

ANA RITA VIANNA POTRICH

DIFERENÇAS MACROSCÓPICAS E MICROSCÓPICAS ENTRE AS
GLÂNDULAS PARÓTIDA E EXORBITAL LACRIMAL EM RATOS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Odontologia da Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, como requisito
parcial para obtenção do título de
Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dra. Anna Christina
Medeiros Fossati

Porto Alegre

2011

CIP – Catalogação na Publicação

Potrich, Ana Rita Vianna

Diferenças macroscópicas e microscópicas entre a glândula parótida e exorbital lacrimal em ratos / Ana Rita Vianna Potrich. – 2011.

35 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Curso de Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

Orientador: Anna Christina Medeiros Fossati

1. Glândula exorbital lacrimal. 2. Glândula parótida. 3. Histomorfologia comparada I. Fossati, Anna Christina Medeiros II. Título.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dr^a Anna Christina Medeiros Fossati, mestre, amiga e companheira desta jornada.

À Professora Dr^a Dalva Maria Pereira Padilha, que foi grande incentivadora deste trabalho.

À doutoranda Me. Lisiane Bernardi, que colaborou para a realização deste trabalho com auxílio técnico-científico.

À Dr^a Fernanda Visioli, que realizou as análises estatísticas do trabalho.

Aos acadêmicos Glaucus Maidana Rodrigues e Henrique Quevedo, e ao CD Lucas Telles que auxiliaram na realização de diversas atividades deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

APOIO

Este trabalho teve apoio financeiro do CNPq através de bolsa de iniciação científica Bic e Pibic (CNPq) PROPESQ-UFRGS.

RESUMO

POTRICH, Ana Rita Vianna . **Diferenças macroscópicas e microscópicas entre as glândulas parótida e exorbital lacrimal em ratos** 2011. 35f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

Este trabalho teve por finalidade descrever aspectos diferenciais entre a glândula parótida e a glândula exorbital lacrimal de roedores. Foi realizado com o intuito de facilitar os estudos cujas abordagens que envolvam essas regiões, uma vez que sua proximidade anatômica, bem como as semelhanças macro e microscópicas dificultam seu perfeito reconhecimento. A abordagem cirúrgica foi feita em ratos machos da raça Winstar e camundongos machos heterogênicos ambos com 60 dias de vida, sendo os acidentes anatômicos definidos e convenientemente fotografados para seu registro. Após a coleta do material, este foi fixado em Methacarn e processado histologicamente. Os cortes de 5 µm de espessura foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina e Tricrômico de Mallory, e submetidos ao software Image J[®] para a análise da quantidade de estroma glandular presente em cada glândula. Além disso, foram realizadas análises observacionais através do uso de microscopia óptica, para determinação das características histomorfológicas das glândulas. Os resultados das análises demonstraram que as principais diferenças microscópicas entre as glândulas referem-se aos ductos: quanto ao número, forma e tamanho e quanto a quantidade de estroma glandular, esta diferença, em particular, evidenciada pela marcação do corante Tricrômico de Mallory e quantificada pelo software Image J[®]. Quanto as diferenças macroscópicas podemos dizer que suas principais diferenças são quanto à forma e tamanho.

Palavras-chave: Glândula Exorbital Lacrimal, Glândula Parótida, Histomorfologia comparada, Anatomia do Rato.

ABSTRACT

POTRICH, Ana Rita Vianna . **The macroscopic and microscopic differences between exorbital lacrimal and parotid glands in rats** 2011. 35f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

This paper aims to describe the distinguishing features between the parotid gland and exorbital lacrimal gland in rodents. It was conducted in order to improve studies whose approaches involving these regions, since their anatomic proximity, as well as macro and microscopic similarities hamper your perfect recognition. The surgical approach was performed in Winstar rats and heterogenic mice breed male both with 60 days of life, and the anatomical accidents defined and conveniently photographed for registration. After collecting the material, it was fixed in Methacarn and histologically processed. The 5 μm thick cuts were stained with hematoxylin and eosin or Mallory's trichrome, and submitted to the Image J $\text{\textcircled{R}}$ software to analyze the amount of glandular stroma present in each gland. In addition, observational analysis were performed by using optical microscopy to determine the morphological characteristics of gland. Our results show that the main microscopic differences between the glands was about the ducts: in the number, shape and size. Another difference was the amount of glandular stroma, this difference, particularly evidenced by the marking of Mallory's trichrome stain and quantified by Image J $\text{\textcircled{R}}$ software. The macroscopic differences can say that their main differences are in the form and size.

Keywords: Exorbital Lacrimal gland, parotid gland, compared morphology, Anatomy of the Rat.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 REVISÃO DE LITERATURA	8
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
4 RESULTADOS	14
4. 1 Análise macroscópica	14
4. 2 Análise Microscópica.....	15
5 DISCUSSÃO	24
6 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28
ANEXO 1	30
ANEXO 2	33
ANEXO 3	34

1 INTRODUÇÃO

Aqueles pesquisadores que se dedicam ao estudo aprofundado das glândulas salivares, e utilizam roedores como modelos laboratoriais, enfrentam um grande problema na caracterização efetiva da glândula parótida. Isto se deve à proximidade anatômica e semelhança macro e microscópica da glândula parótida com a glândula exorbital lacrimal no animal

A literatura disponível sobre a descrição anatômica e histológica comparativa entre as duas glândulas é muito escassa, principalmente no que se refere à estrutura da glândula exorbital lacrimal. São muito poucos os que tratam especificamente deste aspecto comparativo. Além disso, quanto às glândulas lacrimais de roedores, poucas são as informações disponíveis. Este conhecimento é de grande importância, pois, segundo LEMULLOIS (1996), os estudos dos mecanismos regulatórios das funções das glândulas lacrimais usam a glândula exorbital lacrimal do rato como modelo. Quanto à estrutura das glândulas salivares maiores, a literatura tem mostrado que existe uma extensa variação entre as espécies animais e mesmo dentro da mesma espécie, sendo a parótida a glândula que apresenta menores diferenças (ALEXANDER et al., 1972). Estudos comparativos entre os dois órgãos são necessários, a fim de serem estabelecidas abordagens cirúrgicas precisas e análises microscópicas corretas, pois como se observa, as dificuldades de uma correta identificação são frequentes.

Portanto, o objetivo geral deste trabalho foi descrever aspectos diferenciais da glândula parótida e glândula exorbital lacrimal de ratos (*R. norvegicus* sp.) e de camundongos (*M. musculus* sp.), tanto macroscopicamente quanto microscopicamente.

Foram nossos objetivos específicos: estabelecer pontos anatômicos de referência para que seja possível a diferenciação macroscópica entre as glândulas; descrever os aspectos microscópicos das glândulas quanto à forma e tamanho de estruturas secretoras, à forma e tamanho de ductos e à análise do estroma glandular.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEP-UFRGS 2007997).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Sabe-se que a glândula parótida em humanos está localizada abaixo do arco zigomático, abaixo e à frente do meato acústico externo, na frente do processo mastóide, sobre o músculo masseter e atrás do ramo da mandíbula. Tem a forma de uma pirâmide invertida com três faces. Está estreitamente relacionada com o nervo facial (VII par craniano). Seu ducto, também denominado ducto de Stenon, emerge da face anterior e tem cerca de 5 cm de comprimento. Localiza-se abaixo do arco zigomático, tem um trajeto anterior sobre o músculo masseter. Na borda anterior deste, o ducto dobra-se medialmente quase em ângulo reto sobre o corpo adiposo da bochecha e perfura o músculo bucinador, desembocando no vestíbulo bucal, na altura do segundo molar superior na papila parotídea (KATCHBURIAN E., ARANA, 2004). Já nos roedores não é uma estrutura compacta e localiza-se bem atrás da orelha e abaixo da superfície ventro lateral do pescoço onde se localiza a veia facial posterior e está em contato com os linfonodos do pescoço. Sua extremidade posterior alcança o ombro e cobre a outra metade da clavícula (JUNQUEIRA, 1947).

A glândula exorbital lacrimal está muito próxima com sua borda anterior e cobre o começo do ducto da parótida. A glândula lacrimal no roedor difere da glândula lacrimal no humano; o rato possui três pares de glândulas lacrimais maiores, a Harderiana, e dois pares de glândulas que formam uma secreção aquosa, a glândula exorbital e a glândula infraorbital (JUNQUEIRA, 1947).

