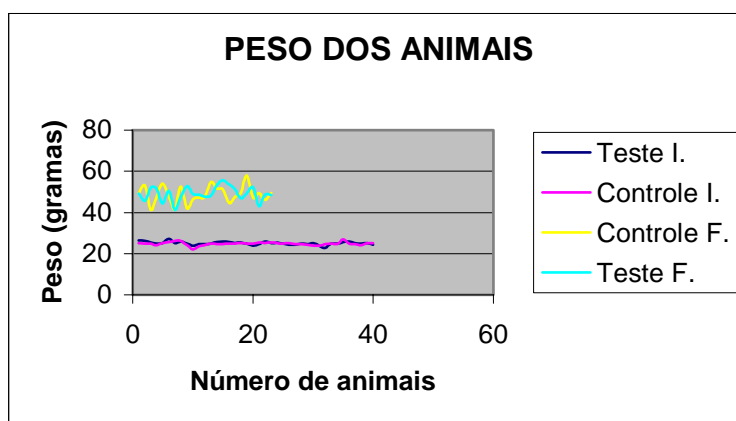


Gráfico 1 – Peso inicial e final dos camundongos dos grupos teste e controle. Porto Alegre, 2005.

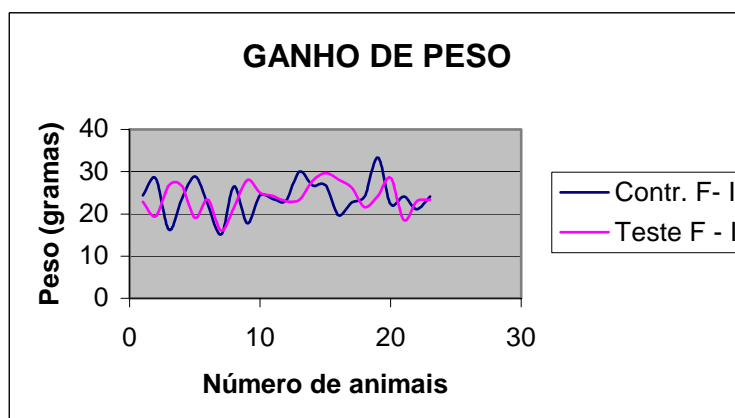


Gráfico 2 – Variação do ganho de peso dos animais do grupo teste em relação ao grupo controle. Porto Alegre, 2005.

5.2 Análise Qualitativa

Os resultados deste trabalho mostraram através da coloração por H/E, glândulas parótidas com aspectos diferentes, variando entre os animais analisados e entre diferentes áreas de uma mesma lâmina.

De um total de 20 blocos pertencentes a diferentes animais, sendo 10 do grupo teste e 10 do grupo controle, três foram excluídos porque, em um não havia material suficiente para exame e dois derivaram lâminas com falhas grosseiras no corte, comprometendo a análise. Restaram para avaliação nove glândulas do grupo teste e oito do grupo controle.

Em todas as lâminas observadas, foi possível constatar no parênquima glandular a presença de ácinos mais regulares na periferia e menos estruturados no centro dos lóbulos. Aqueles da periferia, em alguns casos, pareciam aumentados de volume, ou seja, intumescidos. Já os ácinos menos estruturados, presentes na porção central do lóbulo, possuíam uma maior quantidade de vacúolos e/ou degeneração hialina. Essas alterações foram visualizadas tanto nos animais do grupo controle quanto nos do grupo teste.

Também foi verificada em ambos os grupos, a diminuição do número de ductos intralobulares. Os ductos estriados pareciam perder seus aspectos característicos, as células colunares tornaram-se cubóides, as estrias desapareceram e seus lúmens apresentavam-se dilatados (figuras 3 e 4).

Houve presença de infiltrado inflamatório em quase todos os campos avaliados. Apenas mostrou-se ausente em uma lâmina pertencente ao grupo teste e em três do grupo controle. Esse não apresentava uma distribuição homogênea, encontrando-se às vezes concentrado próximo a vasos sanguíneos e ductos e, em outras vezes, disperso por toda a glândula (figuras 3 e 8).

A presença de vacuolização citoplasmática foi observada em ambos os grupos (figura 5). Quatro animais testes apresentaram células acinares repletamente preenchidas com

vacúolos, enquanto que no grupo controle, apenas um animal mostrava essa característica. Esses vacúolos foram encontrados principalmente naqueles ácinos localizados na porção central dos lóbulos.

Observou-se, através da coloração para evidenciação de lipídios, aspectos semelhantes nas lâminas pertencentes ao grupo teste e ao grupo controle. Ambas apresentavam marcação positiva para Sudan Black localizada próxima ao núcleo e membrana plasmática das células (figura 7).

Quanto á evidenciação de mucinas neutras, componente do fluído salivar primário, observou-se a presença das mesmas, já que houve marcação PAS positiva nas lâminas pertencentes a ambos os grupos (figura 6).

Da mesma forma, verificou-se uma degeneração hialina citoplasmática em ambos os grupos (figuras 3 e 8). Em seis lâminas pertencentes ao grupo controle, observou-se um maior número de ácinos com degeneração hialina. Em quatro lâminas do grupo teste, esta alteração também foi encontrada.

