UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ELEN DE SOUZA TOLENTINO

**Avaliação do fenótipo e da proliferação celular das estruturas ductiformes
no processo de envelhecimento de glândulas sublinguais humanas**

BAURU
2013

ELEN DE SOUZA TOLENTINO

**Avaliação do fenótipo e da proliferação celular das estruturas ductiformes
no processo de envelhecimento de glândulas sublinguais humanas**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru
da Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências no Programa de Ciências
Odontológicas Aplicadas, na área de concentração
Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. José Humberto Damante

Versão Corrigida

BAURU

2013

T575a Tolentino, Elen de Souza
Avaliação do fenótipo e da proliferação celular das estruturas ductiformes no processo de envelhecimento de glândulas sublinguais humanas / Elen de Souza Tolentino – Bauru, 2013.
101 p.: il.; 30cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. José Humberto Damante

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data: 22/04/2013

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 059/2010
Data: 06/11/2012

DEDICATÓRIA

A Deus,

Que me dá força para seguir.

Aos meus pais Adão e Sônia,

Que compreenderam e apoiaram as minhas escolhas.

Aos meus irmãos Lívia e Eduardo,

Que me acolheram nas horas difíceis.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que me guia, me protege e me levanta.

Aos meus pais, **Adão e Sônia**, pela compreensão, apoio e amor incondicional.

Aos meus irmãos, **Livia e Eduardo**, pelo companheirismo, atenção e cuidado.

A todos os meus familiares, pelo incentivo constante.

Ao meu orientador **Prof. Dr. José Humberto Damante**. Não encontro palavras para expressar minha profunda admiração ao exemplo de profissional e ser humano. Trata-se da mais fiel definição de o que é ser um *verdadeiro mestre*. Antes, uma inspiração. Hoje também um grande amigo.

Ao meu co-orientador **Dr. Cleverson Soares Teixeira** por dispensar seu precioso tempo com nosso trabalho.

Ao meu “eterno” orientador **Prof. Dr. Luiz Eduardo Montenegro Chinellato**, que sempre encontra uma palavra amiga para me incentivar e para me confortar.

Ao **Prof. Dr. Osny Ferreira Júnior**, que me abriu a “primeira porta” na FOB-USP.

À **Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Alvares Capelozza**, minha “mãezona” em Bauru.

À **Prof^a. Dr^a Izabel Regina Fischer Rubira-Bullen** e ao **Prof. Dr. Paulo Sérgio Silva Santos**, incansáveis e sempre à disposição dos seus alunos.

Aos professores da disciplina de Cirurgia, **Dr. Eduardo Santana, Dr. Eduardo Sanches Gonçalves, Dr. Renato Yassutaka Faria Yaedú e Dr. Paulo Sérgio Perri de Carvalho**.

À **Prof^a. Dr^a. Vanessa Soares Lara** pela contribuição na execução deste projeto.

Ao **Prof. Dr. Heitor Marques Honório e Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris** pelo auxílio na análise estatística deste trabalho.

À **Dr^a. Luciana Reis Azevedo** que tornou este e outros trabalhos possíveis.

Aos professores e funcionários do Departamento de Ciências Biológicas da FOB-USP (Disciplinas de Histologia e Anatomia), em especial ao **Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis, Prof. Dr. Rumio Taga, à Dr^a. Tânia Mary Cestari** e ao **Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo** pela contribuição neste trabalho e por “abrirem as portas” do departamento para que eu pudesse ali trabalhar.

Aos técnicos **Daniel** e **Everson** e demais funcionários da ANATOMED.

Aos funcionários do Departamento de Estomatologia: **Roberto, Andrea, Alexandre, Fernanda, Luciana, Josiane, Marília** e **Elza**. Trouxeram aos dias mais difíceis o auxílio e os momentos de descontração.

Aos meus companheiros de mestrado e doutorado **Gabriel Bernini, Camila Cardoso** e **Marcelo Poleti**. Começamos e finalizamos juntos essa incrível jornada. Já sinto saudades dos meus “irmãos de Bauru”.

Aos meus grandes amigos **Bruna Stuchi Centurion** e **Otávio Pagin**, por TUDO!

Aos meus amigos estomatologistas: **Thaís Imada, Kellen Tjioe, Marcelo Sampieri, Eduardo Dias Ribeiro, Julierme Ferreira, Nathália Bigelli, Cecília Barros, Luciana Fernandes** e **Ana Cláudia Araújo Pires**.

À amiga **Juliane Avansini**, que me acolheu em sua casa no começo dessa jornada e à amiga **Leslie Casas**, minha *roommate* e meu ombro amigo nas melhores e piores horas.

À minha parceira de viagens e agora de trabalho **Ana Regina Casaroto**.

Aos meus amigos da pós-graduação **Guilherme Cardia, Pablo Amoroso, Juan Ordoñez, Carolina Ortigosa, Heliton Lima** e **Kiki Freitas**.

Aos meus **pacientes** e aos **alunos da graduação**, com quem tanto aprendi. Obrigada pela confiança.

Aos **cadáveres**, sem os quais este e outros estudos não teriam sido possíveis.

A todos os professores e funcionários da FOB-USP.

À CAPES, pelo apoio financeiro durante o doutorado.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru**, na pessoa de seu diretor **Prof. Dr. José Carlos Pereira**.

E a **todos** que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

“Vence a ti mesmo e vencerás.”

(Autor desconhecido)

RESUMO

São várias as alterações microscópicas decorrentes do processo de envelhecimento das glândulas salivares, dentre elas o aumento no número de estruturas ductiformes. O objetivo deste trabalho é estudar o fenótipo e o índice de proliferação celular das mesmas. Sessenta glândulas sublinguais de cadáveres humanos foram divididas em dois grupos segundo a faixa etária dos indivíduos (0-30 anos e 61-90 anos). O fenótipo foi estimado pela imunomarcagem da citoqueratina 19 (CK 19), da proteína S-100 e pela evidência dos polissacarídeos mucina e glicogênio. A avaliação do índice de proliferação de células epiteliais das estruturas ductiformes se deu por meio da imunomarcagem do Ki-67. As técnicas histoquímicas consistiram no ácido periódico de Schiff (PAS) e Azul de Alcian pH 2,5. Em cada campo microscópico capturado foram contadas as estruturas ductiformes para estabelecer o perfil de marcação em percentual. A análise estatística foi realizada por meio dos testes “t” de Student, Mann-Whitney e correlação de Pearson ($p < 0,05$). Comparando os dois grupos, apenas a imunomarcagem para CK 19 mostrou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,033$), sendo sua expressão mais forte no grupo de idosos. Não houve diferença significativa entre os marcadores PAS e Azul de Alcian ($p = 0,270$). Nos dois grupos a imunomarcagem para CK 19 foi mais forte do que para S-100 ($p = 0,004$; $p < 0,001$), sendo a correlação entre os dois imunomarcadores ausente ($\rho = -0,163$; $p = 0,315$). Não houve imunomarcagem para o Ki-67 em nenhuma estrutura ductiforme. Concluiu-se que as estruturas ductiformes demonstram um perfil fenotípico ductal e não apresentam atividade proliferativa celular. Elas podem representar um processo regressivo com origem nos ácinos ou resultarem de metaplasia.

Palavras-chave: glândula sublingual, envelhecimento, imunoistoquímica.

ABSTRACT

Evaluation of the phenotype and the proliferation capacity of duct-like structures in the aging process of human sublingual glands

There are several age-related microscopic changes in the salivary glands, including the increase in the number of duct-like structures. The aim of this study is to evaluate the phenotype and the cell proliferation index of these structures. Sixty sublingual glands obtained from human cadavers were divided into two groups according to the individuals' age (0-30 and 61-90 years old). The phenotype was estimated by the immunostaining for cytokeratin 19 (CK 19), S-100 protein and by the disclosure of the polysaccharides mucin and glycogen. The cell proliferation index was determined by Ki-67 immunostaining. The histochemical techniques consisted of periodic acid-Schiff (PAS) and Alcian Blue pH 2.5. In each captured microscopic field, the duct-like structures were counted to establish the staining profile in percentage. Statistical analysis was done by Student's t-test, Mann-Whitney test and Pearson's correlation coefficient ($p < 0.05$). Comparing the two groups, only the immunostaining for CK 19 showed significant statistical difference ($p = 0.033$), with strongest expression in the elderly group. There was no significant difference between the markers PAS and Alcian Blue ($p = 0.270$). In both groups the immunostaining for CK 19 was stronger than for S-100 ($p = 0.004$; $p < 0.001$), but there was no correlation between the two immunomarkers ($p = -0.163$; $p = 0.315$). There was no immunostaining for Ki-67 in any duct-like structure. We concluded that the duct-like structures demonstrate a ductal phenotypic profile and do not present cell proliferation activity. They may represent a regressive process arising from acini or a result of a metaplasia.

Keywords: sublingual gland, aging, immunohistochemistry.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	DESENVOLVIMENTO E CRESCIMENTO DAS GLÂNDULAS SALIVARES	19
2.2	PROCESSO DE ENVELHECIMENTO DAS GLÂNDULAS SALIVARES	21
2.3	ESTUDOS IMUNOISTOQUÍMICOS DAS GLÂNDULAS SALIVARES NORMAIS	27
3	PROPOSIÇÃO	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	AMOSTRA	37
4.2	TÉCNICAS IMUNOISTOQUÍMICA E HISTOQUÍMICA.....	38
4.3	AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS	41
4.3.1	Avaliação do fenótipo.....	45
4.3.2	Avaliação da proliferação celular	47
4.3.3	Análise estatística	47
5	RESULTADOS.....	49
5.1	AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO	51
5.2	AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	67
6	DISCUSSÃO	69
6.1	POPULAÇÃO E AMOSTRA	71
6.2	DISCUSSÃO DA METODOLOGIA	71
6.2.1	Estruturas ductiformes e células acinosas.....	71
6.2.2	Marcadores imunoistoquímicos para estudo do fenótipo.....	72
6.2.3	Marcadores histoquímicos para estudo do fenótipo	73

6.2.4	Marcador imunoistoquímico para estudo da atividade proliferativa celular	73
6.3	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	74
6.3.1	Comparação entre grupos	74
6.3.2	Estudo do fenótipo.....	75
6.3.3	Estudo da proliferação celular	76
6.3.4	Considerações	77
7	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	85
	APÊNDICES	93
	ANEXOS	97

A horizontal strip of a histological section of prostate tissue, showing glandular structures and cellular details in grayscale.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Dentre as glândulas salivares maiores, as glândulas sublinguais, localizadas abaixo da mucosa do soalho bucal, são as menores e menos estudadas. Elas são glândulas mistas, com predominância mucosa, constituídas por ácinos mucosos, serosos e mistos. Em alguns pacientes desdentados inferiores parciais ou totais, com ausência de comprometimento sistêmico, tumefações no soalho bucal podem estar presentes, dificultando a adaptação de próteses inferiores e requerendo tratamento cirúrgico (CAMPOS, 1996; MANDEL e ROMÃO, 2004; IWAKI FILHO et al., 2006) (Figura 1). Iwaki Filho et al. (2006) sugeriram que havia relação com as glândulas sublinguais e que as tumefações deveriam ser consideradas como entidade nosológica e publicadas em livros de texto.

Figura 1- Tumefação bilateral do soalho da boca de uma mulher de 58 anos parcialmente desdentada (Iwaki Filho et al., 2006).

Alguns estudos já foram realizados na tentativa de esclarecer a causa dessas tumefações do soalho bucal e muitas hipóteses etiopatogênicas foram levantadas (CASTRO, 1995; CAMPOS, 1996; MANDEL e ROMAO, 2004; IWAKI FILHO et al., 2006; DOMANESCHI et al., 2007; SÁ, 2009). Elas já foram atribuídas a variações normais do soalho bucal resultantes da reabsorção do rebordo alveolar (CASTRO, 1995), hiperplasia da

glândula sublingual (CAMPOS, 1996; DOMANESCHI et al., 2007), hipertrofia (MANDEL e ROMAO, 2004) ou decorrentes do processo de envelhecimento geral das glândulas salivares (IWAKI FILHO et al., 2006). Como o envelhecimento foi aventado para explicar o fenômeno, outros estudos foram realizados com proposta de descrever o processo de envelhecimento nas glândulas sublinguais, buscando relacionar com as tumefações do soalho bucal. Eles mostraram que não há hiperplasia, mas sim atrofia da glândula sublingual com a idade, descartando, portanto, o envelhecimento para explicar essas tumefações. Aventaram a hipótese da maior elasticidade da língua e do soalho bucal nos portadores resultando em dobras no soalho da boca (AZEVEDO et al., 2005; MOREIRA et al., 2006; SÁ, 2009).