Um pouco abaixo e bem à frente da orelha está a glândula exorbital lacrimal (WALCOTT et al., 2005). A exorbital localiza-se lateralmente e superficialmente ao músculo masseter e da sua borda antero-dorsal o ducto vai em direção para a região dorso-lateral do olho onde se une com o ducto da glândula lacrimal intraorbital, antes de abrir-se na conjuntiva. A corda lacrimal é uma estrutura fibrosa que se estende entre a exorbital lacrimal e a órbita. O produto da glândula lacrimal é um fluído que hidrata e lubrifica a superfície ocular e transporta proteínas específicas das lágrimas (JUNQUEIRA e MARTINS, 1947).

Microscopicamente, a parótida é uma glândula cujas unidades secretoras terminais são do tipo ácino, constituídas por células serosas, que apresentam contorno esférico e são constituídos por células de forma piramidal, citoplasma basófilo e núcleo arredondado, localizado no pólo basal. (AVERY, 1994).

Os ductos intercalares são particularmente alongados e ramificados. Os ductos estriados também são muito desenvolvidos, e responsáveis pela modificação iônica do fluído salivar primário sintetizado, enquanto que os ductos excretorios terminais transportam o fluído até a cavidade oral. O estroma, composto por tecido conjuntivo, apresenta tecido adiposo em seu interior, o qual aumenta com a idade (PINKSTAFF, 1980)¹. Também apresenta um ou mais linfonodos que foram incorporados durante o desenvolvimento da glândula (AVERY, 1994). Sua excitose é estimulada tanto por ramos de nervos simpáticos quanto parassimpáticos do sistema autônomo (RIBEIRO et al., 2001).

Em roedores, a glândula Parótida é puramente serosa, sendo constituída por ácinos e ductos (intercalares, estriados e excretorios) que formam o parênquima, e por um estroma constituído por tecido conjuntivo, muito semelhante à descrição da mesma em humanos (SUZUKI et al., 2003).

Os ácinos são células citologicamente caracterizadas como típicas células serosas contendo grânulos acidofílicos. Em nível ultra-estrutural, essas células possuem muitos grânulos secretórios elétron-densos nas regiões apical e supranuclear do citoplasma, estando o complexo de Golgi situado também nessa região (SIMSON, 1969). O complexo de Golgi é composto por 4 ou até 7 pares de membranas cisternas empilhadas com algumas pequenas vesículas encontradas próximo à face interna. Observam-se pequenos segmentos, formas vesiculares e disposições lamelares de retículo endoplasmático rugoso extensamente distribuídos através do citoplasma.

Terminações nervosas são observadas entre as células acinares adjacentes (REDMAN et al., 1970)². As células epiteliais dos ductos intercalares possuem alguns grânulos elétron-densos de tamanho variado na região apical e supranuclear. O complexo de Golgi com vacúolos é bem desenvolvido na região supranuclear. Os ductos estriados são formados por células epiteliais com pequenos grânulos elétron-densos periféricos e alguns grânulos periféricos de alta elétron densidade nas regiões apical e supranuclear. O complexo de Golgi, com vacúolos e lamelas está localizado na região supranuclear (SIMSON, 1969).

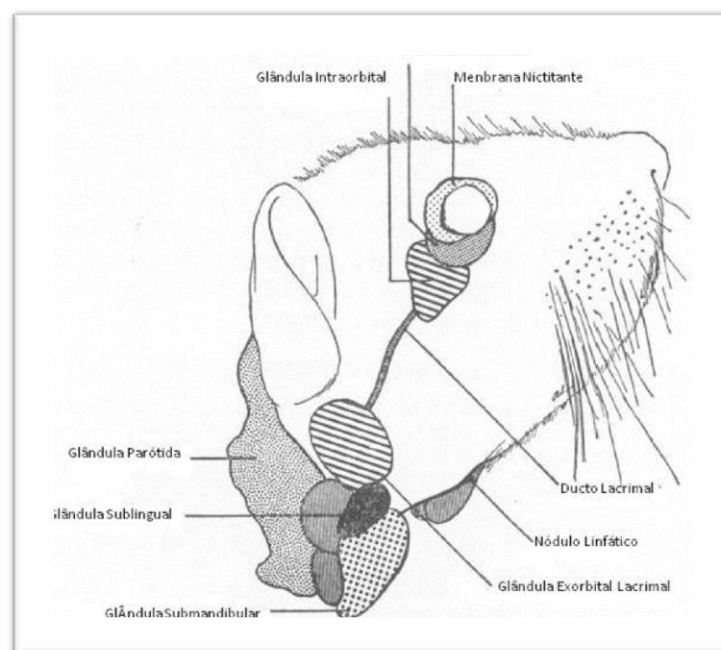
¹ PINKSTAFF, C.A., The Cytology of salivary glands, *Rev. Cytol.*, v. 63, no. 1, p 141–261, West Virginia, 1980, Apud RIBEIRO T. C. C., 2001.

² REDMAN, R.S.; SREEBNY, L.M., The prenatal phase of the morphosis of the rat parotid gland. *Anat. Rec.*, v.168, no. 2, p.127 – 137 New York, 1970, Apud RIBEIRO T. C. C., 2001.

Um fato interessante a respeito da parótida do rato e do camundongo é sua extremamente lenta morfogênese pré-natal, que resulta numa morfologia rudimentar da glândula ao nascimento (PINKSTAFF, 1980)³. Já a glândula exorbital lacrimal é uma glândula do tipo acinoso composto, seu epitélio secretor é constituído por células piramidais, com núcleo no terço inferior da célula, com padrão oscilante da sua afinidade tintorial e volume. O citoplasma tem aspecto característico, pois apresenta uma região apical clara, cheia de grânulos finos levemente basófilos, observando-se na sua região basal, intensa basófila, apresentando aspecto estriado típico. Os ductos excretores, inicialmente delgados e constituídos por células epiteliais achatadas, vão confluindo e aumentando de diâmetro. Esses ductos mais grossos são revestidos internamente por um epitélio cúbico ou cilíndrico e externamente por tecido conjuntivo. Reúnem-se em um ducto único que termina após anastomose com ducto da glândula intraorbital, na conjuntiva (RÍOS et al., 2004).

A disposição anatômica das glândulas foi descrita por BENSON (1964) e podemos observar na figura1.

Figura 1. Desenho da anatomia do rato.



Fonte: Benson, 1964.

³ PINKSTAFF, C.A., The Cytology of salivary glands, *Rev. Cytol.*, v. 63, no. 1, p 141–261, West Virginia, 1980, Apud RIBEIRO T. C. C., 2001.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

ANÁLISE MACROSCÓPICA: Foram utilizados 7 ratos (*R. norvegicus* sp.) machos da raça Wistar e 6 camundongos (*M. musculus* sp.) também machos, conforme citado na literatura (PERINGER, 2008), obtidos das colônias do CREAL da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, com 60 dias de vida e pesando entre 300 a 400 gramas. Foi administrado ração comum (Nutrival, CR-1, Nutrival Nutrientes – Curitiba – Brasil) e água *ad libitum* para todos os ratos. Os animais foram acomodados em leitos Esterilizados (Vet-Sul, Porto Alegre, Brasil) e ventilação adequada com temperatura oscilando entre 20 a 22°C, em caixas plásticas estéreis, com cobertura de metal, armazenando três animais cada caixa. Os Ratos foram expostos à luz apropriada e ciclo escuro (12 horas de luz e escuridão).

Os animais foram anestesiados com os seguintes anetésicos: Cloridrato de Cetamina 10%, (Ketalar, Parke Davis, São Paulo, Brazil) 0,1mg /100g IM e Xilazina 2%, (Rompum, Bayer S.A., São Paulo, Brasil) 0,1mg/100g IM (Fig. 2), a anestesia foi aplicada utilizando-se a técnica intramuscular(Fig. 3). Após este procedimento, os animais foram posicionados na mesa cirúrgica em decúbito dorsal com extensão cervical (Fig 3).