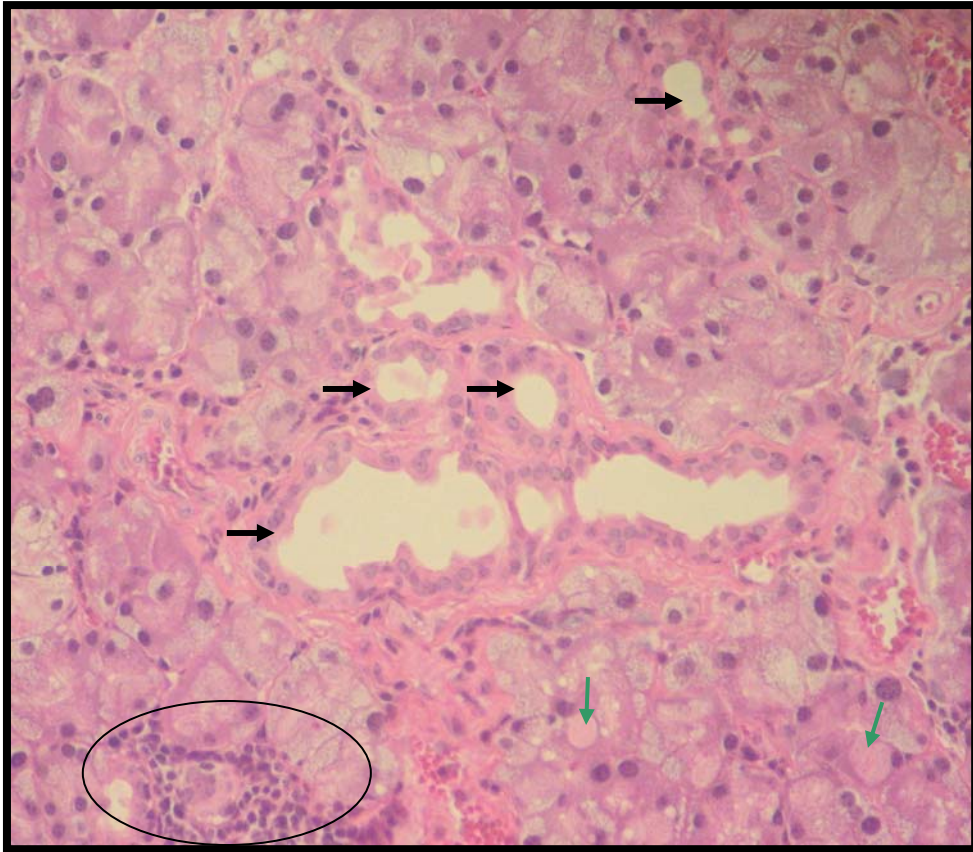


Figura 3 – Ductos intralobulares com aumento da luz de seus lúmens (setas pretas), degeneração hialina (setas verdes) e área em destaque com presença de células do processo inflamatório. (H/E). Aumento: 200X. Zoom digital: 2,3.

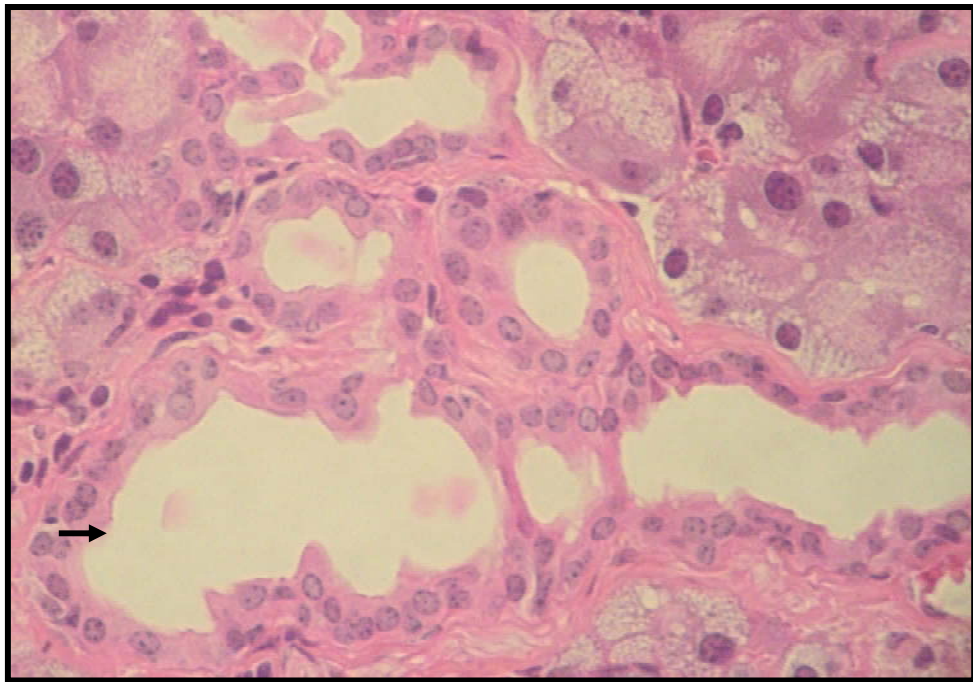


Figura 4 – Magnificação da fotografia anterior, mostrando através da seta o aumento da luz ductal. (H/E). Aumento: 400X. Zoom digital: 2,3.

