

## Glândula submandibular de ratos com envelhecimento: observações ao microscópio eletrônico de varredura de alta resolução<sup>1</sup>

Ii-Sei Watanabe<sup>2\*</sup>, Juliana P. Guimarães<sup>3</sup>, Koichi Ogawa<sup>4</sup>, Mamie M. Iyomasa<sup>5</sup>, Maria Angélica Miglino<sup>8</sup>, Marcelo Cavenaghi P. Silva<sup>6</sup>, Marisa Semprini<sup>5</sup>, Márcia Consentino K. Sosthines<sup>7</sup>, Marília O. Lopes<sup>2</sup> e Ruberval A. Lopes<sup>5</sup>

**ABSTRACT.**- Watanabe I., Guimarães J.P., Ogawa K., Iyomasa M.M., Miglino M.A., Silva M. C.P., Semprini M., Sosthines M.C.K., Lopes M.O. & Lopes R.A. 2007. [Submandibular gland of rats with ageing: observations with high resolution scanning electron microscopy.] Glândula submandibular de ratos com envelhecimento: observações ao microscópio eletrônico de varredura de alta resolução. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 27(12):501-505. Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Cidade Universitária, Av. Prof. Dr. Orlando Maruer de Paiva 87, 05389-970, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: [watanabe@icb.usp.br](mailto:watanabe@icb.usp.br)

The three-dimensional characteristics of the intracellular components of acinar and ductal cells were revealed using the osmium-DMSO-osmium method. The samples were macerated in diluted osmium after fractured in DMSO solution. The stacks of the rough endoplasmic reticulum are revealed intermingling by several mitochondria. The lamellae of the rough endoplasmic reticulum are located around the nuclei at basal portion and these structures are shown in three-dimensional HRSEM images.

INDEX TERMS: Submandibular gland, rough endoplasmic reticulum, mitochondria, rat, HRSEM.

**RESUMO.**- As características tridimensionais dos componentes intracelulares de células acinares e de ductos foram reveladas usando o método ósmio-DMSO-ósmio. As amostras foram maceradas em solução de tetróxido de ósmio diluído após a fratura na solução de dimetil sulfoxido. As lamelas do

retículo endoplasmático granular são reveladas entremeadas por várias mitocôndrias. As lamelas do retículo endoplasmático granular são localizados ao redor dos núcleos na porção basal e estas estruturas são observadas em imagens tridimensionais de microscopia eletrônica de alta resolução.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Glândula submandibular, retículo endoplasmático granular, mitocôndria, rato, microscopia eletrônica de alta resolução.

### INTRODUÇÃO

As estruturas de glândulas salivares de vários animais foram relatadas utilizando a microscopia eletrônica de transmissão por vários autores (Leeson & Jacob 1959, Scott & Pease 1959, Tamarin & Sreebny 1965, Leeson 1969, Garret & Parsons 1973, Riva & Riva-Testa 1973, Tandler & Erlandson 1976, Tandler & Poulsen 1976, Cope et al. 1977, Boshell & Willborn 1978, Young & Lenep 1978, Pinkstaff 1980, König et al. 1986, Watanabe et al. 1992a) apresentando a ultra-estrutura das células acinares e dos ductos com suas organelas. O método de microscopia eletrônica de varredura de alta resolução surgiu na década de 1980, com os primeiros trabalhos de Tanaka (1981). As imagens tridimensionais intracelulares tais como mitocôndria, apare-

<sup>1</sup> Recebido em 17 de agosto de 2007.

Aceito para publicação em 26 de novembro de 2007.

<sup>2</sup> Depto Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas, e Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), 05389-970, São Paulo, Brasil. \*Autor para correspondência: [watanabe@icb.usp.br](mailto:watanabe@icb.usp.br)

<sup>3</sup> Pós-Graduanda em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, FMVZ, USP, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, 05508-270 São Paulo, SP.

<sup>4</sup> Department of Anatomy, School of Medicine, Fukuoka University, 45-1, 7-Chome Nanakuma, Jonan-KU, Fukuoka 814-01, Japan.

<sup>5</sup> Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, Av. do Café s/n, Ribeirão Preto, SP 14040-904.

<sup>6</sup> Depto Morfologia, Unifesp, Rua Botucatu 740, Vila Clementino, São Paulo, SP 04023-900.