Antes da remoção das glândulas, foram observados pontos anatômicos referenciais para a identificação da Glândula Parótida bem como para a identificação da Glândula Exorbital Lacrimal. Após a anestesia iniciou-se o procedimento cirúrgico, a incisão foi feita do mento até o osso esterno, verticalmente na linha média e na altura do esterno foram realizadas duas incisões laterais horizontais (Fig. 4 e 5). A pele e o tecido celular subcutâneos foram divulsionados de maneira a expor todas as glândulas salivares, essa divulsão foi prolongada até o pavilhão auditivo de maneira a expor perfeitamente a Glândula Exorbital Lacrimal (Fig 6). Após a divulsão total dos tecidos, já com as glândulas perfeitamente expostas, observou-se a posição anatômica das mesmas (Fig. 7), já descritas na literatura (BENSON, 1964). Uma vez removidas as glândulas, o animal foi submetido à eutanásia. Os animais foram descartados em seu local de origem (colônias do CREAL da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil) após a realização dos procedimentos.

ANÁLISE MICROSCÓPICA: As peças retidas do procedimento cirúrgico, 26 glândulas parótidas e 26 glândulas exorbitais lacrimais, foram fixadas em

solução de Metacarn por um período de 3 horas. Após esse período, as peças foram submetidas ao processamento de inclusão em parafina (Biotec®, Porto Alegre, Brasil). As peças passaram por quatro baterias de álcool absoluto durante 30 min cada, duas baterias de xilol durante 30 min cada e duas baterias de parafina à 60°C durante 1 hora e 15 min cada. Após o processamento as peças foram acondicionadas em embalagens de papel Kraft e armazenadas sob refrigeração. As peças incluídas foram submetidas a cortes de aproximadamente 5 µm cada, e separadas em lâminas de vidro. Utilizou-se a coloração de Hematoxilina-Eosina visando a observação de microestruturas do tecido e Tricrômico de Mallory que é uma solução corante para o estudo de tecido conjuntivo, contendo os corantes fucsina ácida, azul anilina (azul de metila), orange G e acrescido do ácido fosfotungstico em sua composição, colore as fibras de colágeno de azul, fibroglia, neuroglia e fibras musculares de vermelho, e fibras de elastina de rosa ou amarelo. Também é chamado de corante de azul anilina de Mallory ou corante de Mallory triplo. Este corante foi utilizado com a intenção de quantificar o estroma glândular. Além destas duas colorações acima citadas, os cortes histológicos também foram submetidos à coloração histoquímica de PAS (ácido periódico de Schiff) que é um método de coloração usado para detectar glicoproteínas nos tecidos. A reação do ácido periódico oxida seletivamente os resíduos de glicose, cria aldeídos que reagem com o reagente de Schiff e cria uma cor púrpura-magenta. Os tecidos que adquirem esta cor são considerados PAS positivos.

As lâminas resultantes foram examinadas em microscópio de luz binocular da marca Olympus Modelo BX41TF e foram tomadas fotomicrografias (Unidade de Morfometria e Histostometria, projeto FAPERGS Proap nº04/2005, processo 0410882, sob responsabilidade do Prof. Manuel Sant'Ana Filho vinculado ao programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS) das diversas estruturas com o objetivo de interpretação e descrição das mesmas. Foram analisadas três áreas diferentes de uma mesma amostra e feita uma média destas três áreas. No total, três amostras de cada glândula foram analisadas, sendo que cada animal teve ambas as glândulas, parótida e exorbital lacrimal, utilizadas para análise. Ao todo, sete ratos e seis camundongos foram utilizados, somando um total de 72 amostras, as quais foram submetidas à análise do software. Cada glândula foi seccionada em duas partes e um corte do centro e dois das extremidades foram utilizados para a confecção das lâminas. As imagens obtidas das

lâminas submetidas à coloração de Tricrômico de Mallory foram adicionadas ao softwer Image J[®] e analisadas pelo mesmo. Os resultados obtidos pela análise do softwer Image J[®] foram submetidos a análise estatística, cálculo do teste t de student. Considerando-se um valor de $p < 0.05$ como estatisticamente significante.

Figura 2- Seringa e anestésicos



Fonte: Do autor.

Figura 3-Anestesia Intramuscular



Fonte: Do autor.

Figura 4- Demarcação das incisões



Fonte: Do autor.

Figura 5-Incisões laterais e Mento



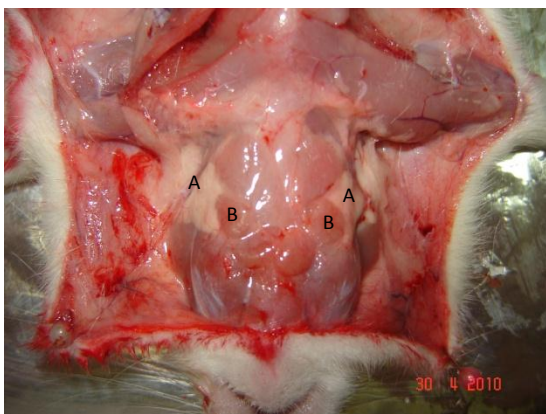
Fonte: Do autor.

Figura 6- Divulsão dos tecidos



Fonte: Do autor.

Figura 7- Glândulas expostas, em A glândulas parótidas e em B glândulas exorbitais lacrimal



Fonte: Do autor.

4 RESULTADOS

A análise dos resultados foi dividida em dois momentos, inicialmente foi feita uma análise macroscópica e posteriormente uma análise microscópica.

4.1 Análise macroscópica

Foi observado no momento da realização do acesso cirúrgico que a glândula parótida apresenta-se como uma estrutura difusa, com limites anatômicos irregulares e com aparência de tecido adiposo. Além disso, apresenta cor amarelada, também semelhante a tecido adiposo, e posição posterior à glândula exorbital lacrimal, estando intimamente relacionada a ela (Figura 8A, 9 A e 10A).

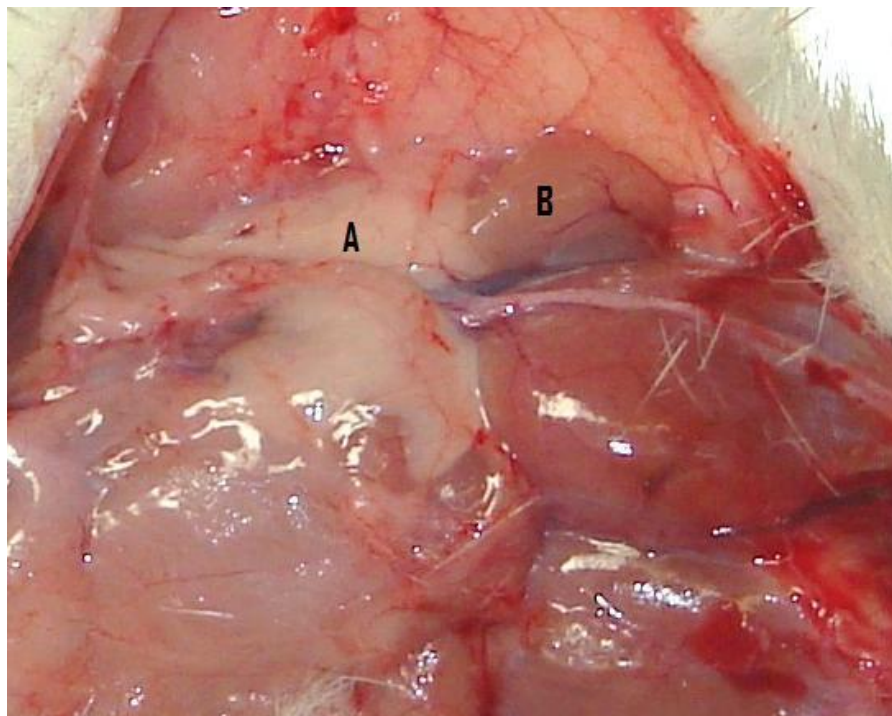
Foi observado, no momento da realização do acesso cirúrgico, que a glândula lacrimal exorbital do roedor apresenta-se como uma estrutura bem delimitada e de limites regulares, com coloração diferenciada da glândula parótida, tendendo ao pardo, e relacionando-se com o ducto da parótida, estando assentada sobre ele e facilmente separável do mesmo (Figura 8B, 9B e 10B).