O envelhecimento das glândulas sublinguais é um processo dinâmico no qual o quadro microscópico se altera consistentemente. Apesar das diferentes metodologias empregadas nas investigações das alterações microscópicas nas glândulas salivares decorrentes do processo de envelhecimento, há um consenso de que ocorre atrofia de ácinos e aumento no número de ductos e/ou estruturas ductiformes (SCOTT, 1977a; SCOTT, 1980; DRUMMOND e CHISHOLM, 1984; De WILDE et al., 1986; KOMESU et al., 1986; SCOTT et al., 1986; DAYAN et al., 2000; AZEVEDO et al., 2005; IWAKI FILHO et al., 2006; MOREIRA et al., 2006; SÁ, 2009). O termo “estruturas ductiformes” tem sido adotado por não haver garantia de que sejam ductos verdadeiros, podendo representar o processo final de atrofia de ácinos (SCOTT et al., 1987; TAKAHASHI et al., 2002) e não uma proliferação de ductos.

Alguns autores acreditam que durante o envelhecimento ácinos atrofícos podem se assemelhar a ductos, sendo a distinção entre ambos bastante difícil ou mesmo impossível (SCOTT, 1977a, 1977b; SCOTT, 1980; DRUMMOND e CHISHOLM, 1984; SCOTT et al., 1987; BURFORD-MASON, et al., 1993; DAYAN et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2002; AZEVEDO et al., 2005; MOREIRA et al., 2006; SÁ, 2009), denotando que o próprio padrão morfológico das glândulas envelhecidas não é completamente estabelecido. Além de representarem, possivelmente, atrofia acinosa, estas estruturas podem resultar de agressões ao parênquima glandular, como por exemplo as obstruções por sialólitos, justificando, assim, a presença menos frequente em glândulas salivares de jovens.

As alterações moleculares das glândulas sublinguais durante o envelhecimento não são conhecidas. Nem ao menos se sabe a verdadeira constituição celular ou a origem das estruturas ductiformes. Em relação aos estudos imunoistoquímicos relacionados às glândulas salivares percebe-se que a maioria deles busca caracterizar os elementos epiteliais e/ou

mioepiteliais constituintes das mesmas (BORN et al., 1987; GEIGER et al., 1987; MARSHAK e LEITNER, 1987; BURFORD-MASON et al., 1993; BURGESS et al., 1996; IHLER et al., 1999; IHLER et al., 2002; TAKAHASHI et al., 2002) ou estudar processos patológicos como as neoplasias (ARAÚJO et al., 2000; CHEUK e CHAN, 2007; GOULART et al., 2011; DEMASI et al., 2012).

Fica evidente que a literatura relacionada às transformações das glândulas salivares com a idade não é abundante. Em seres humanos, os estudos são escassos e a glândula sublingual quase não é contemplada. Daí o presente trabalho em continuidade com estudos anteriores (AZEVEDO et al., 2005; IWAKI FILHO et al., 2006; MOREIRA et al., 2006; SÁ, 2009) onde pretendemos esclarecer se as estruturas ductiformes, que aumentam em número com o envelhecimento, são decorrentes de atividade proliferativa das células ductais, se resultam de atrofia acinosa, ou a associação de ambos.

A horizontal band of a grayscale micrograph showing a complex tissue structure, likely a histological section of an organ, with various cellular and fibrous components.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Desenvolvimento e crescimento das glândulas salivares

A descrição do desenvolvimento das glândulas salivares ajuda a compreender sua estrutura, que consiste em um parênquima com uma série de ductos que confluem para as porções secretoras terminais (TEN CATE, 2001). Cada glândula salivar é formada durante a vida fetal, em locais específicos da cavidade oral, por meio do crescimento de um botão do epitélio de revestimento e do mesênquima subjacente. A morfogênese das glândulas salivares é gradual e dividida em fases (broto, ramificação, canalização e citodiferenciação) que envolvem eventos coordenados e moléculas variadas. Durante essas fases ocorre a diferenciação dos tipos celulares que compõem as glândulas salivares: componente epitelial - células acinosas e ductais (basais e luminais) e componente mioepitelial - células mioepiteliais (BURGESS et al., 1996; IANEZ et al., 2008; AMANO et al., 2012). As células acinosas e ductais compõem a porção luminal enquanto células basais e mioepiteliais constituem a porção abluminal (IHRLER et al., 2002). Os ductos são subdivididos em intercalares (localizados próximos aos ácinos), estriados e excretorios terminais. Os ácinos secretorios e os ductos intercalares são envolvidos por células mioepiteliais, enquanto os ductos estriados e a porção condutora subsequente são suportados por células oxifílicas e basais (BURGESS et al., 1996; CHEUK e CHAN, 2007) (Figura 2).

Furuse et al. (2004) estudaram o desenvolvimento de glândulas salivares maiores e menores de fetos em diferentes períodos gestacionais. Nos primeiros estágios de desenvolvimento, fibras finas de colágeno dos tipos I e II foram observadas delineando as estruturas glandulares e delimitando a extensão do lóbulo futuro. Com o desenvolvimento glandular, o lóbulo foi gradualmente preenchido com colágeno e tecido glandular.

Figura 2 – Demonstração esquemática da constituição celular das glândulas salivares (modificado de Irhler et al., 2002).

Os estudos de glândulas salivares embrionárias *in vitro* fornecem informações consideráveis sobre o mecanismo da morfogênese glandular. O mesênquima no qual se desenvolvem os rudimentos glandulares produz um ou mais fatores que estimulam seu crescimento (BHASKAR, 1989). Os botões epiteliais originam um sistema de cordões celulares bastante ramificados, inicialmente sólidos, mas que, gradualmente desenvolvem uma luz em seu interior, transformando-se em ductos. As porções secretoras formam-se depois do sistema de ductos e se desenvolvem pela ramificação repetida e brotamento dos cordões celulares e ductos mais delicados. O processo parece estar relacionado à presença de microfilamentos constituídos pela proteína contrátil actina (BHASKAR, 1989). As células mioepiteliais têm função contrátil e, na glândula adulta, estão envolvidas no auxílio da secreção da saliva, localizando-se ao redor dos ácinos e porção intercalar dos ductos (BURGESS et al., 1996).

É importante ressaltar que a atividade fisiológica normal é fundamental para o crescimento apropriado das glândulas em desenvolvimento, bem como na manutenção da estrutura adulta e seu conteúdo enzimático (BHASKAR, 1989).

2.2 Processo de envelhecimento das glândulas salivares

Assim como a morfogênese, o envelhecimento das glândulas salivares é um processo complexo. Alguns estudos têm objetivado esclarecer qualitativa e quantitativamente os efeitos do envelhecimento nas glândulas salivares. Estes envolveram principalmente glândulas parótidas, submandibulares, labiais e palatinas, por meio da avaliação *post mortem* em humanos e estudos com animais. No que concerne ao estudo das alterações das glândulas sublinguais humanas com a idade, a literatura é escassa.

Em 1973, Waterhouse e colaboradores fizeram o primeiro estudo quantitativo avaliando a substituição do parênquima por tecido adiposo e tecido conjuntivo em glândulas submandibulares humanas com a idade. Os autores determinaram o volume relativo de constituintes teciduais das glândulas submandibulares em 42 indivíduos de uma série de 211 necropsias (6 em cada década de vida, com idades entre 5 e 84 anos). Uma redução gradual significativa do volume ocupado pelo parênquima glandular foi observada com a idade, devido a sua substituição por tecido conjuntivo e adiposo. Neste estudo, o maior volume ocupado pelo parênquima glandular foi de 76% (faixa etária 5-14 anos) e o menor 30% (faixa etária 75-84 anos). Houve perda de até 25% de volume de células secretoras entre a infância e a velhice. Os resultados evidenciaram que a diminuição das células do parênquima era decorrente do envelhecimento.

Em 1975, Scott estudou as diferenças entre o volume da glândula submandibular humana em relação ao gênero, idade e lado. Um total de 153 glândulas submandibulares foi obtido por meio de necropsias de indivíduos com idade variando de 16 a 95 anos. O autor relatou grande variação do volume glandular, não só entre indivíduos como entre os lados direito e esquerdo. Houve diferença estatisticamente significativa entre os gêneros, sendo as glândulas masculinas mais volumosas. Em mulheres idosas, foi observada redução estatisticamente significativa do volume glandular.

Em 1977, o mesmo autor realizou um estudo histológico quantitativo sobre as mudanças causadas pelo envelhecimento em glândulas submandibulares humanas. Uma glândula submandibular de cada uma das 96 necropsias foi utilizada e o total foi distribuído por gênero e idade em 3 grupos: 16-35 (jovem), 36-75 (meia-idade) e 76-95 (idoso). O autor observou que, durante oito décadas, os ácinos perderam cerca de 40% de volume em relação ao grupo jovem. Todavia, o volume de ductos sofreu um crescimento gradual em torno de

30% com o aumento da idade. Houve substituição contínua do parênquima por tecido fibroso e adiposo e aumento do volume dos vasos (SCOTT, 1977a). Este estudo foi seguido por outro (SCOTT, 1977b) que utilizou a mesma amostra, no qual se observou atrofia do epitélio acinoso decorrente da idade acompanhada por alterações estruturais nos tecidos fibroso e elástico e nas paredes de vasos sanguíneos. De acordo com o estudo, a isquemia decorrente da obstrução parcial dos vasos pode explicar a atrofia do parênquima e todos os fatores juntos explicaram a diminuição da função glandular com a senescência.

Em 1980, Scott realizou um novo estudo microscópico qualitativo e quantitativo em glândulas salivares labiais humanas. Os espécimes, obtidos em 70 necropsias, foram divididos em três grupos etários: 18-40 anos, 41-65 anos e 66-90 anos. Os efeitos do envelhecimento em glândulas labiais foram semelhantes àqueles encontrados em glândulas submandibulares. Ocorreu uma diminuição progressiva na proporção do volume glandular ocupado pelos ácinos, com correspondente aumento na proporção de ductos e tecido fibroso. Contudo, não foi observada diferença estatisticamente dignificante entre os gêneros.

Drummond e Chisholm (1984) fizeram um estudo qualitativo e quantitativo a respeito do envelhecimento das glândulas salivares labiais. Trinta e seis glândulas labiais de cadáveres entre 25 e 80 anos, de ambos os gêneros, foram avaliadas microscopicamente. Foram quantificados ácinos, ductos, tecido conjuntivo e outros tecidos. Houve redução na densidade do volume de ácinos e aumento na densidade do volume de ductos e tecido conjuntivo com a idade.

De Wilde et al. (1986) realizaram um estudo morfométrico das alterações microscópicas com o envelhecimento em glândulas labiais humanas. Sessenta e oito voluntários foram divididos em 7 grupos etários, de 10 a 79 anos. Os componentes glandulares quantificados foram ácinos, tecido fibroso, ductos excretórios interlobulares, vasos e infiltrado linfoplasmocitário difuso. A análise morfométrica foi realizada no computador e em microscópio óptico com diferentes objetivas e retículos. Atrofia acinosa, fibrose, hiperplasia e dilatação ductal foram achados comuns com a idade.

Em 1986, Komesu et al. estudaram as alterações morfológicas resultantes do envelhecimento das glândulas submandibulares de ratos. Quarenta ratos machos divididos em 4 grupos etários de 3, 6, 12 e 24 meses foram utilizados. Verificaram diminuição do parênquima, aumento aparente dos ductos e atrofia acinar. Os autores concluíram que o

envelhecimento parece provocar atrofia do parênquima por meio de isquemia, resultando em aumento de fibrose estromal.

Ainda em 1986, um estudo de Scott e colaboradores avaliou o efeito do envelhecimento em glândulas submandibulares e sublinguais de ratos. Dois grupos de ratos machos com idade entre 6 e 24 meses tiveram as glândulas submandibulares removidas e separadas das glândulas sublinguais. Observou-se que houve redução na densidade de volume dos ácinos, aumento dos ductos e tecido conjuntivo nas glândulas submandibulares. Não houve alterações volumétricas nas glândulas sublinguais. Os autores sustentaram que o envelhecimento biológico não ocorre de forma simultânea em todas as glândulas salivares.

Mintz e Mooradian, em 1987, realizaram análise morfométrica de glândulas sublinguais de ratos com 3,5; 12; 18 e 24 meses de idade. Ácinos, tecido conjuntivo intralobular e extralobular, vasos sanguíneos, ductos excretores, estriados e intercalares foram avaliados. As densidades de volume acinar, tecido conjuntivo e vascular permaneceram estáveis com a idade. A fração de volume ocupada por ductos aumentou, o mesmo ocorrendo com o aparecimento de metaplasia escamosa do epitélio ductal, focos de infiltrado linfocítico periductais e infiltração linfocítica periductal difusa.

Komesu et al. (1987) realizaram um estudo morfométrico dos ácinos das glândulas submandibulares de ratos. Houve redução do parênquima associada ao aumento de componentes estromais com a idade. Oncócitos, atrofia acinosa, diminuição de volume total e polimorfismo nuclear foram observados.