<sup>7</sup> Depto Morfologia, Universidade Federal do Pará, Av. Augusto Corrêa 1, Campus Guamá, Belém, PA 66075-110, Brasil.

<sup>8</sup> Depto Cirurgia, FMVZ, USP, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, São Paulo, SP 05508-270.

ho de Golgi e retículo endoplasmático granular foram relatadas por Tanaka (1981, 1989), Tanaka & Naguro (1981), Tanaka et al. (1989), Hollenberg & Lea (1988, 1989), Mitsushima & Tanaka (1990), Watanabe et al. (1992a,b, 1994, 1996, 1997a,b,c), D'Avola et al. (2006). No presente trabalho utilizamos o método de Tanaka (1989) para estudar as características tridimensionais das organelas intracelulares de glândula salivar submandibular de ratos com envelhecimento empregando a microscopia eletrônica de varredura de alta resolução.

## MATERIAL E MÉTODOS

Glândulas submandibulares de ratos Wistar com envelhecimento foram fixadas por imersão em solução de tetróxido de ósmio a 2% em solução tampão fosfato de sódio a 1/15M e pH 7,4 a 4°C por 2 horas de acordo com o método descrito por Tanaka (1989). As peças foram lavadas em solução tampão fosfato de sódio durante 8 horas e imersas em solução aquosa de dimetil sulfoxido (DMSO) a 12,5%, 25% e 50% por 30 minutos cada uma. As amostras foram fraturadas em DMSO a 50% congeladas em nitrogênio líquido, utilizando-se o aparelho Eiko-TF-2. As peças fraturadas foram colocadas em solução de DMSO a 50% para descongelamento. Estas foram lavadas em água destilada por 20 minutos, pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 2% durante 2 horas a 4°C e então, maceradas em solução diluída de tetróxido de ósmio a 0,1% durante 48-60 h à temperatura de 20°C. Após a lavagem em água destilada durante 15 minutos, as peças foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 2% durante 2 horas a 4°C, lavadas em água destilada por 3 horas e tratadas em solução de ácido tânico a 2% durante 60 minutos à temperatura ambiente. Seguiu-se a lavagem em água destilada por 5 horas e desidratadas em série crescente de álcoois e secagem em aparelho ID-2 Eiko. As amostras foram montadas em bases de ouro com a pasta de prata-carbono e metalizadas com os íons de ouro-paládio em "Íon-Beam Sputter", Eiko-Japão. As amostras foram examinadas em um microscópio eletrônico de varredura Hitachi

S-900, para a obtenção de imagens estereoscópicas com as inclinações +8 e -8 graus e +10 e -10 graus a partir da posição inicial 0° com 10kV.

## RESULTADOS

As amostras resultantes da maceração em solução de tetróxido de ósmio a 0,1% revelaram as estruturas membranosas intracelulares. A disposição do retículo endoplasmático granular, mitocôndrias e as estruturas capsulares são reveladas na Figura 1A. Observa-se na fratura transversal de um ducto a presença de células piramidais e a concentração de grânulos serosos na porção apical do citoplasma celular (Fig.1B). As Figuras 2A,B, 2C,D e 3A,B mostram os pares estereoscópicos revelando as estruturas intracelulares em aspectos tridimensionais. A porção acinar mostra claramente superfícies fraturadas e maceradas contendo os grânulos de secreção (Fig.3C,D).

A superfície de fratura revela as mitocôndrias cujas lâminas de membrana aparecem em duas. Internamente projetam-se as cristas mitocondriais em aspectos tridimensionais. Nas superfícies de secção de mitocôndrias notam-se claramente as faces medindo aproximadamente 0,4-0,5µm em diâmetro. As lamelas da crista mitocondrial são notadas em aspectos tridimensionais. Nas células acinares de glândula submandibular de ratos com envelhecimento, observa-se nitidamente as lamelas do retículo endoplasmático granular, entremeados de núcleos e mitocôndrias na porção basal do citoplasma (Fig.1B). O retículo endoplasmático é disposto em arranjos de lamelas ao redor do núcleo. Geralmente as superfícies fraturadas, mostram a concentração de numerosos grânulos de secreção na porção apical contendo a forma circular e diâmetros que variam de 0,3 a 1,2µm (Fig.3A,B). Entretanto, após a maceração do tecido com a solução de tetróxido de ósmio diluído, os grânulos podem ser eliminados pela dissolução do citosol.