Figura 8- Acesso cirúrgico expondo as glândulas Parótida (A) e Exorbital Lacrimal (B).



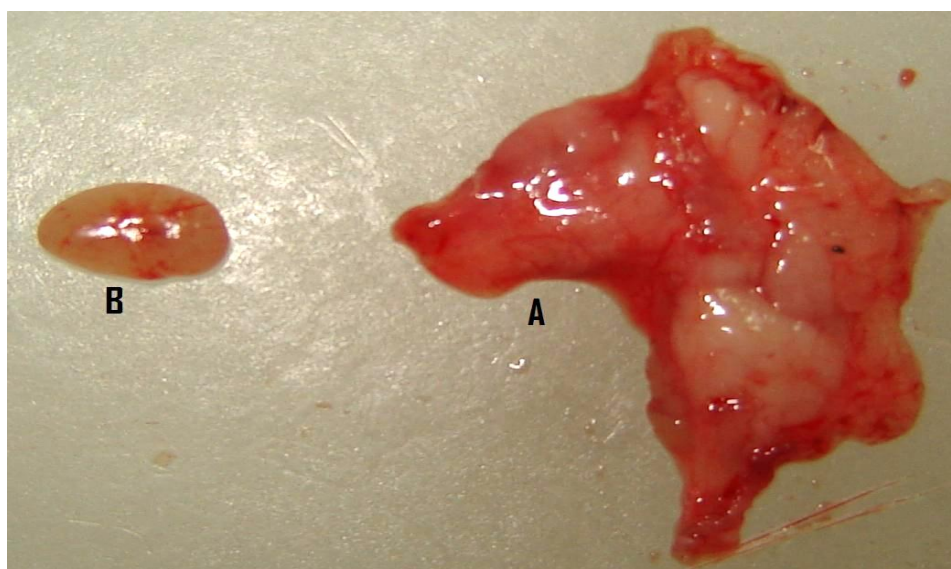
Fonte: Do autor.

Figura 9- Acesso cirúrgico expondo as glândulas Parótida (A) e Exorbital Lacrimal (B).



Fonte: Do autor.

Figura 10- Glândula Parótida(A) e Exorbital Lacrimal (B) após serem removidas.



Fonte: Do autor.

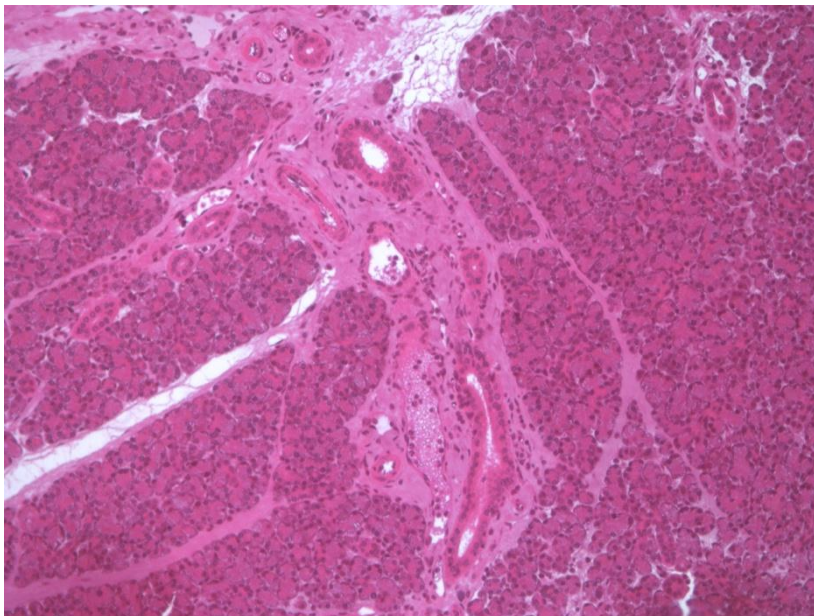
4. 2 Análise Microscópica

A partir das lâminas submetidas à coloração de Hematoxilina e Eosina, foi possível a caracterização histomorfológica das estruturas glandulares.

Na análise das lâminas obtidas a partir das amostras de glândula parótida, retiradas através do procedimento cirúrgico, observou-se que a glândula possui estrutura de septos conjuntivos, dividindo a glândula na estrutura clássica da parótida, já descrita pela literatura (AVERY, 1994) de

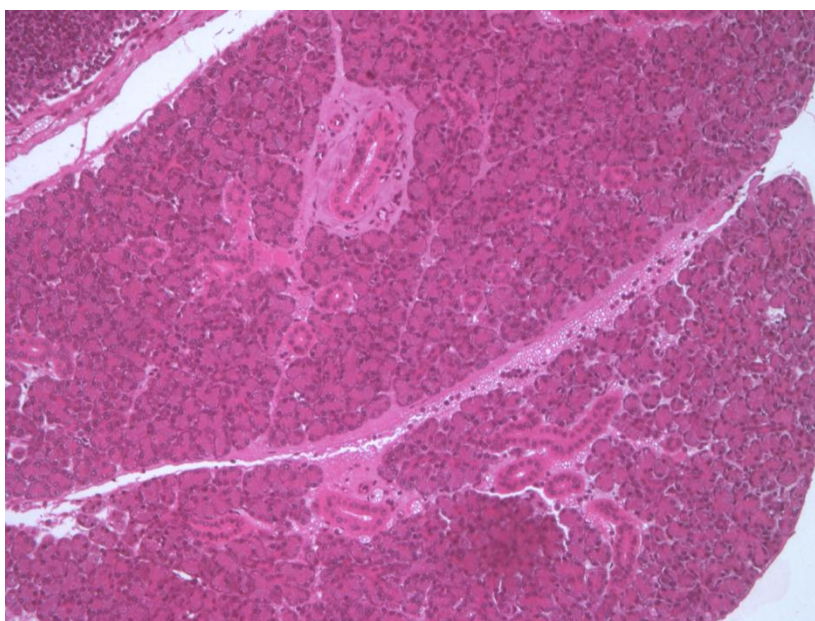
lóbulos; possui uma grande quantidade de ductos quando comparada à exorbital lacrimal; seus lóbulos são bem marcados, os ácinos bem cromófilos permeados por muitos ductos. Apresenta muito estroma, em forma de traves conjuntivas que se estendem por toda a extensão do parênquima. Enfim, tem um conteúdo predominantemente seroso (figuras 11 e 12).

Figura 11- Fotomicrografia da morfologia estrutural da glândula parótida do rato Winstar em coloração de Hematoxilina-Eosina. Em aumento de 100x



Fonte: Do autor.

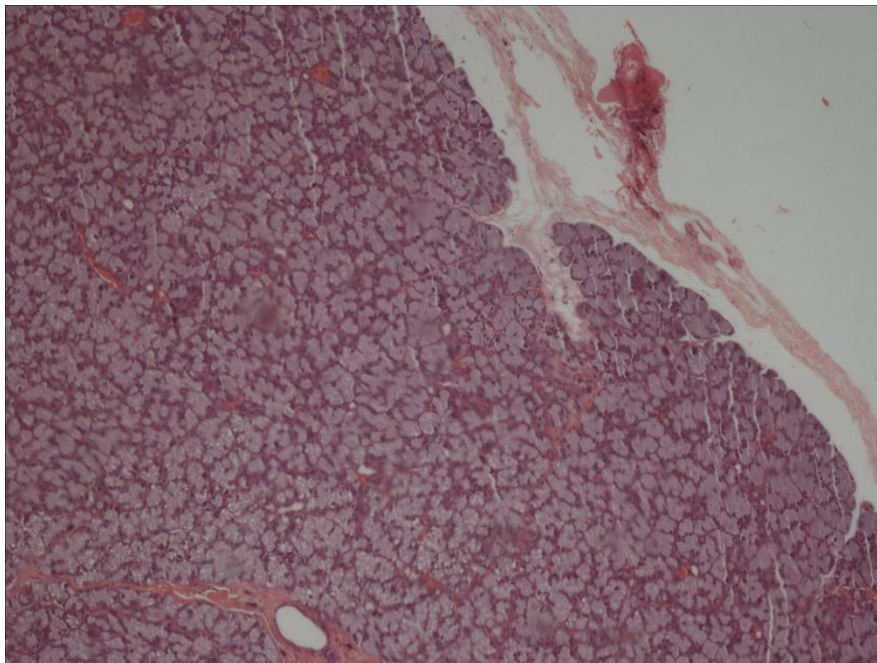
Figura 12 - Fotomicrografia da morfologia estrutural da glândula parótida do camundongo em coloração de Hematoxilina-Eosina. Em aumento de 100x



Fonte: Do autor.