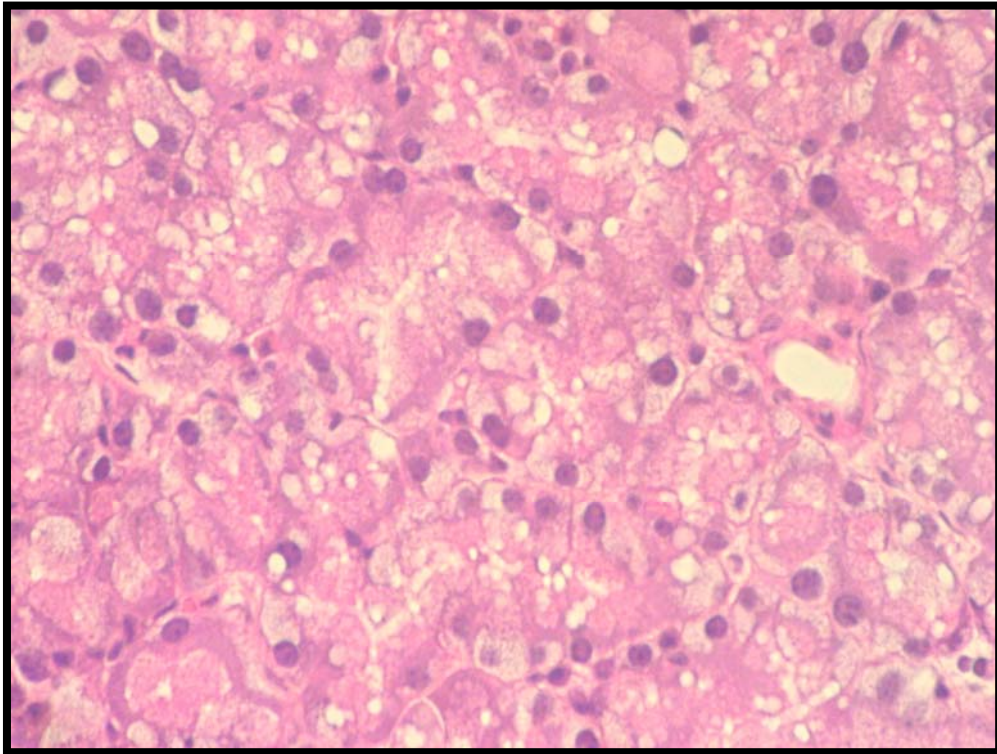


Figura 5 – Presença de vacuolização citoplasmática em ácinos da parótida de camundongo irradiado. (H/E). Aumento: 400X. Zoom digital: 2,3.

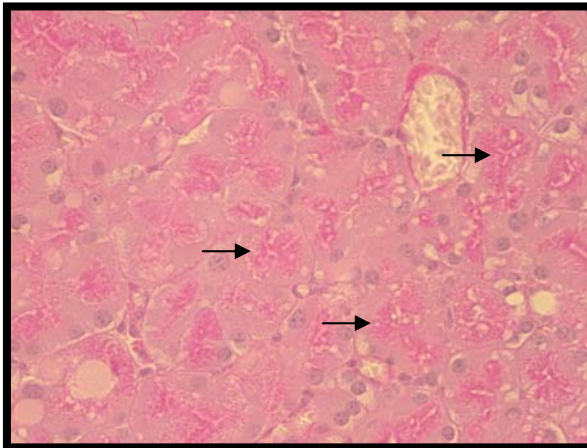


Figura 6 – Marcação PAS positiva em glândula parótida de camundongo de 36 semanas. Aumento: 200X. Zoom digital: 2,3.

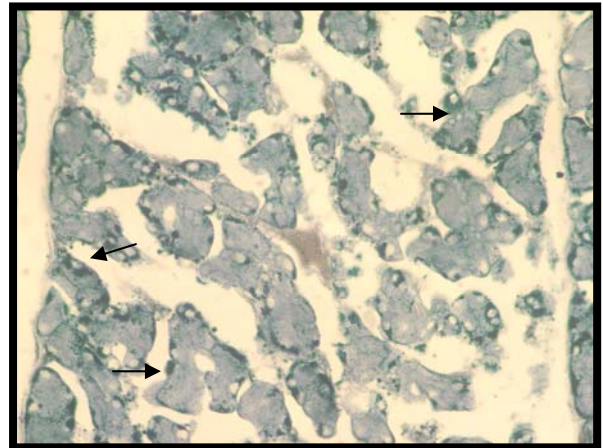


Figura 7 – Marcação para Sudan Black, mais evidente próximo aos núcleos e a membrana basal das células acinares. Aumento: 200X. Zoom digital: 2,3.