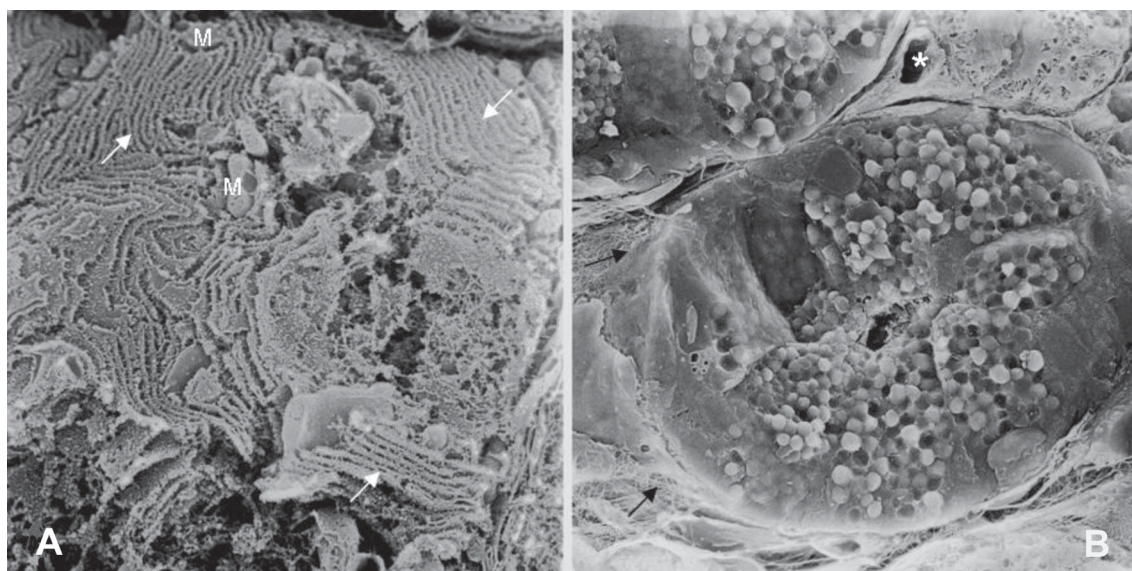


Fig.1. (A) Disposição de retículo endoplasmático granular na base do citoplasma celular (setas) entremeadas de mitocôndrias (M) em aspectos tridimensionais, em amostra fixada em tetróxido de ósmio a 2% e macerada em solução de tetróxido de ósmio diluído. 14.000x; (B) Células de um ducto estriado contendo os grânulos serosos na porção apical e o lúmen do ducto na porção central. Periféricamente, observam-se os feixes de fibras colágenas da cápsula (setas) e capilar (\*). 3.600x.