Na análise das lâminas obtidas a partir das amostras de glândula exorbital lacrimal, retiradas através do procedimento cirúrgico, observou-se que a glândula possui uma estrutura que não é vinculada a septos conjuntivos extensos nem numerosos. Possui uma quantidade de ductos muito inferior se comparado com a parótida, apresentando cromofobia e estruturas glandulares maiores. Os ductos possuem luz bem ampla com células cubóides no interior de seu revestimento, as células das estruturas secretórias terminais apresentam núcleos arredondados e se dispõem na periferia com nítida diferença na atividade tintorial, como podemos observar na figura 13.

Figura 13 - Fotomicrografia da morfologia estrutural da glândula lacrimal do rato Wistar em coloração de Hematoxilina-Eosina. Em aumento de 100x.



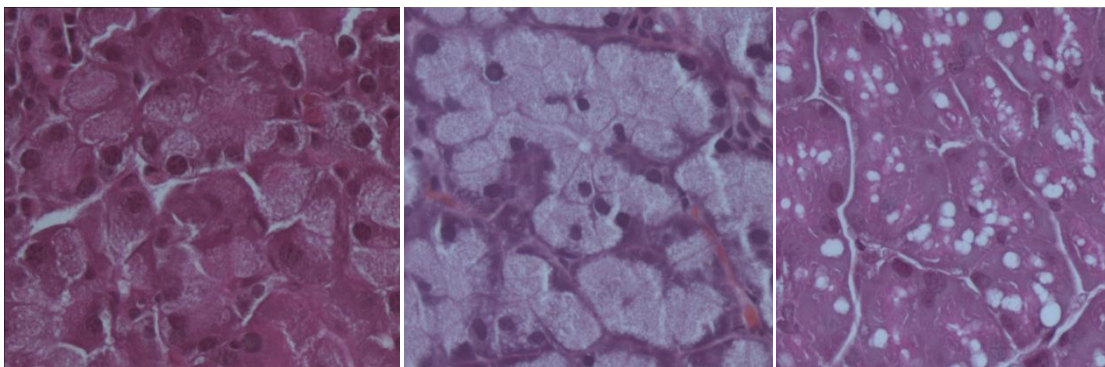
Fonte: Do autor.

O parênquima glandular apresenta estruturas com diferentes momentos secretórios, como pode ser observado nas figuras 14 e 15, algumas estruturas apresentam-se muito vacuolizadas enquanto que outras não têm presença nem de vacúolos nem de grânulos intracelulares.

As estruturas secretórias terminais apresentam aspecto morfológico variados. Estas variam desde estruturas de tamanho menor, com células de citoplasma intensamente corado e cromófilo, com núcleos arredondados na porção basal, passando para uma fase intermediária onde as estruturas terminais são maiores, com células menos cromófilas, com aspecto do citoplasma levemente granular e núcleos basais, até um estágio final onde

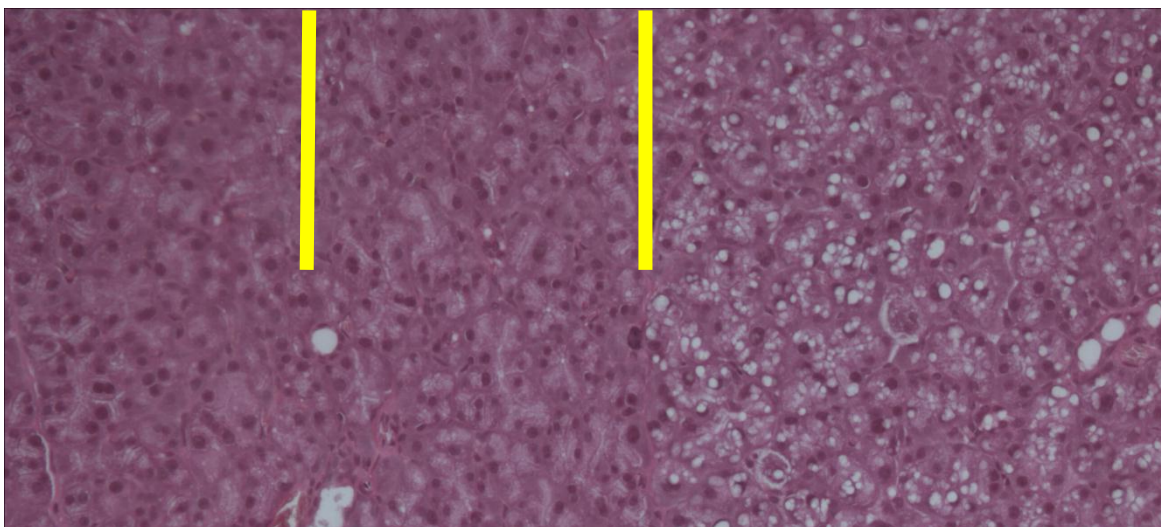
encontramos vacúolos de secreção intracitoplasmático e núcleos mais achatados na periferia .

Figura 14 - Fotomicrografia da morfologia estrutural da glândula lacrimal de camundongo em coloração de Hematoxilina-Eosina. Em aumento de 400x mostrando diferentes momentos do parênquima glandular, diferentes momentos de vacuolização citoplasmática.



Fonte: Do autor.

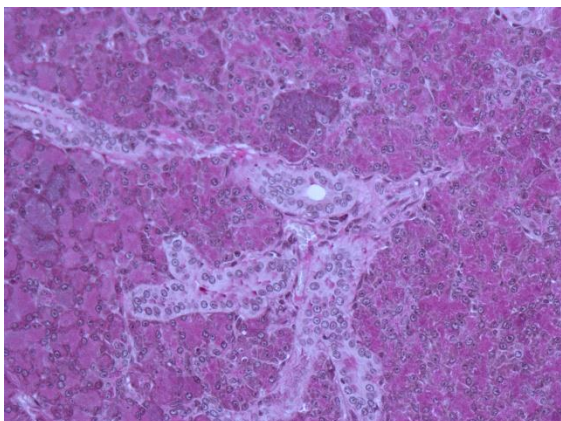
Figura 15 - Fotomicrografia da morfologia estrutural da glândula lacrimal de rato em coloração de Hematoxilina-Eosina. Em aumento de 200x mostrando diferentes momentos do parênquima glandular em uma mesma glândula, as linhas amarelas mostram os limites entre os diferentes ácinos.



Fonte: Do autor.

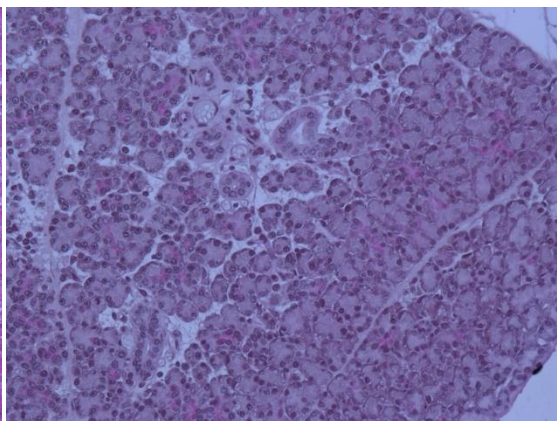
Para caracterizarmos os vacúolos e seu conteúdo, com a hipótese de que poderia ser seu conteúdo glicoproteico, os cortes obtidos também foram submetidos à coloração de PAS (Ácido Periódico de Schiff), para evidenciar possível presença de glicoproteínas. Os resultados obtidos (figuras 16 e 17) mostraram que não houve marcação nos tecidos.

Figura 16 - Fotomicrografia da glândula parótida de rato em coloração de PAS. Em aumento de 400x.



Fonte: Do autor.