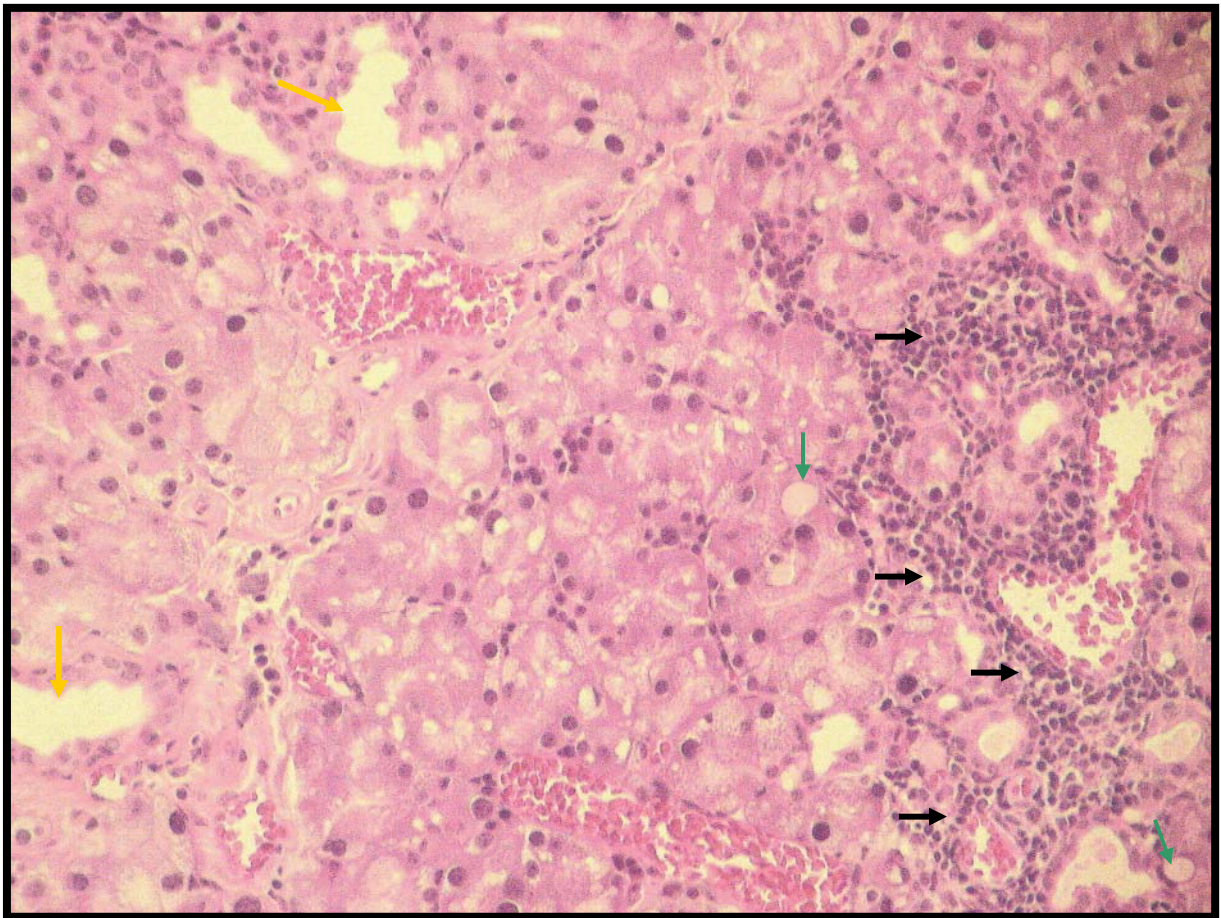


Figura 8 – Parótida de camundongo exposto à radiação que apresenta degeneração hialina (setas verdes), aumento da luz dos ductos (setas amarelas) e presença marcante de células do processo inflamatório (setas pretas). (H/E). Aumento: 200X. Zoom digital: 2,3.

Quadro 1. Análise Histológica Descritiva das Glândulas Parótidas de Camundongos Expostos e Não Expostos à Radiação X durante o Envelhecimento. Porto Alegre, 2005.

Controle	Infiltrado Inflamatório.	Vacuolização	Deg. Hialina	Teste	Infiltrado Inflamatório	Vacuolização	Deg. Hialina
Lâmina 1	+	+	+	Lâmina 1	+	+	-
Lâmina 2	+	+	+	Lâmina 2	-	-	-
Lâmina 3	*	*	*	Lâmina 3	*	*	*
Lâmina 4	+	+	+	Lâmina 4	+	+	+
Lâmina 5	-	-	+	Lâmina 5	+	+	-
Lâmina 6	-	+	+	Lâmina 6	+	+	+
Lâmina 7	+	+	-	Lâmina 7	+	+	-
Lâmina 8	*	*	*	Lâmina 8	+	+	+
Lâmina 9	+	+	+	Lâmina 9	+	+	-
Lâmina 10	-	+	-	Lâmina 10	+	+	+

Sendo que: (+) = presente; (-) = ausente e (*) = não foi possível analisar

5.3 Análise Quantitativa

O resultado obtido na análise quantitativa demonstrou, através do teste *t* de *Student* para amostras independentes com alfa de 5%, que não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,35$) na proporção de parênquima/estroma entre os grupos analisados (grupo teste e grupo controle). O teste *t* de *Student* foi utilizado uma vez que os pressupostos para aplicação de testes paramétricos, homogeneidade de variâncias (teste de Levene) e distribuição normal (teste de Shapiro Wilk), foram atendidos.

Quadro 2. Análise Quantitativa da Relação Parênquima/Estroma em Glândulas Parótidas de Camundongos Expostos e Não Expostos à Radiação X durante o Envelhecimento. Porto Alegre, 2005.

	Número de animais	Média percentual de parênquima	Média percentual do estroma
Controle	5	93,64	6,36
Teste	8	92,73	7,27

6. DISCUSSÃO

Muitos são os trabalhos que observaram o efeito das radiações ionizantes em doses semelhantes àsquelas usadas em radioterapia de cabeça e pescoço (CHERRY; GLUCKSMANN, 1959; ITO, 1967; PHILLIPS; TEX, 1970; SODICOFF et al., 1977; SASAKI; YAMAMOTO; TAKEDA, 1980; RICE et al., 1982; BODNER et al., 1984; VISSINK et al., 1990; VISSINK et al., 1991; KOHN et al., 1992; ROSSIE, 1993; NAGLER; BAUM; FOX, 1993 e 1996; COPPES et al., 1997; GUSTAFSSON et al. 1998; ROESINK et al., 1999; PELISSER, 2005). Este trabalho teve a intenção de avaliar os efeitos da radiação X, ao longo da vida, com doses crônicas e baixas, tentando fazer um paralelo à irradiação sofrida por pacientes odontológicos.

De um total de 80 animais que iniciaram o experimento, houve a morte de quatro animais pertencentes ao grupo controle e de 17 animais pertencentes ao grupo teste. Fazendo-se uma análise através do teste qui-quadrado, foi possível verificar uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) na mortalidade dos animais. Considerando-se que, os animais de ambos os grupos foram submetidos às mesmas condições, excetuando-se a exposição à radiação X no grupo controle, entende-se que esta interferiu na sobrevivência dos mesmos. Muito provavelmente isso ocorreu devido aos efeitos da radiação X que atingiu todo o corpo do animal acarretando danos irreversíveis a órgãos vitais.