Ainda em 1987, Scott, Flower e Burns realizaram um estudo quantitativo das alterações microscópicas do envelhecimento em glândulas parótidas. Lóbulos superficiais de glândulas parótidas de 63 necropsias de indivíduos de ambos os gêneros foram distribuídos em quatro grupos etários de 17 a 90 anos. O estudo quantitativo encontrou uma redução de aproximadamente 32% do tecido acinoso entre a idade adulta e a velhice. O volume proporcional do componente ductal permaneceu estável nos quatro grupos.

Em 1989, Komesu et al. apresentaram um estudo morfométrico dos ductos, com a mesma metodologia utilizada em seu estudo anterior (KOMESU et al., 1986). Aumento aparente na proporção de ductos e núcleos com menor volume ou polimórficos foram

observados. Houve diminuição na altura das células dos ductos nos animais de idade avançada.

Vered et al. (2000) realizaram um estudo morfométrico das alterações do envelhecimento em 120 glândulas salivares labiais humanas obtidas por meio de necropsias. As amostras foram divididas em jovens (menores de 30 anos), adultos (30 a 60 anos) e idosos (maiores de 60 anos). Ácinos, ductos, tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos, infiltrado inflamatório e tecido adiposo foram os componentes quantificados. Houve considerável diminuição na densidade de volume das células acinosas seromucosas (49,3%) acompanhada por uma menor redução na densidade de volume das células acinosas mucosas (28,5%). De acordo com o estudo, este fato pode explicar a diminuição na secreção das glândulas salivares com a idade. Alterações nos ductos não foram estatisticamente significantes. Dos componentes do estroma, a densidade de volume de tecido adiposo foi o que mostrou maior crescimento, seguido pelo infiltrado inflamatório.

Dayan et al. (2000), seguindo a mesma metodologia do estudo anterior, avaliaram morfometricamente o envelhecimento em glândulas palatinas humanas. Houve redução na densidade de volume acinoso e aumento na densidade de ductos e componentes estromais. Os autores concluíram que estas alterações na histologia glandular podem estar relacionadas com as mudanças funcionais decorrentes do envelhecimento.

Dando início a presente linha de pesquisa, o trabalho de Iwaki Filho et al. (1999, 2006) especulou sobre a etiologia das tumefações do soalho bucal relacionadas à glândula sublingual em pacientes desdentados inferiores parciais ou totais (Figura 1), considerando idade cronológica, gênero, raça e lado de ocorrência, através de análise clínica e microscópica. Foram obtidas 24 peças contendo glândulas sublinguais de 19 pacientes (4 homens e 15 mulheres, com idades entre 48 e 74 anos), no período entre 1985 e 1999. O tratamento cirúrgico teve razões protéticas. Apesar do soalho bucal tumefacto clinicamente, 6 glândulas foram consideradas microscopicamente normais. Nas 18 glândulas restantes foram observados: atrofia acinosa, aumento no número de ductos e/ou estruturas ductiformes, fibrose intersticial, retenção de muco intraductal, discreto infiltrado mononuclear, diminuição do tecido linfóide, infiltração de tecido adiposo e oncocitose. As tumefações ocorreram principalmente em mulheres após a quarta década de vida, sempre associadas com ausência de dentes posteriores inferiores. Os autores concluíram que estas tumefações tinham etiologia

multifatorial, com ênfase no processo de envelhecimento das glândulas sublinguais e deviam ser consideradas entidade nosológica (IWAKI FILHO et al., 2006).

Considerando que o processo de envelhecimento da glândula sublingual foi aventado como um possível fenômeno que poderia explicar o que acontece com a glândula sublingual relacionada às tumefações do soalho da boca em pacientes desdentados (IWAKI FILHO, 1999; IWAKI FILHO et al., 2006), alguns estudos seguiram esta linha de pesquisa buscando caracterizar o processo de envelhecimento nas glândulas sublinguais humanas (AZEVEDO et al., 2005; MOREIRA et al., 2006) e sua possível relação com a origem das tumefações do soalho bucal em edêntulos (SÁ, 2009).

Azevedo e colaboradores (2005) realizaram um estudo microscópico morfológico descritivo em glândulas sublinguais de cadáveres humanos em diferentes faixas etárias, objetivando reconhecer as alterações microscópicas ao longo dos anos, relacionando-os com gênero e idade. Cento e oitenta e seis glândulas sublinguais humanas foram obtidas por meio de necropsias. Critérios de exclusão envolveram quaisquer condições patológicas em vida que pudessem influenciar a histologia glandular *post mortem*, como obesidade, caquexia, uso de drogas citotóxicas, radioterapia de cabeça e pescoço, diabetes melito, leucemia, linfoma, doenças do colágeno, mucoviscidose, Síndrome de Sjögren e cirrose hepática. Os indivíduos foram distribuídos em três grupos etários: I (0-30 anos); II (31-60 anos); III (61-90 anos). O envelhecimento da glândula sublingual foi considerado marcante, tendo início com a atrofia acinosa, seguido do aumento do número de ductos e/ou estruturas ductiformes, resultando na substituição do parênquima por tecidos adiposo e/ou fibroso. Outras observações incluíram a mudança do infiltrado mononuclear de focal para difuso, aumento da oncocitose e de vasos sanguíneos congestos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os gêneros (AZEVEDO et al., 2005).

Dando continuidade ao estudo anterior, Moreira et al. (2006) avaliaram as modificações quantitativas em glândulas sublinguais humanas, relacionando-as com a idade cronológica e o gênero. Noventa glândulas sublinguais direitas de cadáveres foram distribuídas por gênero e grupo etário para análise morfométrica dos vários componentes glandulares e do volume glandular. Os resultados demonstraram que, com a idade, houve diminuição de 56,35% na densidade de volume de ácinos ($p < 0,0001$) e, paralelamente, aumento de 59,79%, 517,82%, 738,36% na densidade de volume de ductos ($p = 0,0275$), estroma ($p < 0,0001$) e tecido adiposo ($p < 0,0001$), respectivamente. O volume glandular

absoluto diminuiu em média 33,73% ($p = 0,0005$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre gêneros ($p > 0,05$). Com estes resultados, os autores concluíram que o envelhecimento não explica a etiopatogenia das tumefações do soalho bucal relacionadas à glândula sublingual em desdentados com a idade. Ocorre substituição de tecidos e diminuição no volume do órgão, em vez de aumento (MOREIRA et al., 2006).

Sá (2009) realizou uma análise morfológica e morfométrica de glândulas sublinguais de portadores de tumefações do soalho bucal relacionada à glândula sublingual em pacientes desdentados comparando-as com glândulas sublinguais de cadáveres desdentados de idades semelhantes. Foram utilizadas 20 glândulas sublinguais obtidas de cadáveres e 20 glândulas de pacientes desdentados inferiores, tratados cirurgicamente por razões protéticas. Os espécimes dos dois grupos foram distribuídos pareando-se faixa etária e gênero, sendo que as idades nos dois grupos variaram entre 40 e 79 anos. No estudo microscópico morfológico, não houve diferença estatisticamente significativa para as variáveis atrofia acinosa, substituição por tecido fibroso e adiposo, extravasamento de muco focal e difuso, infiltrado mononuclear focal e difuso, oncocitose e ductos e/ou estruturas ductiformes. Houve diferença significativa para dois achados: autólise acinosa e vasos sanguíneos congestos. Em relação ao estudo microscópico morfométrico, não houve diferença estatisticamente significativa para as variáveis ácinos, ductos, estroma, tecido adiposo, densidade de volume de parênquima e de estroma total. A autora concluiu que as características microscópicas das glândulas sublinguais de portadores de tumefações do soalho bucal são as mesmas observadas no processo de envelhecimento das glândulas salivares, sendo que as glândulas sublinguais presentes nas tumefações do soalho bucal de pacientes desdentados não são patológicas e, portanto, não são responsáveis pela tumefação. A autora ainda sugeriu a modificação da nomenclatura para “prega ou dobra do soalho da boca” e especulou sobre as diferenças individuais na elasticidade da língua e do soalho da boca como possíveis causas para as chamadas “pregas ou dobras do soalho bucal”.

2.3 Estudos imunoistoquímicos das glândulas salivares normais

Em relação aos estudos imunoistoquímicos relacionados às glândulas salivares, nota-se que a maioria deles buscou caracterizar os elementos epiteliais e/ou mioepiteliais constituintes das mesmas ou estudar processos patológicos, como as neoplasias de glândulas salivares. Contudo, a glândula sublingual não foi abordada nestes trabalhos. Além do mais, nenhum estudo molecular relacionado ao processo de envelhecimento foi encontrado em nossa busca.

Born et al. (1987) caracterizaram e definiram os diversos tipos celulares das glândulas salivares humanas normais através de uma base molecular, usando um painel de anticorpos monoclonais contra citoqueratinas (CK), vimentina e GFAP (*glial fibrillary protein*). Anticorpos como AE1-AE3, KL e PKK 1 reagiram com todos os tipos de células epiteliais das unidades secretoras de glândulas parótidas e submandibulares, incluindo células basais e mioepiteliais. Anticorpos mais seletivos para peptídeos, como o anti-CK 7 e anti-CK 18, mostraram forte reação para células acinosas mucosas e serosas, assim como para células ductais. Anti-CK 8 e anti-CK 19 reagiram fortemente em todas as partes do sistema ductal e mostraram fraca reação para células acinosas. Células mioepiteliais foram positivas para CK 7 e CK 19. As células basais expressaram CK 13 e CK 16. A vimentina foi positiva para o estroma glandular, células linfóides e vasos sanguíneos. A reação para GFAP nas células mioepiteliais foi restrita à glândula parótida.

No mesmo ano, Geiger et al. (1987) utilizaram uma bateria de anticorpos monoclonais específicos para citoqueratinas, para o estudo do epitélio das glândulas submandibulares humanas. Células ductais e basais foram positivas para CK 19, enquanto as células acinosas foram negativas. CK 18 foi expressa nas células acinosas, ductais e mioepiteliais. CK 4, 5, e 6 mostraram positividade para células basais e mioepiteliais e CK 13 e 16 apenas para células basais (presentes nos ductos). Vimentina foi positiva para fibroblastos estromais e vasos sanguíneos e negativa para ácinos e ductos.

Marshak e Leitner (1987) realizaram a marcação de citoqueratinas nos componentes epiteliais e metaplásicos de glândulas salivares submandibulares. Os autores demonstraram que os anticorpos para CK 19 marcaram fortemente as células ductais, marcando muito fracamente os ácinos e células mioepiteliais associadas. Anticorpos para CK 13 e CK 16 marcaram seletivamente as células basais dos ductos mais calibrosos.

Burford-Mason et al. (1993) realizaram uma análise imunoistoquímica da capacidade proliferativa de células ductais e acinosas tanto no processo de atrofia quanto durante a regeneração de glândulas parótidas de ratos, usando um modelo de indução de atrofia glandular através da obstrução do ducto excretor com auxílio de um grampo e liberação do mesmo para permitir regeneração glandular. Os autores utilizaram anticorpos para citoqueratinas (AE1 e AE3), antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e alfa-amilase humana, no intuito de marcar, respectivamente, células ductais, células em processo de mitose e células acinosas. Quando comparadas a glândulas normais, as glândulas atroficas mostraram notável aumento no número de ductos acompanhada pela perda quase total de células acinosas e mitoses muito escassas. Já as glândulas em processo de regeneração demonstraram ductos mais espaçados, células acinosas mitóticas numerosas e grande quantidade de células acinosas.

Dando continuidade ao trabalho anterior, em um estudo sobre o potencial proliferativo de células mioepiteliais de glândulas parótidas de ratos, Burgess et al. (1996) observaram que após a obstrução ductal induzida a perda acinosa é evidente e que os ductos resistem à atrofia comparativamente melhor do que os ácinos. Além disso, o estudo mostrou que células mioepiteliais maduras podem chegar a índices elevados de proliferação quando a glândula é injuriada.

Em 1999, Ihrler e colaboradores realizaram um estudo imunoistoquímico da relação morfológica e funcional de células mioepiteliais e basais em ductos normais de glândulas parótidas humanas, usando um painel de citoqueratinas. Os autores mostraram que na porção periférica do sistema ductal os ácinos e ductos intercalares apresentam uma camada única de células cuboidais, sendo os ácinos serosos positivos para CK 18 e os ductos intercalares positivos para CK 18 e CK 19. De acordo com o estudo, as células mioepiteliais expressam CK 14 e CK 19 e os ductos estriados são intensamente positivos para CK 18 e CK 19. Além disso, também foi demonstrado que a proliferação celular demonstrada pela expressão de Ki-67 é rara nas células acinosas, ductos intercalares e células basais e ausente nas células oxifílicas e mioepiteliais.

Ihrler et al. (2002) demonstraram em um estudo imunoistoquímico sobre regeneração e metaplasia de ductos de glândulas salivares menores, parótidas e submandibulares de humanos que a evidência de um fenótipo misto sugere a transição e diferenciação de células e que as metaplasias desenvolvem-se a partir das células basais, que possuem uma capacidade

de diferenciação morfogênética. Os autores também mostraram, através do imunomarcador Ki-67, que todos os tipos celulares dos ductos salivares têm capacidade de proliferação celular, ainda que baixa.