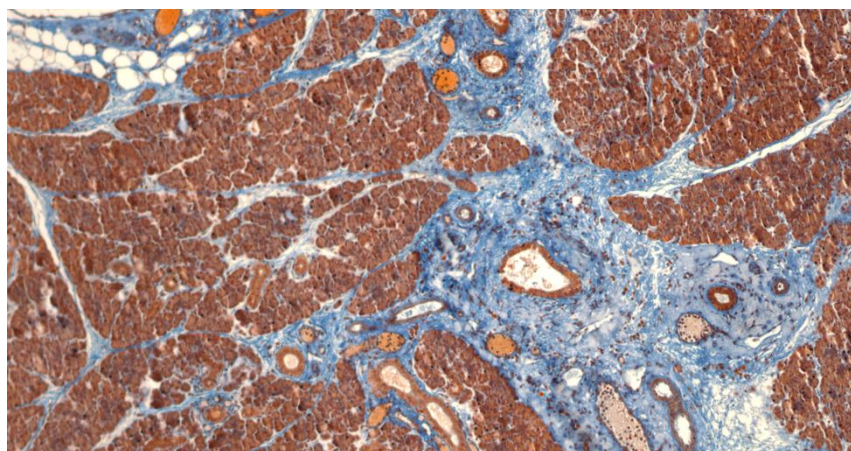
Figura 17 - Fotomicrografia da glândula exorbital lacrimal de rato em coloração de PAS. Em aumento de 400x.



Fonte: Do autor.

A partir das lâminas submetidas à coloração de Tricrômico de Mallory foi possível realizar uma análise quantitativa do estroma glandular utilizando o software de análise histológica Image J®.

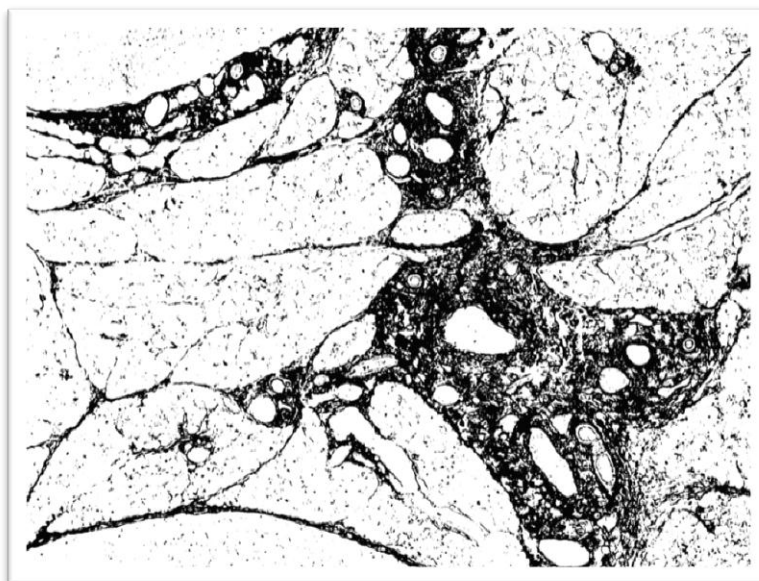
Figura 18 - Fotomicrografia de Parótida de rato em coloração de tricrômico de Mallory. Em aumento de 100x.



Fonte: Do autor.

O tecido conjuntivo é marcado em azul nesta coloração, com o auxílio do software foi possível quantificar a área marcada em azul, pois o mesmo reconhece a tonalidade da coloração e assim é possível calcular a porcentagem de área ocupada por tecido conjuntivo em cada amostra. Após ser submetido à análise do software, obtivemos uma imagem como a figura 19, e também a porcentagem de área marcada, expressa em números, como vemos nas tabelas 1, 2, 3 e 4.

Figura 19- Marcação do estroma glandular.



Fonte: Do autor.

Tabela 1- Porcentagem de estroma glandular marcado de três diferentes áreas de uma mesma amostra. Glândula Parótida de ratos.

Amostra	Porcentagem de área marcada
R1A	16,28%
R1B	12,77%
R1C	33,76%
R2A	34,88%
R2B	66,2%
R2C	32,01%
R3A	23,84%
R3B	21,38%
R3C	22,93%
R4A	44,27%
R4B	25,21%
R4C	34,81%
R5A	13,59%
R5B	23,14%
R5C	29,89%
R6A	39,29%
R6B	44,91%
R6C	31,5%
R7A	25,28%
R7B	27,61%
R7C	28,96%

Fonte: Do autor.

Tabela 2- Porcentagem de estroma glandular marcado de três diferentes áreas de uma mesma amostra.. Glândula Exorbital Lacrimal de ratos.

Amostra	Porcentagem de área marcada
R1A	0,65%
R1B	10,05%
R1C	22,4%
R2A	2,28%
R2B	2,58%
R2C	2,04%
R3A	2,47%
R3B	3%
R3C	3,07%
R4A	1,54%
R4B	4,88%
R4C	8,9%
R5A	3,57%
R5B	3,52%
R5C	2,05%
R6A	5,68%
R6B	4,67%
R6C	3,97%
R7A	4,34%
R7B	3,52%
R7C	2,11%

Fonte: Do autor.

Tabela 3- Porcentagem de estroma glandular marcado de três diferentes áreas de uma mesma amostra Glândula Parótida de camundongos.

Amostra	Porcentagem de área marcada
C1A	28,47%
C1B	21,37%
C1C	12,64%
C2A	20,11%
C2B	13,9%
C2C	28,31%
C3A	34,12%
C3B	22,25%
C3C	15,1%
C4A	15,77%
C4B	12,45%
C4C	13,49%
C5A	10,29%
C5B	19,32%
C5C	18,49%
C6A	15,54%
C6B	24,14%
C6C	28,77%

Fonte: Do autor.

Tabela 4 - Porcentagem de estroma glandular marcado de três diferentes áreas de uma mesma amostra. Glândula Exorbital Lacrimal de camundongos.

Amostra	Porcentagem de área marcada
C1A	8,46%
C1B	5,83%
C1C	3,31%
C2A	5,98%
C2B	8,24%
C2C	7,93%
C3A	2,95%
C3B	2,41%
C3C	3,56%
C4A	5,19%
C4B	4,75%
C4C	8,08%
C5A	4,54%
C5B	4,21%
C5C	7,36%
C6A	6,09%
C6B	6,8%
C6C	5,72%

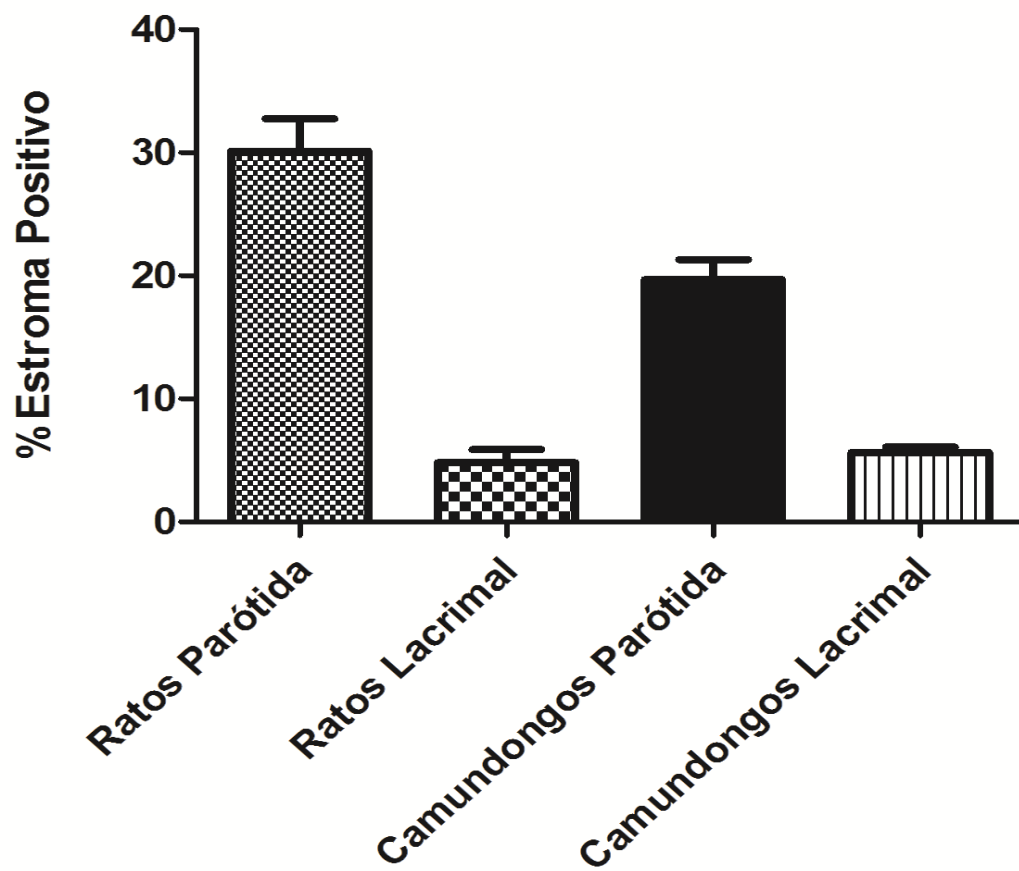
Fonte: Do autor.