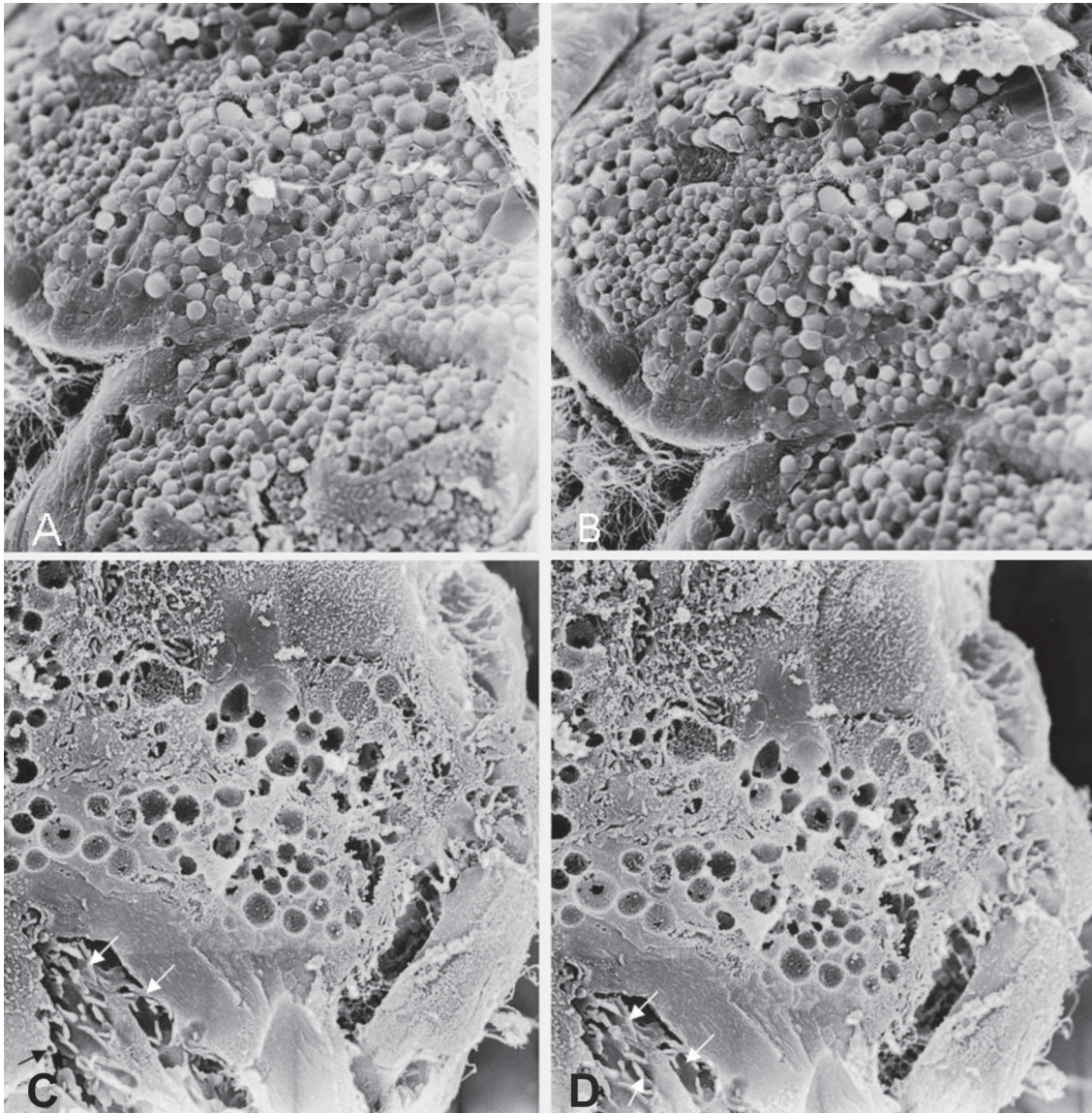


Fig.2. (A,B) Par estereoscópico de ducto estriado da glândula submandibular de rato com envelhecimento. Observa-se a concentração de grânulos serosos na porção apical do citoplasma celular. Inclinação de +8 e -8 graus. 2.500x; (C,D) Par estereoscópico de célula acinar revelando os aspectos de grânulos mucosos da glândula submandibular de rato com envelhecimento. Observam-se as interdigitações citoplasmáticas (setas). Inclinação de +8 e -8 graus. 7.000x.

A cápsula dos ácinos e ductos estriados são formados pela lâmina basal esponjosa e uma rede de fibras colágenas com feixes de fibras colágenas externamente (Fig.1B). Em aumentos maiores, pode-se notar nitidamente o aspecto esponjoso da estrutura da lâmina basal contendo algumas fibrilas colágenas.

### DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram as estruturas da glândula submandibular de ratos com envelhecimento. Evidenciaram claramente as formações acinares terminais e estruturas de ductos cujos aspectos tridimensionais, através de imagens estereoscópicas, revelaram claramente as organelas celulares e a distribuição dos grânulos de secreção mucosa e serosa. Estes dados são semelhantes àqueles obtidos em microscopia

eletrônica de transmissão por Leeson & Jacob (1959), Tamarin & Sreebny (1965), Leeson (1969), Young & Lennep (1978) e Pinkstaff (1980). As observações em microscopia eletrônica de varredura de alta resolução confirmam as características de células acinares reveladas por cortes ultrafinos e examinadas em microscopia eletrônica de transmissão. Conforme foi demonstrado por Tanaka (1981, 1989), Watanabe et al. (1992b) o método aqui usado remove a matriz citoplasmática das superfícies fraturadas das células acinares e de ducto.