No mesmo ano, Dayan e colaboradores investigaram a capacidade de proliferação celular de ácinos e ductos com o envelhecimento por meio da técnica de impregnação pela prata AgNOR (*argyrophilic proteins related to nucleolar organizer regions*) e a imunomarcagem do Ki-67. A amostra foi constituída de glândulas labiais de cadáveres de diferentes idades. Os resultados mostraram uma tendência no aumento das AgNORs com idade em todas as células testadas (seromucosas, mucosas e ductais), o que não correspondeu aos achados do Ki-67, onde o índice de proliferação celular foi de 0%, uma vez que as células positivas no parênquima, nos ductos e no ácinos foram escassas. Os autores acreditam que este resultado “paradoxal” pode estar relacionado à atividade metabólica das células comprovada pela presença das AgNORs e não ao seu potencial de proliferação (DAYAN et al., 2002).

Takahashi et al. (2002) realizaram um estudo na tentativa de elucidar o papel da apoptose e mitose no processo de atrofia das glândulas sublinguais em ratos. Glândulas sublinguais atróficas foram examinadas através de imunoistoquímica para PCNA, técnica de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase TdT-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling assay*) e microscopia eletrônica. Os animais foram sacrificados após 1, 3, 5, 7, 10, 14 e 28 dias da ligadura dos ductos salivares e indução de atrofia. Os autores observaram que, após 7 dias, o desaparecimento de ácinos e aumento de ductos foram marcantes. Estruturas de transição entre ácinos e ductos (estruturas ductiformes) também foram observadas. Após 28 dias, havia poucas células acinosas limitadas à região periférica dos lóbulos e o parênquima glandular constituía-se principalmente de ductos circundados por tecido fibroso. A marcação para PCNA nas células ductais foi alta nos primeiros estágios de atrofia e diminuiu posteriormente, sendo que as estruturas ductiformes foram comumente observadas nos estágios mais tardios de atrofia, sugerindo que tanto a mitose (estágios iniciais) quanto o processo de transição de ácinos para ductos (estágios tardios) contribuem no aumento do número de ductos em glândulas sublinguais atróficas. O estudo ainda demonstrou presença de células TUNEL-positivas nos estágios iniciais de atrofia e apoptose típica destas células ultraestruturalmente, sugerindo que a apoptose é um importante fator no processo de perda de células acinosas, especialmente nos estágios iniciais de atrofia glandular. Os autores

concluíram que a apoptose de células acinosas e a mitose de células ductais exercem um importante papel no processo de atrofia das glândulas salivares e que a transição de ácinos para ductos e a necrose de células acinosas são fatores adicionais importantes.

A horizontal strip of a histological section of prostate tissue, showing glandular structures and cellular details in grayscale.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Comparando glândulas sublinguais de humanos jovens e idosos, pretende-se neste estudo:

1. Determinar se o fenótipo das estruturas ductiformes possui um perfil acinoso ou ductal;
2. Determinar se há atividade de proliferação de células epiteliais nas estruturas ductiformes.

A horizontal strip of a histological section of prostate tissue, showing glandular structures and cellular details in grayscale.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostra

De uma população de 186 glândulas sublinguais humanas obtidas em necropsias (AZEVEDO et al., 2005), 60 foram incluídas nesta pesquisa e foram divididas segundo a idade cronológica em grupo I (0-30 anos) e grupo II (61-90 anos). Gênero e lado não foram levados em consideração. As glândulas foram coletadas no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC) – São Paulo – SP, Brasil, por via cervical baixa, ou, na impossibilidade desta, por via oral direta (AZEVEDO et al., 2005). O processamento histológico do material foi realizado no Laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo (FOB-USP), seguindo princípios de rotina (AZEVEDO et al., 2005). Estas etapas foram realizadas em pesquisa anterior (AZEVEDO et al., 2005), aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do SVOC (Anexo A). Da mesma forma, a presente pesquisa também foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FOB-USP (Processo nº 59/2010) (Anexo B). O material, fixado e embocado em parafina, pertence ao pesquisador responsável por este trabalho – Prof. Dr. José Humberto Damante, do Departamento de Estomatologia da FOB-USP – que autorizou a utilização do mesmo (Anexo C).

Foram excluídos da população glândulas de pacientes cuja história médica pregressa ou laudo da microscopia acusavam condições clínicas e/ou microscópicas como: linfoma, leucemia, mucoviscidose, doenças reumáticas, Síndrome de Sjögren, obesidade, caquexia, diabete melito, cirrose alcoólica, doenças do colágeno, história pregressa de radioterapia de cabeça e pescoço, uso de terapia esteróide ou citotóxica nos últimos três meses e padrões microscópicos de autólise que prejudicassem a interpretação das estruturas (AZEVEDO et al., 2005; MOREIRA et al., 2006; SÁ, 2009).

4.2 Técnicas imunoistoquímica e histoquímica

As marcações histoquímicas e imunoistoquímicas dos espécimes foram realizadas no Anatomed Instituto de Anatomia Patológica de Bauru - SP. Vale ressaltar que o material já se encontrava emblocado em parafina e que cada bloco continha três fatias que representavam as regiões anterior, média e posterior de cada glândula sublingual (AZEVEDO et al., 2005). As análises morfológica e morfométrica por meio de microscopia óptica em cortes corados com hematoxilina-eosina (H.E.) já haviam sido realizadas em estudos anteriores (AZEVEDO et al., 2005; MOREIRA et al., 2006; SÁ, 2009). Contudo, para o presente estudo, a técnica de coloração H.E. foi repetida e novas lâminas confeccionadas. A fatia central, correspondente à porção média da glândula, foi a escolhida para o estudo por ser a mais representativa do todo.

Para análise fenotípica das estruturas ductiformes foi observada a presença de moléculas relacionadas a células ductais e moléculas presentes em células acinosas, a fim de esclarecer se as estruturas ductiformes são constituídas por células ductais e/ou acinosas (mucosas e/ou serosas). Adicionalmente, a atividade mitótica nessas estruturas foi investigada por meio de um marcador de proliferação celular.

Foram obtidos cortes sequenciais de 3-5µm de espessura do material emblocado em parafina. O estudo imunoistoquímico foi realizado pela técnica de polimerização controlada para preparação de conjugados de anticorpos poliméricos de ligação HRP (*horseradish peroxidase*), utilizando-se os anticorpos específicos para:

- a) **Citoqueratina 19 (CK 19):** presente em todas as células do sistema ductal (GEIGER et al., 1987; BORN et al., 1987; MARSHAK e LEITNER, 1987; IHRLER et al., 1999);
- b) **Proteína S-100:** presente em células acinosas serosas (NAKAZATO et al., 1985; NINOMIVA et al., 1989);
- c) **Ki-67 (antígeno nuclear associado ao ciclo celular):** marcação de atividade proliferativa celular (BROWN e GATTER, 1990; GERDES et al., 1991; IHRLER et al., 1999; ARISAWA et al., 1999; IHRLER et al., 2002).

As especificações dos anticorpos primários utilizados encontram-se listados na tabela 1. As etapas das reações estão descritas na tabela 2.

Tabela 1 – Especificações dos anticorpos primários utilizados.

Especificidade	Clone	Isotipo	Descrição	Fabricante	Diluição	Incubação
CK 19	RCK 108	IgG1 Kappa	Monoclonal Camundongo	DAKO, USA, cod#M0888	1:100	18h a 4°C em câmara úmida
S-100	-	-	Policlonal Coelho	DAKO, USA, cod#Z0311	1:2000	18h a 4°C em câmara úmida
Ki-67	MIB-1	IgG1 Kappa	Monoclonal Camundongo	DAKO, USA, cod#M720	1:400	18h a 4°C em câmara úmida

Tabela 2 – Protocolo de reações imunoistoquímicas.

Etapas	
Recuperação antigênica	-Solução tampão citrato 10mM pH6,0 -Panela de pressão, 4 min
Bloqueio da peroxidase endógena	-H ₂ O ₂ 10 v. a 3% -4 trocas de 5 min PBS*
Anticorpo secundário/ Sistema de Visualização	-Advance TM HRP Link (DAKO, USA, cod#K4068) Diluição 1:500 Incubação: 30 min a 37°C -Advance TM HRP Enzyme (DAKO, USA, cod#K4068) Diluição 1:200 Incubação: 30 min a 37°C -DAB** (Liquid DAB + Substrate/ Chromogen System) (DAKO, USA, cod#K3468)

*PBS = Phosphate buffered saline / **DAB = 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride.

Um controle positivo e um controle negativo foram incluídos em cada série de colorações imunoistoquímicas. Seguindo as recomendações dos fabricantes, como controle positivo foram utilizados cortes microscópicos de pele humana (CK 19), tecido neural (S-100) e tonsilas (Ki-67). Como controle negativo foi utilizado um corte do mesmo tecido com a omissão do anticorpo primário. A contra coloração dos espécimes foi realizada com Hematoxilina de Harris e as lâminas foram montadas com resina adesiva *Entellan*[®] New (Merck, Darmstadt, Alemanha) e lamínulas.

Adicionalmente, colorações histoquímicas foram realizadas, conforme a tabela 3. Os corantes PAS e Azul de Alcian foram utilizados para marcar células acinosas mucosas, uma vez que as glândulas sublinguais são mistas, com predominância mucosa.

Tabela 3 – Especificação das colorações histoquímicas utilizadas.

Método	Finalidade	Cor adquirida
PAS (ácido periódico de Schiff) sem diastase	Polissacarídeos <i>Cora mucina e glicogênio</i>	Magenta
Azul de Alcian pH 2,5	Mucopolissacarídeos ácidos <i>Cora mucina ácida</i>	Azul pálido

É importante ressaltar que todas as colorações e marcações imunoistoquímicas foram testadas e previamente padronizadas em estudo piloto.

4.3 Avaliação dos resultados

Por meio da coloração em H.E. foi realizada a identificação das estruturas ductiformes por critério de exclusão. No parênquima glandular, o que era morfológicamente reconhecido como ácino ou ducto verdadeiro era excluído da quantificação, ficando apenas as estruturas ductiformes para serem contadas em cada campo microscópico (Tabela 4/Figura 3).

Tabela 4 – Padrão morfológico/microscópico adotado para classificação dos componentes glandulares.

Ácino seroso*	Ácino mucoso*	Ducto*	Estrutura ductiforme**
Células de forma piramidal com seu ápice voltado para o lúmen central. Seu núcleo é esférico e localizado no terço basal da célula. Seu citoplasma cora-se pela técnica H.E.	Células triangulares, de citoplasma vacuolizado e com núcleo achatado situado na sua base. Pouco corado com H.E. devido ao seu maior conteúdo de carboidrato.	Luz central revestida por células cuboidais com núcleos centrais e citoplasma eosinofílico.	Estrutura com lume dilatado e células rechaçadas para a periferia. Seus núcleos são ovóides ou elipsóides tomando aspecto de núcleo achatado de célula pavimentosa. Às vezes mais de uma camada de células está presente com células acinosas remanescentes.

*Bhaskar SN. Histologia e Embriologia Oral de Orban. São Paulo: Artes Médicas, 1989. **Critério próprio de classificação.

Figura 3 – H.E. 100X. **A:** Lóbulo de glândula sublingual com intensa atrofia de ácinos e presença de estruturas ductiformes (Sá, 2009). **B:** Estruturas ductiformes (setas). **C:** Ducto verdadeiro (*).

Para a avaliação das colorações e da expressão dos marcadores imunoistoquímicos, um sistema computadorizado de captura de imagens foi empregado. Fotomicrografias foram obtidas com o auxílio de uma câmera digital de alta resolução (Axiocam MRc, ZEISS, Jena, Alemanha) acoplada a um microscópio binocular (Axioskop 2 Plus, ZEISS, Jena, Alemanha) contendo uma objetiva de 40X. A câmera digital, conectada a um microcomputador (Pentium IV, INTEL, Santa Clara, CA, EUA), enviou suas imagens a um software de aquisição e análise de imagens (Axiovision 4.5 ZEISS, Jena, Alemanha). Cada campo microscópico foi previamente padronizado neste programa com o intuito de evitar diferenças na intensidade de expressão dos anticorpos utilizados.

A captura dos campos se deu por meio da seleção dos *spots* (áreas mais representativas do evento identificadas através da objetiva de menor aumento). Nas glândulas em que as estruturas ductiformes tinham distribuição difusa e tomavam a lâmina toda, foram selecionados 20 *spots*. Se o número de campos fosse inferior a 20, todos os campos eram analisados. Em cada campo capturado, o número de estruturas ductiformes foi contado (Figura 4).

Figura 4 – Imagem ilustrativa do método da seleção dos *spots* para cada grupo.

Sendo assim, os campos foram selecionados da seguinte forma:

- **Grupo I:** todos os campos microscópicos contendo estruturas ductiformes foram capturados;
- **Grupo II:** 20 campos contendo estruturas ductiformes capturados.