Com o uso desta ferramenta foi possível determinar a porcentagem de estroma glandular presente em cada glândula e comparar, para podermos justificar nossa hipótese observacional..

A partir dos resultados obtidos em números (porcentagem) , foi realizada a análise estatística. Foi usado um teste t de Student pareado para calcular a significância estatística e o resultado foi um valor de $p < 0.01$ (ANEXO 3).

No Gráfico 1 podemos observar também, o resultado das análises estatísticas.

Gráfico 1 - Comparação entre a porcentagem de estroma presente nas glândulas parótida e exorbital lacrimal, em ratos e camundongos .



Fonte: Do autor.

5 DISCUSSÃO

Quanto às características macroscópicas, a literatura aponta que ambas as glândulas estão em posição anatômica muito semelhante, em íntimo contato (BENSON, 1964), o que foi constatado em nossa pesquisa. Este fato parece ser o principal motivo das dúvidas existentes por parte dos pesquisadores. Em vista desse problema, recomendamos que o acesso cirúrgico seja feito como descrito, obedecendo aos pontos anatômicos apresentados, numa correta incisão e divulsão dos tecidos subjacentes.

As glândulas também apresentam marcante diferença quanto à coloração e formato, sendo a parótida de cor amarelada, forma indefinida e limites irregulares e a exorbital lacrimal de cor parda, forma ovalada e limites regulares, facilmente destacáveis das estruturas vizinhas, o que foi observado em nosso estudo. Ressaltamos que, tomados esses cuidados, o pesquisador não estará sujeito a confundir as estruturas glandulares.

Quanto às características microscópicas, observou-se que a parótida apresenta estrutura secretória terminal do tipo acinar, sugerindo o seu conteúdo seroso, como relatado pela literatura disponível. Devido às características dos fluídos secretórios, as células na parótida possuem citoplasma cromófilo. Porém, na lacrimal exorbital encontramos regiões cromófobas, que estão associadas a um citoplasma granuloso ou vacuolizado e regiões cromófilas, que estão associadas a um citoplasma com ausência de grânulos e vacúolos intracelulares. Além disso, a glândula lacrimal exorbital apresenta algumas estruturas secretórias de tamanho aparentemente maior, provavelmente devido às alterações no conteúdo sintetizado, o que possivelmente é motivo de confusão entre os pesquisadores.

É importante destacar que os vacúolos já haviam sido descritos pela literatura (BENSON, 1964) como característica do citoplasma da glândula exorbital lacrimal, apresentando-se em diferentes tamanhos, sem informação do conteúdo destes vacúolos. Contudo, 20 anos depois, ROOMANS (1984), relacionou o balanço iônico de $K^+/Na^+/Cl^-$ com a formação dos vacúolos intracelulares e acrescentando que células acinares da mesma são ricas em íons Ca^{++} que estão localizados nos grânulos de secreção. Tudo isso nos faz crer, que o conteúdo da glândula lacrimal exorbital do rato apresenta uma composição celular diferente, o que lhe confere esta característica. Porém, um ano antes, GUDMUNDSSON et al. (1985) afirmou existir um componente

secretor nas células acinares da glândula exorbital lacrimal em roedores que é responsável pela formação de vacúolos intra-celulares contendo fluido lacrimal primário produzido pela glândula.

As informações descritas pela literatura nos apontam que a glândula exorbital lacrimal é o tecido primário associado com o sistema de secreção ocular imunológico, e responsável pela produção de imunoglobulinas destinadas à composição lacrimal, a qual é feita exclusivamente pela glândula lacrimal exorbital (CHEN et al,1997). No entanto, o aspecto morfológico variado de suas estruturas terminais e o citoplasma granuloso, que parece anteceder o aspecto vacuolizado, e que são encontrados em uma mesma glândula, não foi até o momento descrito, na literatura consultada, podendo ser estes aspectos a grande fonte de confusão por parte dos pesquisadores.

A partir de nossos achados, que mostraram a não marcação dos tecidos pelo PAS, indicando a ausência de conteúdo glicoproteico, associado à literatura disponível (CHEN et al,1997) podemos sugerir que o conteúdo destes vacúolos é exclusivamente protéico e está associado à secreção de imunoglobulinas que estão presentes no complexo imunológico da lágrima. Portanto, reafirmando o conceito de que tanto a glândula parótida quanto a exorbital lacrimal têm conteúdo seroso e/ou apenas proteico, excluindo também a ideia de que os vacúolos, presentes no citoplasma da última, contenham glicoproteínas. Outra diferença marcante é a presença do tecido conjuntivo abundante na parótida sob forma de traves conjuntivas que dividem o parênquima em lóbulos, enquanto que na lacrimal exorbital do rato e camundongo há escassez de estroma, o que foi evidenciado em nosso estudo por meio da utilização do softwer Image J[®], que a partir de imagens histológicas feitas com a coloração de tricrômico de Mallory, quantificou a presença de estroma nas duas glândulas, permitindo-nos concluir que a parótida apresenta cerca de 25% a mais estroma glandular do que a exorbital lacrimal.

A partir dos resultados obtidos em números (porcentagem), realizamos um análise estatística para comprovar se a diferença entre as quantidades de estroma presente nas amostras era significativa. Utilizamos um teste t pareado para calcular a significância estatística e o resultado foi um valor de $p < 0.0001$, o que representa uma diferença estatisticamente significativa.

Tal conclusão nos sugere que o aporte sanguíneo para exorbital lacrimal do roedor não precise ser tão intenso quanto o da parótida, e que a excreção de seu fluído é feita de maneira mais rápida e simples do que na glândula salivar. Além disso, a presença de numerosas traves conjuntivas na glândula parótida deve-se ao fato da necessidade de sustentação da estrutura glandular, que, como já foi dito, apresenta-se difusa e com limites irregulares, ao contrário do que se observa na glândula exorbital lacrimal que apresenta poucas traves conjuntivas e uma resistente cápsula fibrosa ao seu redor.

6 CONCLUSÃO

O resultado da análise das glândulas demonstrou que a principal diferença macroscópica entre elas refere-se à coloração, forma e tamanho.

Quanto às características microscópicas essas diferenças são marcantes quando observamos o tamanho e a forma das estruturas secretórias terminais, presença de tecido conjuntivo e características celulares, como forma do núcleo e características do citoplasma, evidenciando processos secretórios diferentes entre as mesmas.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, J.H.; VAN LENNEP, E.W.; YOUNG, J.A., Water and Electrocyte secretion by the exorbital lacrimal gland of the rat studied by micropuncture and catheterization techniques, **Pflügers Arch.** V. 337,no.4, p. 299-309, Berlin, 1972.

AVERY, K.J., **Oral development and histology**, 2nd ed., New York: Thieme Medical Publishers Inc., 1994.

BENSON, M. D.; WALTE R., **Acceleration of aging changes in the exorbital lacrimal gland of the female rat** North Carolina: Department of Pathology, School of Medicine, University of Chapel Hill, N.C, 1964.

CHEN, H. et al Structure and Composition of Rat Precorneal Tear Film, **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 38, no. 2, p. 381-387, St. Louis (USA), Feb. 1997

GUMUNDSSON, O. G. et al, The ocular secretory immune system of the rat. **Expl Eye Res** v. 40, no. 2, p. 231-238, London, Feb, 1985.