Quanto ao peso dos animais, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes. Para isso, foram realizadas comparações dos pesos iniciais, finais e do ganho de peso dos animais durante o experimento, entre os camundongos pertencentes ao grupo teste e controle. Diversos trabalhos relatam a perda de peso como uma das primeiras injúrias observadas, após doses agudas de radiação X (ITO, 1967; SODICOFF et al., 1977; RICE et al., 1982; BODNER et al., 1984; KOHN et al., 1992; NAGLER; BAUM; FOX 1993 e 1996;

PELISSER, 2005). Fica evidente, desta forma, que a dose usada neste estudo baixa e periódica, não foi capaz de interferir na perda de peso dos animais.

Conforme Ito (1967), as alterações morfológicas causadas pela radiação X, não ocorrem da mesma forma em todas as partes da glândula. Mudanças degenerativas do parênquima são as primeiras a serem observadas, sendo seus efeitos mais marcados nos ácinos e ductos estriados. Os ductos extralobulares praticamente não são atingidos.

Por meio dos resultados verificados no presente trabalho, foi possível constatar no parênquima glandular, tanto do grupo teste que sofreu a irradiação, como do grupo controle, a presença de ácinos mais regulares na periferia e menos estruturados no centro dos lóbulos. Aqueles da periferia, em alguns casos, pareciam aumentados de volume. Conforme Gustafsson et al. (1998), estudando o efeito de doses fracionadas de 6 a 9Gy, durante cinco dias consecutivos, totalizando 30 e 45Gy respectivamente, observaram que seis meses após, os ácinos remanescentes pareciam dilatados.

Muitos trabalhos relatam, dentre as alterações histológicas advindas da radiação, atrofia das células acinares e mudanças degenerativas nucleares (CHERRY; GLUCKSMANN, 1959; ITO, 1967; PHILLIPS; TEX, 1970; BODNER et al., 1984; ROSSIE, 1993; PELISSER, 2005). Em relação a alterações nucleares, tais como núcleos fragmentados ou picnóticos, nada foi encontrado nesta pesquisa, entretanto, degeneração das células acinares pôde ser observada. Os ácinos menos estruturados presentes na porção central dos lóbulos possuíam uma maior quantidade de vacúolos e/ou degeneração hialina.

A vacuolização, observada nas lâminas de ambos os grupos experimentais, apresentou ocorrência levemente maior no grupo teste. Ito (1967) relata, dentre as principais injúrias histológicas por ele observadas devido à radiação X, a vacuolização das células acinares. Também Bodner et al. (1984), após doses de 2000R, cita o surgimento de vacúolos autofágicos de vários tamanhos. Conforme Rossie (1993), nas células serosas, há formação de

vacúolos, degranulação e necrose, devido à irradiação. Nesta pesquisa, por meio da coloração para evidenciação de lipídios (Sudan Black), verificou-se que a localização dos vacúolos não coincidia com a localização lipídica. Isto demonstra que os vacúolos identificados não estavam preenchidos por conteúdo lipídico. Através desta coloração, pôde-se verificar uma quantidade bastante consistente de gotículas lipídicas, porém sem diferir muito entre os animais do grupo teste e do grupo controle. Esta suposição partiu do estudo de Cara et al. (2005), no qual os autores verificaram uma quantidade apreciável de inclusões lipídicas citoplasmáticas em parótidas de pessoas diabéticas do tipo II. O aspecto histológico da glândula assemelhava-se ao visualizado neste estudo.

Kasbourn (1953) e Garrett (1962) apud Watherhouse et al. (1973) relataram um aparente aumento de tecido adiposo em glândulas salivares após as mesmas sofrerem irradiação. Provavelmente o aparecimento de tecido adiposo ocorra mais em decorrência do envelhecimento dos animais, conforme achados de vários autores (BAUM; KUYATT, 1981; WOLFF et al., 1991; FIELD; SCOTT, 1993; BODNER; GORSKY, 1995; INQUE et al., 2003; MARAY et al., 2004) do que das exposições à radiação X, visto que não se observou diferenças entre as lâminas de ambos os grupos (teste e controle).

Segundo Cherry; Glucksmann (1959), doses de 3000R acarretam no citoplasma das células acinares ora vacuolização, ora hialinização.

Observou-se que a presença dos vacúolos acinares não era concomitante com a presença da degeneração hialina. Por meio deste fato, pode-se inferir que os vacúolos poderiam ser uma consequência da autofagia das proteínas citoplasmáticas degradadas. Porém, conforme Cherry; Glucksmann (1959), a degeneração hialina seria consequência da confluência de grânulos secretores. Ressalta-se que essas alterações foram visualizadas tanto nos animais do grupo controle quanto do grupo teste.

Quanto aos ductos, verificou-se uma diminuição de número dos intralobulares. A este respeito, Rice et al. (1982) constataram, após doses de 1800R, uma alteração na proporção ácino/ducto, devido à diminuição dos primeiros em relação à permanência dos segundos.

Verificou-se que os ductos estriados perdiam seus aspectos característicos: as células colunares tornaram-se cubóides, as estrias basais desapareceram e seus lúmens apresentaram-se muito dilatados. Phillips; Tex (1970) e Rossie (1993) observaram metaplasia das células ductais e aumento da luz dos lúmens, alterações essas semelhantes ao que foi observado neste trabalho, em ambos os grupos avaliados. Cabe ressaltar que, conforme os achados de Scott (1976) e Mahay et al. (2004), dilatação e hiperplasia dos ductos são alterações observadas durante o envelhecimento.