Um corte de cada glândula foi analisado com cada molécula estudada, totalizando 60 lâminas para cada marcação (30 por grupo). Assim sendo, foi avaliado um total de 360 lâminas (60 lâminas para cada marcação: H.E., PAS, Azul de Alcian pH 2,5, CK 19, S-100 e Ki-67).

Planilhas foram confeccionadas no Microsoft Excel (Microsoft Co.) para tabulação dos dados. A quantificação das estruturas ductiformes permitiu que fosse traçado o perfil de marcação/imunomarcação nos grupos testados através de valores em percentual.

4.3.1 Avaliação do fenótipo

A presença das células acinosas serosas ou ductais foi expressa pela coloração acastanhada dos anticorpos testados (S-100 e CK 19) ou pela coloração específica de cada método histoquímico empregado.

A expressão imunoistoquímica de CK 19 e S-100 pelas estruturas ductiformes foi avaliada por meio de uma adaptação de um método semi-quantitativo de escores, baseado na soma da proporção e da intensidade das células com imunomarcação positiva, conforme previamente descrito por Soini et al. (2001).

Para cada campo microscópico capturado, o primeiro passo foi estimar a porcentagem de estruturas ductiformes positivas para cada imunomarcador (independente se a imunomarcação era parcial ou total), considerando o número total de estruturas contadas naquele campo. A porcentagem obtida correspondia a um valor de 0 a 4, onde 0 representava a ausência de estruturas ductiformes imunomarcadas, 1= menos de 25% de estruturas ductiformes imunomarcadas; 2= 26 a 50% de estruturas ductiformes imunomarcadas; 3= 51% a 75% de estruturas ductiformes imunomarcadas e 4 representava que mais de 75% das

estruturas eram positivas para o imunomarcador (Tabela 5). Em seguida, para as estruturas ductiformes positivas, a abrangência parcial ou total da imunomarcção também foi aferida, seguindo basicamente o mesmo sistema de escores anterior, onde o escore 1 correspondia a menos de 25% das estruturas ductiformes com todas suas células imunomarcadas e o escore 4 a mais de 75% das estruturas ductiformes totalmente marcadas (ou seja, em um campo de escore 1, menos de 25% das estruturas eram totalmente imunomarcadas e mais de 75% tinham imunomarcção parcial, com células ora positivas, ora negativas) (Tabela 5). Adicionalmente, aferiu-se a intensidade da imunomarcção nas células positivas, classificando-a em fraca a moderada ou forte. A intensidade correspondia a valores de 1 a 4 (1= <25% das estruturas com imunomarcção forte; 2= 26 a 50% das estruturas com imunomarcção forte; 3= 51 a 75% das estruturas com imunomarcção forte e 4= >75% das estruturas com imunomarcção forte (Tabela 5). Por fim, o somatório dos valores atribuídos à quantidade, abrangência e intensidade da imunomarcção resultou no escore final. Espécimes com escores de 3 a 7 representavam expressão fraca a moderada e de 8 a 12, forte imunoexpressão do anticorpo (Tabela 5).

Tabela 5 – Sistema de escores aplicado para avaliação da expressão das proteínas CK 19 e S-100 nas estruturas ductiformes.

Quantidade de estruturas positivas	Abrangência da imunomarcção	Intensidade de expressão	Escore final (somatório)
0 = 0			0 = Ausência de expressão
1 = <25%	1 = <25%	1 = <25%	
2 = 26-50%	2 = 26-50%	2 = 26-50%	3 a 7 = Expressão fraca a moderada
3 = 51-75%	3 = 51-75%	3 = 51-75%	
4 = >75%	4 = >75%	4 = >75%	8 a 12 = Expressão forte

Basicamente, a avaliação da marcação histoquímica do PAS e do Azul de Alcian nas estruturas ductiformes seguiu o mesmo sistema de escores descrito anteriormente, à exceção da intensidade de marcação, a qual inexistente para estes corantes. Dessa maneira, o escore final em cada campo capturado correspondia ao somatório dos valores atribuídos à quantidade de estruturas ductiformes marcadas e à sua classificação quanto à quantidade de células marcadas (escores de 0 a 4). Esses escores finais representavam uma marcação ausente (escore 0), fraca (escores de 1 a 4) ou forte (escores de 5 a 8) (Tabela 6).

Tabela 6 – Sistema de escores aplicado para avaliação da marcação histoquímica nas estruturas ductiformes.

Quantidade de estruturas ductiformes positivas	Abrangência da marcação	Escore final (somatório)
0 = 0		0 = Ausência de marcação
1 = <25%	1 = <25%	1 a 4 = Marcação fraca
2 = 26-50%	2 = 26-50%	5 a 8 = Marcação forte
3 = 51-75%	3 = 51-75%	
4 = >75%	4 = >75%	

4.3.2 Avaliação da proliferação celular

A atividade proliferativa celular, expressa pela coloração acastanhada nuclear do anticorpo anti-Ki-67 nas estruturas ductiformes foi quantificada nos mesmos campos previamente selecionados em porcentagem de células positivas, a fim de se estabelecer um índice de proliferação celular.

4.3.3 Análise estatística

Para a comparação entre os grupos e entre os marcadores foram realizados os testes t de Student ou Mann-Whitney. A correlação entre as imunomarcações foi estabelecida por meio do coeficiente de correlação de Spearman. Em todos os testes estatísticos foi adotado nível de significância de 5%.

O teste Kappa foi utilizado para avaliar a concordância intraexaminador. Trinta lâminas escolhidas aleatoriamente foram reavaliadas depois de dois meses do exame inicial.

A horizontal strip of a histological section of prostate tissue, showing glandular structures and cellular details in grayscale.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do fenótipo

As glândulas sublinguais de ambos os grupos demonstraram grande variabilidade em sua arquitetura histológica. Essa variação pode ser observada entre diferentes glândulas ou mesmo entre os diferentes lóbulos de uma mesma glândula. No geral, as glândulas de jovens mostraram-se íntegras, com ácinos mucosos e serosos bem delineados e com estruturas ductiformes esparsas ou ausentes (Figura 5A). Nas glândulas de idosos, em alguns cortes havia lóbulos bastante preservados e outros com características inerentes à senilidade, como a intensa substituição do parênquima glandular por tecido fibroso e adiposo e a grande quantidade de estruturas ductiformes (Figura 5B). No grupo I, das 30 lâminas analisadas, apenas 12 continham estruturas ductiformes enquanto que no grupo II somente 2 lâminas não demonstraram estas estruturas.

Figura 5 - A: Glândula normal – paciente de 26 anos. **B:** Glândula alterada - estruturas ductiformes e substituição por tecido fibroso e adiposo – paciente de 68 anos (H.E. 40X).

Quando comparados os dois grupos, apenas a imunomarcagem para CK 19 mostrou diferença estatisticamente significativa entre eles ($p = 0,033$), sendo sua expressão mais forte no grupo de idosos. Embora a expressão para S-100 também tenha sido mais forte no grupo II, não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 1,000$). A comparação entre os dois grupos está demonstrada na tabela 7.

Tabela 7 – Comparação entre os grupos I e II em relação à marcação histoquímica e imunoistoquímica.

Variáveis	Grupos						
	I (Jovens)			II (Idosos)			p
	N=12			N=28			
	Mediana	1º Quartil	3º Quartil	Mediana	1º Quartil	3º Quartil	
S-100	0,000	0,000	6,000	1,286	0,000	3,875	1,000
CK 19	9,000	6,000	11,625	10,840	9,083	12,000	0,033*
PAS	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,458	0,536
AA	0,000	0,000	1,875	0,000	0,000	0,917	0,907

Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$). *Estatisticamente significativo. AA – Azul de Alcian.

Quando comparados os marcadores histoquímicos PAS e Azul de Alcian para ácinos mucosos, observou-se que eles funcionaram de maneira bastante semelhante, sendo a marcação bem evidente nos ácinos mucosos (nas colorações magenta e azul, respectivamente) e bastante rara nas estruturas ductiformes. Quando havia marcação, a mesma era restrita a uma pequena porção da estrutura e classificada como parcial. Estes corantes também revelaram, em alguns casos, a presença de mucina dentro de ductos ou de estruturas ductiformes (Figura 6). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os marcadores PAS e Azul de Alcian ($p = 0,270$), como demonstrado na tabela 8.

Figura 6 - Marcação dos ácinos mucosos para PAS e Azul de Alcian pH 2,5. **A:** Notar que a estrutura ductiforme isolada é negativa para ambos os marcadores (seta). Grupo I (21 anos). **B:** Estrutura ductiforme com marcação parcial (seta) para PAS e Azul de Alcian. Destaque para a maioria das estruturas ductiformes que são negativas para ambos os marcadores. Grupo II (76 anos). **C:** Estruturas ductiformes negativas para PAS e Azul de Alcian pH 2,5. Destaque para a presença de muco no lume da estrutura ductiforme (setas). Grupo II (76 anos).

Tabela 8 – Comparação entre os marcadores histoquímicos PAS e Azul de Alcian.

Variáveis	Mediana	1º Quartil	3º Quartil
PAS	0,000	0,000	0,288
Azul de Alcian	0,000	0,000	1,000
p = 0,270			

Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

O componente acinoso seroso (evidenciado pelo imunomarcador S-100) foi expresso nas estruturas ductiformes com menor frequência e mais fraca intensidade e abrangência do que a CK 19. Frequentemente, a imunomarcagem para S-100 nas estruturas ductiformes era ausente. Contrariamente, a expressão da CK 19 nas estruturas ductiformes era forte e muito semelhante à imunomarcagem dos ductos. Ácinos serosos demonstraram forte imunomarcagem para S-100 e expressão moderada, fraca ou ausente para CK 19. Ductos foram, invariavelmente, negativos para S-100 e positivos para CK 19 (Figuras 7 e 8).

Figura 7 – Imunomarcagem semelhante de ductos (*) e de estruturas ductiformes para CK 19. Grupo II (74 anos).

Figura 8 - A: Estruturas ductiformes com imunomarcção fraca (seta vermelha) ou ausente (seta amarela) para S-100. O controle positivo foi dado pela imunomarcção intensa do feixe nervoso (seta branca). Células serosas fortemente imunomarcadas (seta preta). Grupo II (76 anos). **B:** Imunomarcção parcial, mas de forte intensidade para CK 19 nas estruturas ductiformes. Células serosas fracamente imunomarcadas. Grupo II (76 anos). **C:** Expressão positiva de S-100 em células acinosas serosas (setas vermelhas) e negativa nos ductos e estruturas ductiformes (setas amarelas). Grupo II (83 anos). **D:** Forte expressão de CK 19 nos ductos e estruturas ductiformes (setas amarelas) e expressão fraca a moderada nas células acinosas serosas (setas vermelhas). Grupo II (83 anos).

Quando considerado o grupo I, a imunomarcção das estruturas ductiformes para CK 19 foi mais forte do que para S-100, com diferença estatisticamente significativa ($p = 0,004$) (Tabela 9). Para o grupo II, esta mesma situação foi observada, sendo esta diferença ainda mais significativa ($p < 0,001$) (Tabela 10).

Tabela 9 – Comparação entre a imunomarcção de estruturas ductiformes com S-100 e CK 19 no grupo I.

Grupo I						
S-100			CK 19			
Média	DP	EPM	Média	DP	EPM	p
2,583	3,370	0,973	7,625	4,216	1,217	0,004*

Teste t de Student ($p < 0,05$). DP – desvio padrão. EPM – erro padrão da média. Grupo I (0-30 anos).

Tabela 10 – Comparação entre a imunomarcção de estruturas ductiformes com S-100 e CK 19 no grupo II.

Grupo II						
S-100			CK 19			
Mediana	1º Quartil	3º Quartil	Mediana	1º Quartil	3º Quartil	p
1,286	0,000	3,875	10,840	9,083	12,000	<0,001*

Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$). Grupo II (61-90 anos).

Esta condição aplicou-se também na análise microscópica descritiva, onde se observou que, principalmente nas glândulas senis, as estruturas ductiformes expressavam fortemente a CK 19 (Figura 9), demonstrando um perfil muito mais ductal do que acinoso.

Também foi possível observar, em alguns cortes, a presença de áreas de mistura entre células acinosas e ductais (Figura 10).

Figura 9 – Riqueza em estruturas ductiformes positivas para CK 19 – Grupo II (70 anos).

Figura 10 – Estrutura “mista” contendo células ductais imunomarcadas com CK 19 (setas amarelas) e células acinosas (setas vermelhas) .

Quando aplicado o coeficiente de correlação de Pearson, a correlação entre CK 19 e S-100 foi ausente ($\rho = -0,163$; $p = 0,315$), como demonstrado na figura 11.

Figura 11 – Ausência de correlação entre CK 19 e S-100.

Os valores do coeficiente Kappa (K) para as variáveis S-100, CK 19, PAS e Azul de Alcian foram, respectivamente: 87,50%; 78,13%; 96,88% e 98,88%.