HUMPHREY, S. P.; WILLIAMSON, R. T., A review of saliva: normal composition, flow and function. **Prosthet Dent**, v. 85, n. 2, p. 162-165, St. Louis (USA), Feb. 2001.

IMAI, A. et al, The small GTPase Rab27B regulates amylase release from rat parotid acinar cells, **J Cell Sci**, v.117, pt.10, p. 1945-1953, London, 2004.

JUNQUEIRA, L.C.U., MARTINS, E.O., **Atlas de anatomia microscópica do rato**, São Paulo: Universidade de São Paulo, 141 p., 1947.

KATCHBURIAN, E.; ARANA V. **Histologia e embriologia oral: texto – atlas – correlações clínicas.** São Paulo: Panamericana, 2004.

LEMULLOIS, M.; ROSSIGNOL, B.; MAUDUIT, P. Immunolocalization of myoepithelial cells in isolated acini of rat exorbital lacrimal gland: Cellular distribution of muscarinic receptors. **Biol Cell**, v. 86, no. 01, p. 175-181, Paris, 1996.

PERINGER, S.A et al, Model to study gland regeneration/ development in rat: the expression of metalloproteinase- 9 and extracellular matrix proteins, **Scand. J. Lab. Anim. Sci.**, v. 35, no. 3, p.141-147,Denmark, 2008.

RIBEIRO, T.T.C.; CESTARI, T.M.; TAGA, R., Morphometric dimensions of the mouse parotid glands of both sexes, **J. Anat. Embryol.**, v. 106, n. 1, p. 27-34, Firenze, 2001.

RÍOS, J. D. et al, Age-dependent alterations in mouse exorbital lacrimal gland structure, innervations and secretory response. **Expel Eye Res**, v. 80, no. 4, p. 477-491, London, Apr. 2005.

ROOMANS, G. M., X-ray microanalysis of rat exorbital lacrimal gland. **Scan. Electron Microsc.**, pt. 2, p. 889-895, Chicago, 1984.

SIMSON, J. V., Discharge and Restitution of Secretory Material in the Rat Parotid Gland in Response to Isoproterenol, **Z. Zellforsch Mikrok. Anat.** , Vol 101, no. 2, p.175—191, Viena, 1969.

SUZUKI, S. et al, Fine Structure of the parotid and mandibular glands of the Cotton Rat- *Sigmodon hispidus* sp., **Esp. Anim.** v. 52, no. 5, p. 441-444, Tokyo, 2003.

TOLTOSA, E. M. C. et al, **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**, 2nd ed., São Paulo: Manole, 2003.

WALCOTT, B. et al, Fluid secretion and the Na – K – 2Cl cotransporter in mouse exorbital lacrimal gland, **Am. J. Physiol. Cell Physiol**, v. 289, no. 4, p. 860-867, Bethesda (USA), 2005.

ANEXO 1

Protocolos de Processamentos Histológicos de Rotina

1) Metacarn

Tempo de Fixação : 3 horas

Composição: 60% de Álcool metílico, 30% de Clorofórmio e 10% de Ácido acético

Inclusão das peças fixadas:

Lavar as amostras rapidamente em álcool etílico absoluto.

Banhos:

Álcool etílico absoluto por 30 minutos.

Álcool etílico absoluto por 30 minutos.

Álcool etílico absoluto por 30 minutos.

Álcool etílico absoluto por 30 minutos.

Xilol por 15 minutos.

Xilol por 15 minutos.

Xilol por 15 minutos

Paraplast por 45 minutos.

Paraplast por 45 minutos.

Paraplast por 45 minutos

Inclusão e identificação

2) Coloração de Hematoxilina e Eosina:

Xilol I por 30 minutos.

Xilol II por 30 minutos.

Álcool absoluto por 3 minutos.

Álcool 95% por 3 minutos.

Álcool 70% por 3 minutos.

Água corrente por 5 minutos.

Hematoxilina por 30 segundos.

Água corrente por 5 minutos.

Eosina por 60 segundos.

Água corrente por 5 segundos.

Álcool 95% por 3 segundos.

Álcool absoluto por 3 minutos.

Álcool absoluto por 3 minutos.

Álcool/xilol (50%cada) por 3 minutos.

Xilol I por 3 minutos.

Xilol II por 3 minutos.

3) Coloração por tricrômico de Mallory

Xilol I por 30 minutos.

Xilol II por 30 minutos.

Álcool absoluto por 3 minutos.

Álcool 95% por 3 minutos.

Álcool 70% por 3 minutos.

Água corrente por 5 minutos.

Tricrômico de Mallory por 8 minutos.

Água corrente por 5 minutos.

Eosina por 60 segundos.

Água corrente por 5 segundos.

Álcool 95% por 3 segundos.

Álcool absoluto por 3 minutos.

Álcool absoluto por 3 minutos.

Álcool/xilol (50%cada) por 3 minutos.

Xilol I por 3 minutos.

Xilol II por 3 minutos.

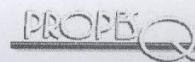
ANEXO 2



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs

**CARTA DE APROVAÇÃO**

Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs analisou o projeto:

Número: 13525

Título: Diferenças Macroscópicas e Microscópicas entre as Glândulas Parótida e Exorbital Lacrimal em Ratos

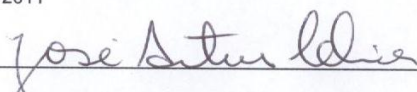
Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ANNA CHRISTINA MEDEIROS FOSSATI - coordenador desde 31/07/2008
DALVA MARIA PEREIRA PADILHA - pesquisador desde 31/07/2008
LUCAS TELLES DA SILVA - pesquisador desde 31/07/2008
ANA RITA VIANNA POTRICH - pesquisador desde 31/07/2008
GLAUCUS MAIDANA RODRIGUES - pesquisador desde 31/07/2008

Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs aprovou o mesmo, em reunião realizada em 07/04/2011 - Sala de reuniões do Gabinete do Reitor - 6º andar do prédio da Reitoria, por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 7 de Abril de 2011



JOSE ARTUR BOGO CHIES
Coordenador da comissão de ética

ANEXO 3
TABELA DE RESULTADOS DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Resultados		
Ratos Parótida		
vs		
Ratos Exorbital acrimal		
paired t test		
P value	< 0.0001	
P value summary	***	
ns signif. different? (P < 0.05)	Yes	
one- or two-tailed P value?	Two-tailed	
t, df	t=8.769 df=39	
How big is the difference?		
Mean ± SEM of column A	30.12 ± 2.630 N=21	
Mean ± SEM of column B	4.832 ± 1.047 N=20	
Difference between means	25.29 ± 2.884	
95% confidence interval	19.45 to 31.12	
R squared	0,6635	
Test to compare variances		
F,DFn, Dfd	6.626, 20, 19	
P value	0,0001	
P value summary	***	
Variances significantly different?	Yes	
Number of values	21	21
Minimum	12,77	,54
25% Percentile	23,04	328
Median	28,96	,52
75% Percentile	34,85	828
Maximum	66,2	2,4
Mean	30,12	832
Std. Deviation	12,05	682
Std. Error	2,63	047
Lower 95% CI	24,63	641
Upper 95% CI	35,61	023

Camundongos Parótida		
vs		
Camundongos Lacrimal		
paired t test		
P value	< 0.0001	
P value summary	***	
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes	
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	
t, df	t=8.431 df=34	
How big is the difference?		
Mean ± SEM of column C	19.70 ± 1.606 N=18	
Mean ± SEM of column D	5.634 ± 0.4510 N=18	
Difference between means	14.06 ± 1.668	
95% confidence interval	10.67 to 17.45	
R squared	0,6764	
F test to compare variances		
F,DFn, Dfd	12.68, 17, 17	
P value	< 0.0001	
P value summary	***	
Are variances significantly different?	Yes	
Number of values	18	18
Minimum	10,29	2,41
25% Percentile	13,8	4,048
Median	18,91	5,775
75% Percentile	25,18	7,503
Maximum	34,12	8,46
Mean	19,7	5,634
Std. Deviation	6,813	1,914
Std. Error	1,606	0,451
Lower 95% CI	16,31	4,682
Upper 95% CI	23,08	6,585