O infiltrado inflamatório esteve presente em quase todas as lâminas avaliadas, sendo mais predominante naquelas pertencentes ao grupo teste. Conforme Rossie (1993), células inflamatórias penetram o parênquima glandular em resposta à radiação. Porém, não se pode deixar de citar os estudos de Baum; Kuyatt, 1981; Wolff et al., 1991; Field; Scott, 1993; Bodner; Gorsky, 1995; Inque et al., 2003 e Mahay et al., 2004, que verificaram o aparecimento de infiltrado inflamatório em animais velhos. Em vista disto, os achados deste estudo quanto ao infiltrado inflamatório, indicam que tanto a radiação como o envelhecimento são estímulos suficientes para induzir o processo.

Segundo Scott (1977), analisando glândulas salivares humanas, a localização preferencial das células inflamatórias é na periferia dos lóbulos glandulares, circundando ductos e vasos. Neste estudo, a localização do infiltrado inflamatório ocorreu junto a ductos e vasos e, em alguns casos, disperso por toda a lâmina.

Para a verificação da perda de parênquima funcional e a substituição deste por tecido fibroso, foi realizada análise quantitativa da proporção parênquima/estroma. Apesar de haver quantidade inferior de parênquima no grupo teste quando comparado ao grupo controle,

estatisticamente esta diferença não foi significativa. Alguns autores relatam uma maior quantidade de estroma devido aos efeitos da radiação X, usando doses altas e agudas (CHERRY; GLUCKSMANN, 1959; ROSSIE, 1993). Desta forma, pode-se observar que doses baixas e crônicas não tem o mesmo poder de interferência na estrutura da glândula parótida levando-se em consideração a relação parênquima/estroma.

No que se refere à presença de mucinas neutras, Cherry; Glucksmann (1959) observaram uma diminuição dos grânulos PAS positivos nas células de parótidas de ratos irradiados com doses agudas. Neste estudo, as lâminas de ambos os grupos, teste e controle, apresentaram coloração PAS positivas com intensidades semelhantes, levando-se a acreditar que a radiação X, em dose baixa e crônica, não interfere nesse componente do fluido salivar primário.

A partir disso, constatou-se que as mudanças observadas neste estudo não demonstraram alterações substanciais na morfologia e na morfometria analisadas por meio da metodologia aqui empregada. Verificou-se que muitas mudanças supostamente causadas pela radiação X também são observadas em animais ao longo do envelhecimento.

Novos estudos realizados com técnicas mais sensíveis e amostras mais numerosas são necessários para melhor elucidar os efeitos da radiação X, em doses baixas e crônicas sobre as glândulas salivares, durante o envelhecimento.

7. CONCLUSÕES

Com base na metodologia empregada neste estudo e diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- os aspectos morfológicos quanto à presença ou ausência de infiltrado inflamatório, vacuolização e degeneração hialina, além dos aspectos dos ácinos e ductos, das glândulas parótidas visíveis através da coloração por H/E de camundongos expostos à radiação X durante o envelhecimento, não diferem substancialmente daqueles encontrados em parótidas de camundongos não expostos.
- não existe diferença significativa na proporção parênquima/estroma de glândulas parótidas de camundongos expostos e não expostos à radiação X durante o envelhecimento.

REFERÊNCIAS¹

- ALVARES, L.C.; TAVANO, O. **Curso de Radiologia em Odontologia**. 4.ed. São Paulo: Santos, 1998. 248 p.
- AVERY, J.K. Glândulas Salivares e Tonsilas. In: _____. **Fundamentos de Histologia e Embriologia Bucal: Uma Abordagem Clínica**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 15, p. 169-178
- BAUM, B. J.; KUYATT, B. L. Characteristics of Submandibular Glands from Young and Aged Rats. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 60, no. 5, p. 936-941, May 1981.
- BERKOVITZ, B.K.B. **Anatomia, Embriologia e Histologia Bucal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 378p.
- BHASKAR, S. N. Glândulas Salivares. In: _____. **Histologia e Embriologia Oral de Urban**. 10.ed. São Paulo: Artes Médicas, 1989. Cap.10, p. 353-395.
- BODNER, L.; GORSKY, M. Parotid Gland Secretion of Aging Rat. **Arch. Gerontol. Geriatr.**, Amsterdam, v. 22, no. 1, p. 63-69, Jan./Fev. 1996.
- BODNER, L. et al. Rat Parotid Cell Function *in vitro* Following X Irradiation *in vivo*. **Radiat. Res.**, Charlottesville, v. 97, no. 2, p. 386-395, Feb. 1984.
- BRANCOFF, J. D.; STEVENS, A. **Theory and Practice of Histological Techniques**. 4.ed. New York: Churchill Livingstone, 1996. 766p.
- BURFORD-MASON, A. P.; NORBERG, L.; DARDICK, I. Differentiating Myoepithelial and Acinar Cells in Rat Neonatal Parotid Gland and Histogenetic Concepts for Salivary Gland Tumors. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 25, no. 9, p. 474-480, Oct. 1996.
- CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: Princípios e Aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2003. 255 p.
- CARDA, C. et al. Structural Differences Between Alcoholic and Diabetic Parotid Sialosis. **Med.Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, St. Louis, v.10, no. 4, p. 309-314, Aug./Oct. 2005.
- CHERRY, C. P.; GLUCKSMANN, M. D. Injury and Repair Following Irradiation of Salivary Glands in Male Rats. **Br. J. Radiol.**, London, v. 32, no. 381, p. 596-608, Sept. 1959.
- COPPE, R. P. et al. Sialogogue – Related Radioprotection of Salivary Gland Function: The Degranulation Concept Revisited. **Radiat. Res.**, Charlottesville, v. 148, no. 3, p. 240-247, Sept. 1997.
- CRUZ-ORIVE, L. M.; WEIBEL, E. R. A Stereological Methods for Cell Biology: A Brief Survey. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 258, p. L148-L156, 1990.