5.2 Avaliação da proliferação celular

Nos dois grupos estudados, não houve imunomarcagem para o Ki-67 em nenhuma estrutura ductiforme (Figura 12).

Figura 12 – Ausência de expressão nuclear do Ki-67 nas estruturas ductiformes do grupo I (A) e II (B). A marcação de algumas células na camada basal do epitélio da mucosa oral (setas) funcionou como controle positivo do anticorpo usado (C), também confirmado em um teste em tonsilas palatinas (D).

A horizontal strip of a histological section of prostate tissue, showing glandular structures and cellular details in grayscale.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

6.1 População e amostra

As glândulas sublinguais do presente trabalho são as mesmas utilizadas em outros estudos desta mesma linha de pesquisa (AZEVEDO et al., 2005). Em relação ao gênero dos cadáveres e ao lado de procedência das glândulas, a inexistência de diferenças já constatada em trabalhos anteriores (SCOTT, 1977a; SCOTT, 1980; AZEVEDO et al., 2005; MOREIRA et al., 2006) nos permitiu desprezar essa preocupação.

6.2 Discussão da metodologia

6.2.1 Estruturas ductiformes e células acinosas

No processo de atrofia ou de envelhecimento glandular os ácinos podem se assemelhar a ductos, sendo chamados de estruturas ductiformes (SCOTT, 1977a, 1977b; SCOTT, 1980; DRUMMOND e CHISHOLM, 1984; SCOTT et al., 1987; BURFORD-MASON, et al., 1993; DAYAN et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2002; AZEVEDO et al., 2005; MOREIRA et al., 2006; SÁ, 2009). Nessa situação, a diferenciação entre ductos e ácinos é inviável. Por este motivo os autores preferem usar a denominação “estrutura ductiforme”, na incerteza de tratar-se de um ducto verdadeiro. Para Takahashi et al. (2002) as estruturas ductiformes são consideradas a transição entre ácinos e ductos. Nas análises morfométricas de Moreira et al. (2006) e Sá (2009), ductos e estruturas ductiformes eram contabilizados como uma só variável e, na presença de qualquer vestígio de célula acinosa, a estrutura era considerada ácino, ainda que atrófico. No presente estudo, adotamos um critério próprio baseado em nosso estudo piloto, no qual eram contabilizadas como estruturas ductiformes aquelas com lume dilatado, células rechaçadas para a periferia, núcleos ovóides ou elipsóides tomando aspecto de núcleo de célula pavimentosa e com o citoplasma achatado. Geralmente as mesmas eram dispostas em pequenos ou grandes aglomerados, em grande número e com formatos irregulares (Figuras 3A, 5B, 7, 9). Os ductos verdadeiros eram facilmente identificados (e excluídos da contagem) por apresentarem luz central ampla revestida por células cuboidais com núcleos centralmente localizados e de citoplasma eosinofílico (BHASKAR, 1989), além

de serem maiores e usualmente solitários (Figuras 3C, 7). Em caso de estruturas duvidosas, as mesmas eram contadas como estruturas ductiformes.

Em relação às células acinosas mucosas e serosas, sabe-se que a distinção entre elas é possível em lâminas coradas em H.E. Os ácinos mucosos apresentam células com forma de tronco piramidal e com núcleos achatados e basais. Secretam a mucina (dificilmente corada nesta técnica) e são maiores que os ácinos serosos. Já os ácinos serosos possuem células piramidais com núcleos redondos e parabasais e produzem uma secreção aquosa e límpida. A glândula sublingual é rica em ácinos mistos, que secretam os dois tipos de substância. A porção serosa do ácino é chamada “meia-lua serosa” e envolve a porção mucosa (AMANO et al., 2012). No presente trabalho, observou-se que as porções mucosas dos ácinos eram sempre marcadas com o PAS e o Azul de Alcian (Figura 6A), enquanto as porções serosas expressavam a proteína S-100 (Figura 8A, 8C). Apesar da facilidade na distinção microscópica dessas células, a utilização das colorações histoquímicas e do S-100 foi justificada para possibilitar a avaliação, respectivamente, da presença de células mucosas e serosas nas estruturas ductiformes, uma vez que com a simples análise microscópica em H.E. essa distinção seria muito difícil, dado o processo de atrofia acinosa e a possível presença de células acinosas remanescentes nas estruturas ductiformes.

6.2.2 Marcadores imunoistoquímicos para estudo do fenótipo

Em relação aos anticorpos utilizados nesta pesquisa, os mesmos foram escolhidos após minuciosa busca de estudos equivalentes na literatura. Apesar dos poucos trabalhos encontrados, a utilização do anticorpo anti-CK 19 baseou-se em estudos prévios que demonstraram a expressão dessa proteína nas células do sistema ductal de glândulas salivares normais (BORN et al., 1987; GEIGER et al., 1987; MARSHAK e LEITNER, 1987; IHRLER et al., 1999). Para Geiger et al. (1987) e Ihrler et al. (1999), as células acinosas são completamente negativas para CK 19. Na presente pesquisa, a CK 19 foi expressa fracamente em algumas células acinosas (Figura 8B, 8D), corroborando outros autores (BORN et al., 1987; MARSHAK e LEITNER, 1987). Contrariamente, a imunomarcagem de ductos verdadeiros foi forte em todas as lâminas avaliadas e o perfil imunoistoquímico das estruturas ductiformes foi muito semelhante ao dos ductos (Figuras 7, 8B, 8D).

Não foi encontrado na literatura uma citoqueratina exclusiva para células acinosas. A eleição do anti-S-100 baseou-se em estudos que demonstraram a presença da proteína S-100 em células acinosas serosas de glândulas salivares normais e patológicas (NAKAZATO et al., 1985; NINOMIVA et al., 1989). A figura 8 demonstra claramente a expressão de S-100 nos ácinos serosos e “meias-luas” serosas de ácinos mistos. A efetividade do anticorpo usado pode ser constatada pela forte marcação dos feixes nervosos nas lâminas analisadas e sua negatividade para ductos verdadeiros, o que funcionou como um controle interno (Figura 8A, 8C).

O padrão de imunomarcação mostrado pela proteína S-100 foi representado pela marcação nuclear e citoplasmática, enquanto a CK 19 foi representada apenas pela marcação citoplasmática.

6.2.3 Marcadores histoquímicos para estudo do fenótipo

Para a marcação de ácinos mucosos, foram usados o PAS e o Azul de Alcian pH 2,5, ambos de uso já consagrado na rotina dos laboratórios de patologia, especialmente no estudo de lesões de glândulas salivares (GOULART et al., 2011). Apesar dos dois corantes marcarem de maneira muito semelhante (Figura 6, Tabela 8) e não ter havido diferença estatisticamente significativa entre os mesmos ($p = 0,270$), optou-se pela utilização de ambos para que a marcação fosse garantida, uma vez que um deles poderia dar resultados falso-positivos. Desta maneira, um se comportou como contraprova do outro, exibindo padrões de marcação quase que idênticos tanto nos ácinos mucosos como nas estruturas ductiformes.

6.2.4 Marcador imunoistoquímico para estudo da atividade proliferativa celular

Devido ao seu uso consagrado na literatura e sua efetividade comprovada em inúmeros trabalhos, o Ki-67 foi o imunomarcador de proliferação celular por nós escolhido. Trata-se de uma IgG1 de camundongo produzida contra uma fração nuclear da linhagem celular L428 da doença de Hodgkin (BROWN e GATTER, 1990). Por algum tempo, o uso do Ki-67 foi muito limitado devido à necessidade de sua utilização em tecidos frescos. Contudo, a descoberta de novos anticorpos que reconhecem esse antígeno em espécimes fixados em formalina e processados rotineiramente possibilitou a ampliação de seu uso (GERDES et al., 1992). De acordo com Cheuk e Chan (2007), o Ki-67 é o marcador imunoistoquímico mais

amplamente utilizado para o prognóstico de carcinomas de glândulas salivares. Alguns trabalhos têm demonstrado a superioridade do Ki-67 como marcador de proliferação celular por não sofrer tantas influências de fatores internos e externos como o PCNA. Além disso, sua expressão nuclear em um período definido do ciclo celular, em contraste com o PCNA, pode representar uma vantagem em relação ao seu emprego como marcador biológico (ARISAWA et al., 1999).

A princípio, a utilização de material já emblocado em parafina foi uma preocupação por causa da possibilidade de que os anticorpos não funcionassem bem e as marcações ficassem insatisfatórias. Contudo, já no estudo piloto ficou evidente que a qualidade dos anticorpos utilizados associada à técnica laboratorial bem executada permitiu a elaboração de lâminas em condições excelentes. Controles com cortes de tonsilas palatinas garantiram a efetividade do método (Figura 12D).

6.3 Discussão dos resultados

6.3.1 Comparação entre grupos

No presente trabalho o grupo I foi utilizado como controle, no intuito de observar se havia diferença no perfil de marcação/imunomarcação das estruturas ductiformes deste grupo quando comparadas ao grupo senil (grupo II).

No grupo senil, 28 lâminas continham estruturas ductiformes em grande quantidade (Figura 9). A presença de estruturas ductiformes em menos da metade das lâminas do grupo I (n = 12) confirma a constatação de estudos anteriores de que o aparecimento das mesmas é inerente ao processo de envelhecimento (SCOTT, 1977a; SCOTT, 1980; DRUMMOND e CHISHOLM, 1984; De WILDE et al., 1986; KOMESU et al., 1986; SCOTT et al., 1986; DAYAN et al., 2000; AZEVEDO et al., 2005; IWAKI FILHO et al., 2006; MOREIRA et al., 2006; SÁ, 2009). Quando alguma glândula do grupo I apresentava estruturas ductiformes, o número era bastante reduzido e frequentemente restrito à extremidade do lóbulo. É importante ressaltar que o aparecimento de estruturas ductiformes não é exclusivo do processo de envelhecimento, como demonstrado em estudos que induziram a atrofia glandular por meio de obstrução dos ductos (BURFORD-MASON et al., 1993; TAKAHASHI et al., 2002), ou em

processos patológicos como as neoplasias (ARAÚJO et al., 2000; GOULART et al., 2011; DEMASI et al., 2012). Acreditamos que a presença de estruturas ductiformes em glândulas jovens possa ser decorrente de algum agente “agressor”, como, por exemplo, trauma no soalho da boca. A superficialidade com que a glândula sublingual se localiza anatomicamente no soalho da boca pode explicar microtraumas com a alimentação. Outra fator que poderia ser incluído para tentar explicar a presença das estruturas ductiformes nas extremidades das glândulas seria a possibilidade de formação de microcálculos intralobulares que obstruiriam o fluxo salivar normal.

A diferença na imunomarcagem da CK 19 nas estruturas ductiformes foi sutil entre os grupos, embora significativa ($p = 0,033$) (Tabela 7). Entretanto, a expressão dessa proteína ainda foi maior no grupo de idosos, denotando a possibilidade de que, com o tempo, as estruturas ductiformes passem a expressar mais fortemente moléculas do sistema ductal.

6.3.2 Estudo do fenótipo

Considerando estudos em glândulas salivares normais, alguns demonstram que a CK 19 é expressa fortemente em todas as partes do sistema ductal e mostram fraca reação para células acinosas serosas e mucosas (BORN et al., 1987, MARSHAK e LEITNER, 1987). Já para Geiger et al. (1987) e Ihrler et al. (1999), a CK 19 é expressa em células ductais porém completamente ausente nas células acinosas. Em relação à proteína S-100, estudos em glândulas salivares normais e em tumores demonstraram sua forte expressão em células acinosas serosas e expressão fraca nos segmentos ductais (NAKAZATO et al., 1985; NINOMIVA et al., 1989). No presente trabalho, a CK 19 foi fortemente expressa nos ductos verdadeiros e estruturas ductiformes, teve expressão fraca ou ausente para os ácinos serosos e não foi evidenciada nos ácinos mucosos. Já a proteína S-100 foi expressa nas células acinosas serosas, fracamente expressa ou ausente nas estruturas ductiformes e ausente nos ductos verdadeiros e células acinosas mucosas.

Nossos achados corroboram com os trabalhos de Araújo et al. (2000) e Goulart et al. (2011), que delinearam um painel imunoistoquímico para casos de tumores de glândulas salivares. Os autores observaram que as estruturas ductiformes presentes nas lesões eram fortemente positivas para citoqueratinas de baixo peso molecular, dentre elas CK 19. Além disso, Goulart et al. (2011) também utilizaram o PAS e o Azul de Alcian para marcação de

células mucosas e perceberam, por meio desses corantes, a presença de mucina dentro dos ductos e das estruturas ductiformes, o que também ocorreu em nosso estudo (Figura 6C). A marcação parcial de algumas estruturas ductiformes para o PAS e Azul de Alcian (Figura 6B) evidencia um resquício de ácino mucoso que permaneceu depois de uma possível transformação do ácino misto em ducto. Entretanto, a grande maioria de estruturas ductiformes completamente negativas para os marcadores de ácinos mucosos demonstra que, com a senilidade, este processo de transição já está em uma fase avançada evidenciando um fenótipo ductal.