¹ Conforme a NBR 6023, de Normalização de Referências Bibliográficas da ABNT, de 2002.

DANFORTH, R. A.; GIBBS, S. J. Diagnostic Radiation: What is the Risk? **J. Calif. Dent. Assoc.**, San Francisco, v. 8, no. 6, p. 27-35, June 1980.

FAVA-DE-MORAES, F. **Contribuição para o Estudo Estrutural, Histoquímico e Bioquímico das Glândulas Salivares Maiores de Roedores Pertencentes às Subordens Hystricomorpha, Myomorpha e Sciuromorpha (rodentia, mammalia)**. 1969. 78 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FIELD, A.; SCOTT, J. Changes in the Structure of Salivary Glands with Age. In: DOBROSIELSKI-VERGONA, K. (Ed.). **Biology of the Salivary Glands**. Boca Raton: CRC Press. 1993. Cap. 18, p. 397-428.

FREITAS, A.; ROSA, J. E.; SOUZA, I. F. **Radiologia Odontológica**. 6.ed. São Paulo: Artes Médicas, 2004. 833p.

GUSTAFSSON, H. et al. Effects of Fractionated Irradiation on the Cytoskeleton and Basal Lamina in Parotid Glands. An Immunohistochemical Study. **Acta Oncol.**, Stockholm, v. 37, no.1, p. 33-40, 1998.

HARDMAN, P.; SPOONER, B.S. Collagen in Organ Development. **Trans. Kans. Acad. Sci.**, Lawrence, v. 95, no. 1-2, p. 29-33, 1992.

INQUE, N. et al. Age-Related Decreases in the Response of Aquaporin-5 to Acetylcholine in Rat Parotid Glands. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 82, no.6, p. 476-480, June 2003.

ITO, M. Biological Effects of X-Irradiation on Salivary Gland of Mice. **Radiat. Res.**, Charlottesville, v. 30, no. 2, p. 283-300, Feb. 1967.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Órgãos Associados ao Trato Digestivo. In: _____. **Histologia Básica Texto – Atlas**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap. 16, p. 317-338.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. Glândulas Salivares. In: _____. **Histologia e Embriologia Oral Texto – Atlas – Correlações Clínicas**. São Paulo: Panamericana, 1999. Cap. 5, p. 120-150.

KIM, S. K. Age-Related Changes in the Cellular Level of Amylase and Protein Synthesis in the Rat Parotid Gland. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 60, no.3, p. 738-747, Mar. 1981.

KIM, S. K.; ALLEN, E. D. Structural and Functional Changes in Salivary Glands During Aging. **Microsc. Res. Tech.**, New York, v. 28, no.3, p.243-253, June 1994.

KIM, S. K.; ARISUMI, P. P. The Synthesis of Amylase in Parotid Glands of Young and Old Rats. **Mech. Ageing Dev.**, Lausanne, v. 31, no. 3, p. 257-266, Sept. 1985.

KIM, S. K.; CALKINS, D. W. Secretory Protein Synthesis in Parotid Glands of Young and Old Rats. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 28, no. 1, p. 1-4, 1983.

KOHN, W.G. et al. Effect of Ionizing Radiation on Sympathetic Nerve Function in Rat Parotid Glands. **J. Oral. Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 21, no. 3, p.134-137, Mar. 1992 .

KURASHIMA, C.; HIROKAWA, K. Age-Related Increase of Focal Lymphocytic Infiltration in the Human Submandibular Glands. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 15, no.3 , p. 172-178, Mar. 1986.

LANGLAND, O. E.; LANGLAIS, R. P. **Princípios de Diagnóstico por Imagem em Odontologia**. São Paulo: Santos, 2002. 463 p.

LIMA, A. A. S. et al. Radioterapia de Neoplasias Malignas na Região da Cabeça e Pescoço – o que o Cirurgião-Dentista Precisa Saber. **Rev. Odonto Ciência**, Porto Alegre, v. 16, n. 33, p. 156-165, maio/ago. 2001.

MAHAY, S. et al. Effects of Ageing on Morphology, Amylase Release, Cytosolic Ca²⁺ Signals and Acyl Lipids in Isolated Rat Parotid Gland Tissue. **Mol. Cell. Biochem.**, The Hague, v. 266, no. 1-2, p. 199-208, Nov. 2004.

MARTINEZ-MADRIGAL, F.; MIVHEAU, C. Histology of the Major Salivary Glands. **Am. J. Surg. Pathol.**, New York, v. 13, no.10, p. 879-899, Oct. 1989.

MOROTOMI, T. et al. In vitro Differentiation of Dental Epithelial Progenitor Cells Through Epithelial-Mesenchymal Interactions. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 50, no. 8, p. 695-705, Aug. 2005.

NAGLER, R. M.; BAUM, B. J.; FOX, P. C. Effects of X Irradiation on the Function of Rat Salivary Glands at 3 and 40 Days. **Radiat. Res.**, Charlottesville, v. 136, no. 3, p. 392-396, Dec. 1993.

NAGLER, R. M.; BAUM, B. J.; FOX, P. C. A 2-Week Pair-Fed Study of Early X-Irradiation Effects on Rat Major Salivary Gland Function. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 41, no. 7, p. 713-717, July 1996.

PASLER, F.A. **Radiologia Odontológica**. 3.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1999.

PELISSER F.V.V. **Efeito da Teleterapia Fracionada em Polpa Dentária de Ratos – Análise em Microscopia Óptica e Eletrônica de Trasmissão**. 2005. 131 f. Tese (Doutorado em Estomatologia) - Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PHILLIPS, R. M. X-Ray-Induced Changes in Function and Structure of the Rat Parotid Gland. **J. Oral Surg.**, Chicago, v. 28, no. 6, p. 432-437, June 1970.