Nos dois grupos, houve diferença estatisticamente significativa entre as imunomarcações para CK 19 e S-100 (Tabelas 9 e 10), sendo que em ambos os grupos a marcação para CK 19 foi mais intensa, demonstrando, mais uma vez, um padrão ductal das estruturas ductiformes. Embora pareça aceitável que as estruturas ductiformes apresentem um perfil cada vez mais ductal com o transcorrer da idade, indicando que as mesmas diminuiriam a expressão da proteína S-100 à medida que a expressão da CK 19 aumentasse, não houve correlação entre os dois imunomarcadores quando aplicado o coeficiente de correlação de Pearson ($\rho = -0,163$; $p = 0,315$), como demonstrado na figura 11. Apesar da correlação estatística ser inexistente, acreditamos que uma relação entre os dois imunomarcadores exista, com aumento da expressão de um enquanto há diminuição da expressão do outro nas estruturas ductiformes com a idade.

6.3.3 Estudo da proliferação celular

Em relação à atividade proliferativa celular, não encontramos nenhuma célula positiva para Ki-67 nas estruturas ductiformes em nenhum grupo (Figura 12A, 12B). A efetividade do anticorpo utilizado pode ser comprovada pela presença de marcação nuclear na camada basal do epitélio estratificado pavimentoso da mucosa oral contido nos mesmos cortes avaliados ou em controles positivos realizados em cortes de tonsilas palatinas, cujos centros germinativos apresentam alto índice de proliferação celular (Figura 12D). Situação semelhante foi encontrada por Dayan e colaboradores (2002) os quais encontraram um índice de proliferação celular de 0% em células acinosas e ductais de glândulas labiais humanas jovens e senis. Células positivas para o Ki-67 foram encontradas apenas nas camadas basal e suprabasal do epitélio labial e em alguns linfócitos presentes no infiltrado inflamatório, o que, para os autores, foi um controle positivo do marcador (DAYAN et al., 2002).

O estudo de Ihrler et al. (1999) mostrou que a positividade nuclear para Ki-67 foi raramente encontrada em células acinosas, basais e ductos intercalares e foi ausente nas células oxifílicas e mioepiteliais de glândulas parótidas humanas normais. Ihrler et al. (2002), utilizando o Ki-67, demonstraram que todos os tipos celulares dos ductos salivares normais têm capacidade muito baixa de proliferação. Entretanto, outros estudos utilizando o PCNA demonstraram atividade mitótica em células ductais e mioepiteliais quando a glândula salivar era induzida à atrofia (BURFORD-MASON et al., 1993; BURGESS et al., 1996).

De acordo com Takahashi et al. (2002), a marcação para PCNA nas células ductais é alta nos primeiros estágios de atrofia glandular e diminui posteriormente, sendo que as estruturas ductiformes são comumente observadas nos estágios mais tardios de atrofia, sugerindo que tanto a mitose (estágios iniciais) quanto o processo de transição de ácinos para ductos (estágios tardios) contribuem no aumento do número de ductos em glândulas sublinguais atroficas. Talvez esses achados expliquem a ausência de imunomarcação para Ki-67 nas estruturas ductiformes por nós investigadas, demonstrando que as mesmas representam um estágio tardio de atrofia (ou envelhecimento) onde a mitose não é mais observada. Todavia, mesmo nas estruturas ductiformes das glândulas jovens não houve indícios de proliferação celular, o que fica difícil de se explicar a não ser o fato dos autores terem usado um outro marcador (PCNA).

6.3.4 Considerações

Na tentativa de explicar a origem e o aumento no número das estruturas ductiformes em glândulas salivares com o envelhecimento, discutiremos duas hipóteses: o processo regressivo de um ácino e a metaplasia, visto que a atividade mitótica já foi descartada.

Se considerarmos a sugestão de Scott et al. (1987) e Takahashi et al. (2002) de que as estruturas ductiformes representam o processo final de atrofia de ácinos, podemos inferir que, na presente investigação, a S-100 foi expressa nas estruturas ductiformes devido à presença de células acinosas serosas remanescentes do processo de atrofia. Diferentemente das células serosas, raramente havia algum resquício de célula mucosa nas estruturas ductiformes (Figura 6B). Frente a esta constatação, hipotetizamos que, se estas estruturas realmente são produtos de regressão de um ácino, o mesmo parece ser misto, com as células mucosas degenerando-se rapidamente enquanto a porção serosa resiste mais e, às vezes, permanece. Esse achado

corroborar com os achados de outros estudos em humanos (AZEVEDO et al., 2005; MOREIRA et al., 2006) e em ratos (NERY et al., 2010), nos quais as células serosas mostraram maior resistência à autólise quando comparadas às células mucosas. Todavia, estes achados vão de encontro aos achados de Vered et al. (2000), que demonstraram diminuição na densidade de volume das células acinosas serosas acompanhada por uma menor redução na densidade de volume das células acinosas mucosas com a idade e de Takahashi et al. (2002) que mostraram serem as células mucosas mais resistentes à obstrução ductal que as serosas.

A constatação de Ihrler et al. (1999) de que ácinos, ductos intercalares e células mioepiteliais sofrem atrofia enquanto as células basais dos ductos são preservadas em lesões autoimunes se assemelha aos fenômenos do envelhecimento, onde os ácinos parecem “desaparecer”. Acreditamos também que os resultados do processo de envelhecimento sejam similares aos do processo de atrofia glandular induzida, onde os ductos tornam-se mais proeminentes e aumentam em número e as células acinosas são quase totalmente perdidas por apoptose (BURFORD-MASON et al., 1993; TAKAHASHI et al., 2002).

A ausência de proliferação celular nas estruturas ductiformes em nossa investigação corrobora os achados de Dayan et al. (2002) os quais demonstraram índice de proliferação de 0% em células ductais. Entretanto, essas mesmas células foram positivas para a técnica AgNOR, mostrando um aumento na síntese proteica celular com a idade. Para os autores este fenômeno pode representar uma possível resposta compensatória das células ductais concomitantemente à atrofia do componente acinoso com a idade.

Com frequência, áreas de “mistura” de células acinosas serosas e ductais foram visualizadas, como ilustrado na figura 10. Ihrler et al. (2002) demonstraram que a evidência de um fenótipo misto sugere a transição e diferenciação de células por meio de metaplasias. Essa transição de um ácino para um ducto pode ser resultado de metaplasia epitelial, definida como a transição reativa de um epitélio diferenciado para outro tipo de epitélio diferenciado caracterizado por uma função prejudicada ou alterada que não é fisiológica no local (IHRLER et al., 2002).

Sabe-se que as glândulas salivares demonstram uma grande variedade de alterações metaplásicas (IHRLER et al., 1999) e esta capacidade poderia explicar as alterações fenotípicas das células, decorrentes do envelhecimento. Para Mintz e Mooradian (1987), glândulas sublinguais sofrem metaplasia do epitélio ductal com a idade. De acordo com Ihrler

et al. (2002), a grande maioria das metaplasias de glândulas salivares desenvolvem-se a partir das células basais dos ductos estriados e excretoras que possuem uma enorme capacidade de diferenciação morfogênética pluridirecional. Contudo, os processos metaplásicos em glândulas salivares ainda não são totalmente estabelecidos e esta hipótese de transição ácino-ducto é especulativa.

Os aspectos fenotípicos encontrados no presente trabalho permitem tanto a hipótese de atrofia acinosa como a de metaplasia, uma vez que áreas mistas de células serosas e ductais foram visualizadas (Figura 10). A figura 10 ilustra o fenótipo misto. É o retrato de uma fase do processo. Assim como Scott et al. (1987) e Takahashi et al. (2002), acreditamos que uma estrutura ductiforme possa representar o processo final de atrofia de um ácino, mas também acreditamos que a metaplasia possa explicar o fenótipo das glândulas envelhecidas. Uma vez que as células ductais primitivas dão origem às células acinosas, essa origem embriológica pode ser responsável pelo processo inverso. O que nos parece certo é que o envelhecimento é um processo dinâmico que culmina em glândulas salivares com um perfil morfológico e molecular ductal.

Extrapolando estes dados para a clínica, entendemos que os ácinos deixam de apresentarem-se como unidades secretoras e passam a exercer atividade condutora da escassa saliva ainda existente (Figura 6C), momento o qual apresentam o fenótipo de estrutura ductiforme. Isto poderia explicar a queda das funções da saliva com a idade. De acordo com Vered et al. (2000) e Dayan et al. (2000), a diminuição no volume de ácinos pode explicar a diminuição na secreção das glândulas salivares com a idade. Segundo Scott (1977b), a junção de todas as alterações microscópicas decorrentes da senescência podem explicar a queda da função glandular. Entretanto, apesar da comprovada diminuição de ácinos com a idade, alguns estudos suportam que as funções salivares permanecem estáveis em pacientes idosos saudáveis (Scott et al., 1987; Ghezzi et al., 2000). Uma das hipóteses é a capacidade de reserva secretória das glândulas que pode ser afetada por fatores externos, como a radioterapia ou o uso de medicamentos, mas não pela senescência (Scott et al., 1987). Para Moreira et al. (2006), devido à dificuldade em coletar saliva oriunda da glândula sublingual e por não haver estudos com testes diretos de fluxo salivar, não se pode afirmar se há diminuição do fluxo salivar da glândula sublingual com a idade.

A implicação clínica das alterações microscópicas decorrentes do envelhecimento nas glândulas salivares ainda não é clara. Apesar das limitações, acreditamos que estudos *in vivo*

possam esclarecer o “porquê” destas alterações e suas consequências. A nosso ver este trabalho representa uma contribuição aos patologistas quanto à compreensão do aparecimento de múltiplas estruturas ductiformes no momento da elaboração de laudos microscópicos. Nos laudos deve constar o fenômeno da senescência em casos de plásticas do soalho da boca, quase sempre realizadas por razões protéticas (Figura 1). Vale destacar que o desconhecimento dos casos como o da figura 1 leva cirurgiões a extirpa-las com suspeitas clínicas de área patológica, especialmente, neoplasias.

A horizontal strip of a histological section of prostate tissue, showing glandular structures and cellular details in grayscale.

7 Conclusão

7 CONCLUSÃO

À luz da metodologia utilizada, podemos concluir:

1. Estruturas ductiformes presentes em glândulas sublinguais humanas apresentam um fenótipo de perfil predominantemente ductal, com uma expressão mais intensa e abrangente da CK-19 em idosos;
2. As estruturas ductiformes não apresentam atividade proliferativa celular.

A horizontal strip of a histological section of prostate tissue, showing glandular structures and cellular details in grayscale.

Referências

REFERÊNCIAS

Amano O, Kenichi Mizobe K, Bando Y, Sakiyama K. Anatomy and Histology of Rodent and Human Major Salivary Glands. *Acta Histochem Cytochem*. 2012; 45(5): 241-50.

Araújo VC, Sousa SOM, Carvalho YR, Araújo NS. Application of Immunohistochemistry to the Diagnosis of Salivary Gland Tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2000; 8(3):195–202.

Arisawa EAL, Moraes E, Rocha RF, Almeida JD. Marcadores biológicos: PCNA e Ki-67. Breve revisão. *Rev Fac Odontol São José dos Campos*. 1999; 2(1):54-60.

Azevedo LR, Damante JH, Lara VS, Lauris JRP. Age-relates changes in human salivary glands: a *post mortem* study. *Arch Oral Biol*. 2005; 50(6):565-74.

Bhaskar SN. *Histologia e Embriologia Oral de Orban*. São Paulo: Artes Médicas, 1989.

Born IA, Schwechheimer K, Maier H, Otto HF. Cytokeratin expression in normal salivary glands and in cystadenolymphomas demonstrated by monoclonal antibodies against selective cytokeratin polypeptides. *Virchows Arch*. 1987; 411:583-9.

Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology*. 1990; 17:489-03.

Burford-Mason AP, Cummins MM, Brown DH, MacKay AJ, Dardick I. Immunohistochemical analysis of the proliferative capacity of duct and acinar cells during ligation induced atrophy and subsequent regeneration of rat parotid gland. *J Oral Pathol Med*. 1993; 22:440-6.

Burgess KL, Dardick I, Cummins MM, Burford-Mason AP, Bassett R, Brown DH. Myoepithelial cells actively proliferate during atrophy of rat parotid gland. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996; 82:674-80.

Campos LA. Hyperplasia of the sublingual glands in adult patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996; 81:584-5.

Castro AL. *Estomatologia*. 2ª ed. São Paulo: Ed. Santos; 1995.

Cheuk W, Chan JKC. Advances in salivary gland pathology. *Histopathology*. 2007; 51(1):1-20.

Dayan D, Vered M, Paz T, Buchner A. Aging of human palatal salivary glands: a histomorphometric study. *Exp Gerontol*. 2000; 35:85-93.

Dayan D, Vered M, Sivor S, Hiss Y, Buchner. Age-related changes in proliferative markers in labial salivary glands: a study of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) and Ki-67. *Exp Gerontol*. 2002; 37:841-50.

Demasi APD, Silva CAB, Silva AD, Furuse C, Soares AB, Altemani A, Napimoga MH, Araújo VC. Expression of the vascular endothelial growth factor and angiopoietins in mucoepidermoid carcinoma of salivary gland. *Head Neck Pathol*. 2012; 6:10-5.

De Wilde PC, Baak JP, Van Houwelingen JC, Karter L, Slootweg PJ. Morphometric study of histological changes in sublabial salivary glands due to age process. *J Clin Pathol*. 1986; 39:406-17.

Domaneschi C, Maurício AR, Modolo F, Migliori DA. Idiopathic hyperplasia of sublingual glands in totally or partially edentulous individuals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007; 103(3):374-7.

Drummond JR, Chisholm DM. A qualitative and quantitative study of the ageing human labial salivary glands. *Arch Oral Biol*. 1984; 29:151-5.

Dubrul EL. *Anatomia oral de Sicher*. 8ª ed. São Paulo: Arte Médicas; 1991.

Furuse C, Cury PR, Araújo NS, Araújo VC. Immunoexpression of extracellular matrix proteins in human salivary gland development. *Eur J Oral Sci*. 2004; 112(6):548-51.

Geiger S, Geiger B, Leitner O, Marshak J. Cytokeratin polypeptides expression in different epithelial elements of human salivary glands. *Virshows Arch*. 1987; 410:403-14.

Gerdes J, Becker MHG, Key G. Immunohistological detection of tumor growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin fixed and routinely tissues. *J Pathol*. 1992; 168(1):85-7.

Ghezzi EM, Wagner-Lange LA, Schork MA, Metter EJ, Baum BJ, Streckfus CF, et al. Longitudinal influence of age, menopause, hormone replacement therapy, and other

medications on parotid flow rates in healthy women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2000; 55(1):M34-M42.

Goulart MCV, Freitas-Faria P, Goulart GR, Oliveira AM, Carlos-Bregni R, Soares CT, Lara VS. Pleomorphic adenoma with extensive squamous metaplasia and keratin cyst formations in minor salivary gland: a case report. *J Appl Oral Sci*. 2011; 19(2):182-8.

Ianez, RCF, Buim MEC, Coutinho-Camillo CM, Lourenço SV, Soares FA. Estudo morfológico das células mioepiteliais no desenvolvimento das glândulas salivares humanas relação entre a maturação das células mioepiteliais e as fases da morfogênese glandular [Resumo]. In: Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética; 2008 setembro 16-19; Salvador, BA [anais eletrônicos]. Salvador: SBG; 2008 [acesso em 2012 mar 14]. Disponível em: <http://web2.sbg.org.br/congress/sbg2008/pdfs2008/24930.pdf>.

Ihrler S, Zietz C, Sendelhofert A, Riederer A, Löhrs U. Lymphoepithelial duct lesions in Sjögren-type sialadenitis. *Virchows Arch*. 1999; 434:315-23.

Ihrler S, Zietz C, Sendelhofert A, Lang S, Blasenbreu-Vogt S, Löhrs U, A morphogenetic concept of salivary duct regeneration and metaplasia. *Virchows Arch*. 2002; 440:519-26.

Iwaki Filho L. Tumefações do soalho da boca relacionadas às glândulas sublinguais em desdentados parciais e totais. Estudo clínico e microscópico [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 1999.

Iwaki Filho L, Damante JH, Consolaro A, Bonachela WC, Damante CA. Mouth floor enlargements related to the sublingual glands in edentulous or partially edentulous patients. A microscopic study. *J Appl Oral Sci*. 2006; 14(4):264-9.

Komesu MC, Lopes RA, Petenusci SO, Silva-Netto CR, Lopes OVP, Campos GM. Alterações morfológicas da glândula submandibular do rato determinadas pelo envelhecimento. *Rev Fac Odontol Ribeirão Preto*. 1986; 23:79-88.

Komesu MC, Lopes RA, Petenusci SO, Silva-Netto C, Campos GM, Lopes OVP. Estudo morfométrico das alterações da glândula submandibular do rato determinadas pelo envelhecimento. I. Ácinos. *Arch Cent Est Cur Odontol*. 1987; 24:9-26.

Komesu MC, Lopes RA, Petenusci SO, Silva-Netto C, Campos GM, Lopes OVP. Estudo morfométrico das alterações da glândula submandibular do rato determinadas pelo envelhecimento. II. Ductos. *Rev Fac Odontol Lins*. 1989; 2(1):11-20.

Mandel L, Romao M. Sublingual salivary gland enlargement. *NY State Dent J.* 2004; 70(7):24-7.

Marshak G, Leitner O. Cytokeratin polypeptides in normal and metaplastic human salivary gland epithelia. *J Oral Pathol Med.* 1987; 16(9):442-9.

Mintz GA, Mooradian AD. Age-related changes in rat sublingual salivary gland morphology. *Gerodontol.* 1987; 6:137-44.

Moreira CR, Azevedo LR, Lauris JRP, Taga R, Damante JH. Quantitative age-related differences in human salivary gland. *Arch Oral Biol.* 2006; 51(11):960-6.

Nakazato Y, Ishida Y, Takahashi K, Suzuki K. Immunohistochemical distribution of S-100 protein and glial fibrillary acidic protein in normal and neoplastic salivary glands. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1985; 405(3):299-310.

Nery LR, Moreira CR, Cestari TM, Taga R, Damante JH. Postmortem acinar autolysis in rat sublingual gland: a morphometric study. *J Appl Oral Sci.* 2010; 18(5):509-14.

Ninomiya T, Naito R, Okada Y, Kobayashi K, Mori M, Tsukitani K. Immunohistochemical localization of the alpha and beta subunits of S-100 protein in pleomorphic adenoma of the salivary glands. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1989; 57(1):63-75.

Sá JCR. Comparação microscópica de glândulas sublinguais de cadáveres humanos e de pacientes desdentados portadores de tumefações do soalho da boca relacionadas às glândulas sublinguais: estudo morfológico e morfométrico [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2009.

Scott J. Age, sex and contralateral differences in the volumes of human submandibular salivary glands. *Arch Oral Biol.* 1975; 20:885-7.

Scott J. Quantitative age changes in the histological structure of human submandibular salivary glands. *Arch Oral Biol.* 1977a; 22:221-7.

Scott J. Degenerative changes in the histology of the human submandibular salivary gland occurring with age. *J Biol Buccale.* 1977b; 5:311-9.

Scott J. Qualitative and quantitative observations on the histology of human labial salivary glands obtained post mortem. *J Biol Buccale.* 1980; 8:187-200.

Scott J, Bodner L, Baum BJ. Assessment of age-related changes in the submandibular and sublingual salivary glands of the rat using stereological analysis. Short communication. Arch Oral Biol. 1986; 31:69-71.

Scott J, Flower EA, Burns J. A quantitative study of histological changes in the human parotid gland occurring with adult age. J Oral Pathol. 1987; 16:505-10.

Soini Y, Puhakka A, Kahlos K, Saily M, Paakko P, Koistinen P, et al. Endothelial nitric oxide synthase is strongly expressed in malignant mesothelioma but does not associate with vascular density or the expression of VEGF, FLK1 or FLT1. Histopathol. 2001; 39(2):179-86.

Takahashi S, Shinzato K, Nakamura S, Domon T, Yamamoto T, Wakita M. The roles of apoptosis and mitosis in atrophy of the rat sublingual gland. Tissue Cell. 2002; 34:297-304.

Ten Cate R. Histologia Bucal. 5^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Vered M, Buchner A, Boldon P, Dayan D. Age-related histomorphometric changes in labial salivary glands with special reference to the acinar component. Exp Gerontol. 2000; 35:1075-84.

Waterhouse JP, Chisholm DM, Winter RB, Patel M, Yale RS. Replacement of functional parenchymal cells by fat and connective tissue in human submandibular salivary glands: an age-related change. J Oral Pathol. 1973; 2:16-27.

A horizontal strip of a black and white micrograph showing a cross-section of biological tissue. The image displays various cellular structures, including what appear to be glandular or ductal formations with lumens, surrounded by a dense population of cells with visible nuclei. The overall texture is granular and complex, typical of histological sections.

Apêndice

APÊNDICE A – Imunomarcacão de elementos glandulares nos estudos abordados

	S-100					CK 19					Ki-67				
	Ácinos		Cel. Mioep.	Ductos*	EDs	Ácinos		Cel. Mioep.	Ductos*	EDs	Ácinos		Cel. Mioep.	Ductos*	EDs
	(S)	(M)				(S)	(M)				(S)	(M)			
Presente pesquisa	+++	0	---	0	+ / ++	+ / ++	0	---	+++	+++	0	0	0	0	0
Geiger et al. (1987)	---	---	---	---	---	0	0	0	+++	---	---	---	---	---	---
Born et al. (1987)	---	---	---	---	---	+	+	+++	+++	---	---	---	---	---	---
Ihrler et al. (1999)	---	---	---	---	---	0	x	+++	+++	---	b	---	0	b	---
Araújo et al. (2000)**	---	---	---	---	---	---	--	---	---	+++	---	---	---	---	---
Ihrler et al. (2002)	---	---	++	---	---	---	--	---	---	---	b	b	b	b	---
Marshak e Leitner (1987)	---	---	---	---	---	+	+	+	+++	---	---	---	---	---	---
Goulart et al., 2011**	---	---	++	---	---	+	+	-	+++	+++	---	---	---	---	---
Nakazato et al., 1985	+++	0	---	0	0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Ninomiva et al., 1989	+++	0	---	0	0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

0 Ausência de marcação, + Marcação fraca, ++ Marcação moderada, +++ Marcação forte.

(a) Alto índice de proliferação. (b): baixo índice de proliferação.

---: Ausência de informação/ Variável não testada.

(S) Seroso. (M) Mucoso. Cel. Mioep.: células mioepiteliais. EDs: Estruturas ductiformes.

*Sem distinção entre os tipos celulares.

**Estudos em glândulas salivares patológicas.

A horizontal strip of a histological section of prostate tissue, showing glandular structures and stromal components. The glands are lined by epithelial cells, and the stroma contains connective tissue and small blood vessels.

Anexos

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do SVOC

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
SERVIÇO DE VERIFICAÇÃO DE ÓBITOS DA CAPITAL

**Manifestação prévia a respeito dos aspectos técnicos relacionados
à obtenção de material de estudo para pesquisa científica**

Título da pesquisa: Efeitos do envelhecimento sobre as glândulas
sublinguais humanas. Estudos clínico e microscópico

Responsável: José Humberto Damante

Em relação aos aspectos técnicos relacionados à obtenção de
material de estudo para pesquisa científica mencionada acima, informamos
não haver impedimento do ponto de vista técnico e nem risco de mutilação.

São Paulo, 05 de outubro de 2001.

Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci

ANEXO B - Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FOB-USP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comitê de Ética em Pesquisa

Proc. CEP nº 059/2010

Bauru, 6 de novembro de 2012.

Senhor Professor,

Informamos a Vossa Senhoria que após análise por um Relator deste Comitê de Ética em Pesquisa, o **Relatório Final** do trabalho de pesquisa **Avaliação fenotípica das estruturas ductiformes no processo de envelhecimento de glândulas sublinguais humanas**, de autoria de Elen de Souza Toientino, sob sua orientação, foi considerado **aprovado** em reunião deste Comitê, realizada no dia **31 de outubro de 2012**.

Aprovou-se ainda, pequenas modificações no projeto de pesquisa, incluindo a alteração do título para **Avaliação do fenótipo e da proliferação celular das estruturas ductiformes no processo de envelhecimento de glândulas sublinguais humanas**.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª Maria Teresa Atta
Vice-Coordenadora

Prof. Dr. José Humberto Damante
Docente do Departamento de Estomatologia

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73
e-mail: cep@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356
<http://www.fob.usp.br>

ANEXO C - Autorização para utilização das amostras

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14) 3235-8000 – FAX (0XX14) 3223-4679

Departamento de Estomatologia
e-mail: dep-esto@fob.usp.br – Fone: (0XX14) 3235-8254

Eu, **José Humberto Damante**, Professor Titular do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, declaro ser **responsável** pelo material* que consta neste projeto e **autorizo** o uso do mesmo para realização desta pesquisa.

*O material trata-se de glândulas sublinguais humanas obtidas em necropsias, as quais foram coletadas no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC) e processadas no Laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo. Estas etapas foram realizadas em uma pesquisa anterior, aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do SVOC, e que resultou em uma tese de minha orientação [Azevedo LR. Alterações microscópicas com a idade em glândulas sublinguais humanas. Estudo *post mortem* [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2003].

Atenciosamente,

José Humberto Damante

Bauru, 10 de junho de 2010.