PRESTON-MARTIN, S.; WHITE, S. C. Brain and Salivary Gland Tumors Related to Prior Dental Radiography: Implications for Current Practice. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.120, no. 2, p. 151-158, Feb.1990.

PRO RAD. **Diretrizes de Proteção Radiológica em Radiodiagnóstico Médico e Odontológico**: Portaria da Secretaria de Vigilância Sanitária N°453, de 1° de junho de 1998. Porto Alegre, [1998?]. 38 p.

RAJAKUMAR, G.; KOLLER, M. M.; SCARPACE, P. J. Beta-Adrenergic Receptors and Salivary Gland Secretion During Aging. **Growth Dev. Aging.**, Bar Harbor, v. 56, no. 4, p. 215-223, Winter, 1992.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, 2005. Versão 2.1.1. Vienna, Austria. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 25 junho 2005.

RICE, J.C. et al. Rat Parotid Gland Pathophysiology following ¹³⁷Cs Irradiation. **Radiat. Res.**, Charlottesville, v. 90, no. 2, p. 330-338, May 1982.

ROESINK, J. M. et al. Preservation of the Rat Parotid Gland Function After Radiation by Prophylactic Polycarpine Treatment: Radiation Dose Dependency and Compensatory Mechanisms. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, Tarrytown, v. 45, no. 2, p. 483-489, Sept. 1999.

ROESINK, J. M. et al. Quantitative Dose-Volume Response Analysis of Changes in Parotid Gland Function After Radiotherapy in the Head-and-Neck Region. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, Tarrytown, v. 51, no. 4, p. 938-946, Nov. 2001.

ROSS, M. H.; REITH, E. J.; ROMRELL, L. J. **Histologia Texto e Atlas**. 2.ed. São Paulo: Panamericana, 1993. 779 p.

ROSSIE, K. Influence of Diseases on Salivary Glands. In: DOBROSIELSKI-VERONA, K. **Biology of the Salivary Gland**. Boca Raton, CRC Press, 1993.

SASAKI, T. Latent and Persistent Lethal Injury in Mouse Salivary Gland Cells Following Gama Irradiation. **Radiat. Res.**, Charlottesville, v. 67, no. 1, p. 104-113, July 1976.

SASAKI, T.; YAMAMOTO, M; TAKEDA, M. Function of Parotid Gland Following Irradiation and Its Relation to Biological Parameters. **Radiat. Res.**, Charlloesville, v. 83, no. 3, p. 579-591, Sept. 1980.

SCOTT, J. The Incidence of Focal Chronic Inflammatory Changes in Human Submandibular Salivary Glands. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 5, no. 6, p. 334-346, Nov. 1976.

SCOTT, J. Quantitative Age Changes in the Histological Structure of Human Submandibular Salivary Glands. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 22, no. 3, p. 221-227, 1977.

SODICOFF, M. et al. Effects of X-Irradiation and the Resultant Inanition on Amylase Content of the Rat Parotid Gland. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.22, no. 4, p. 261-267, 1977.

TAKADA, K.; AIYAMA, S.; IKEDA, R. Morphological and Histochemical Changes in the Secretory Granules of Mucous Cells in the Early Postnatal Mouse Parotid Gland. **Arch Histol. Cytol.**, Niigata, v. 64, no. 3 , p. 259-266, Aug. 2001.

TANDLER, B. Structure of Mucous Cells in Salivary Glands. **Micros. Res. Tech.**, New York, v. 26, no. 1, p. 49-56 , Sept. 1993.

TANDLER, B.; PHILLIPS, C. J. Structure of Serous Cells in Salivary Glands. **Micros. Res. Tech.**, New York, v. 26, no. 1, p. 32-48, Sept. 1993.

TEN CATE, A. R. Glândulas Salivares. In: _____. **Histologia Bucal: Desenvolvimento, Estrutura e Função**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 15, p. 296-322.

THESLEFF, I. et al. The Parotid Gland is the Main Source of Human Salivary Epidermal Growth Factor. **Life Sci.** , Oxford, v. 43, no. 1, p. 13-18, 1988

UNDERHILL, T. E. et al. Radiologic Risk Estimation from Dental Radiology. Part I. Absorbed Doses to Critical Organs. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 66, no. 1, p.111-120, July 1988.

UNDERHILL, T. E. et al. Radiologic Risk Estimation from Dental Radiology. Part II. Cancer Incidence and Fatality. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol**, St. Louis, v. 66, no. 2, p.261-267, Aug. 1988.

VISSINK, A. et al. A Functional and Chemical Study of Radiation Effects on Rat Parotid and Submandibular/Sublingual Glands. **Radiat. Res.**, Charlottesville, v. 124, no. 3, p. 259-265, Dec. 1990.

WATERHOUSE, J. P. et al. Replacement of Functional Parenchymal Cells by Fat and Connective Tissue in Human Submandibular Salivary Glands: An Age-Related Change. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 2 , no. 1, p. 16-27, 1973.

WHAITES, E. **Princípios de Radiologia Odontológica**. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2003.

WHITE, S. C. 1992 Assessment of Radiation Risk from Dental Radiography. **Dentomaxillofac. Radiol.**, Houndsmills, v. 21, no. 3, p. 118-126, Aug. 1992.

WOLFF, A. et al. An Investigation of Parotid Gland Function and Histopathology in Autoimmune Disease-Prone Mice of Different age Groups. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 20, no. 10, p. 486-489, Nov. 1991.

YANCOVENCO, A. A Análise dos Problemas mais Frequentes da Radiografia na Prática Odontológica. **Rev. ABRO**, Bauru, v. 2, n. 1, p. 29-39, jan./jun. 2001.