Foi observado que o processo de maceração varia com o tipo celular ou estruturas a serem examinadas e confirmam os relatos de Tanaka (1981, 1989) demonstrados em experimentos empregando a hipófise, fígado, pâncreas, células nervosas, epidídimo, e Watanabe et al. (1992b, 1994, 1996, 1997a,b,c)

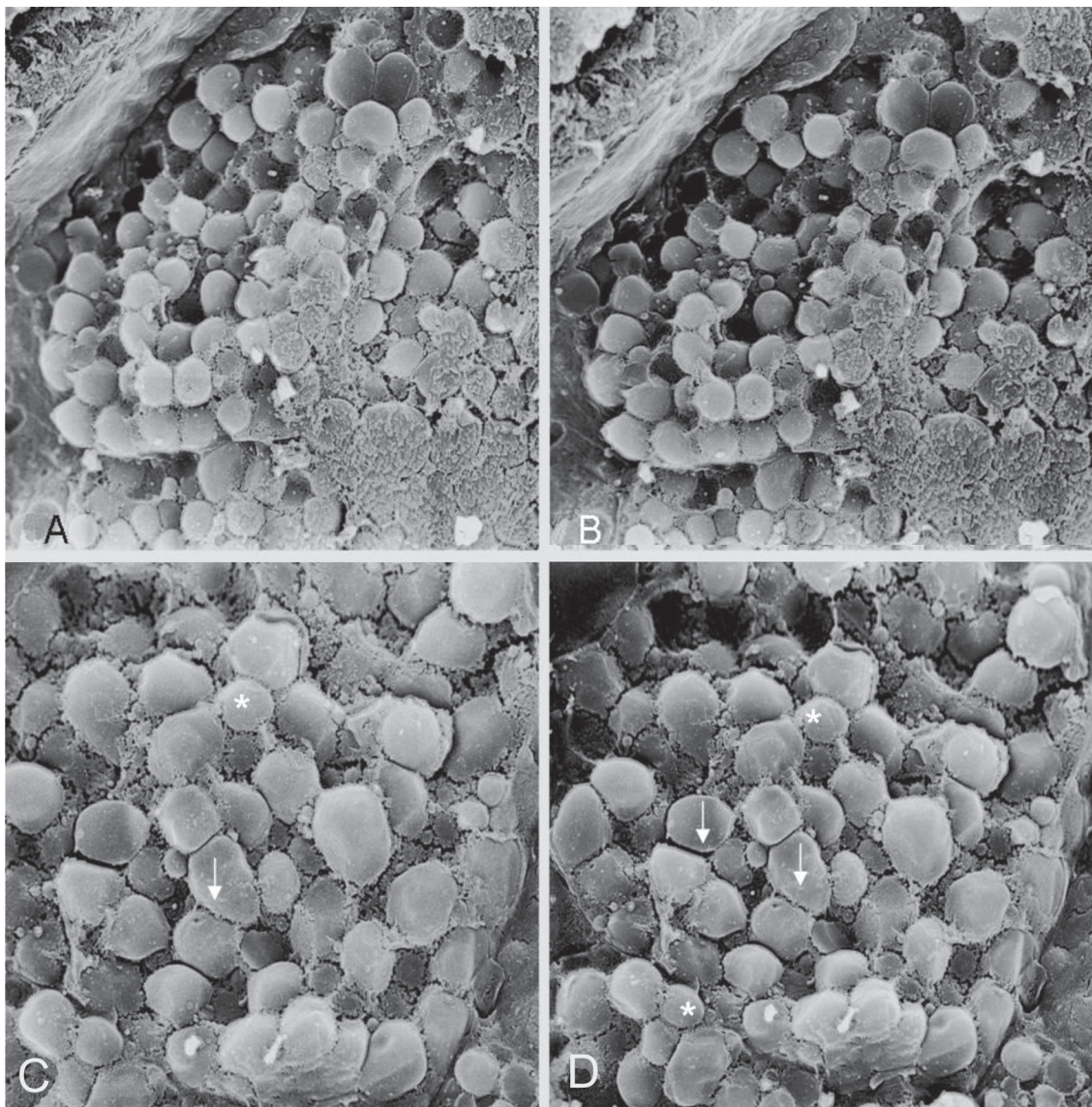


Fig.3. **(A,B)** Par estereoscópico da porção citoplasmática da célula do ducto estriado. Observam-se os grânulos de secreção serosa na porção apical, apresentando vários diâmetros, notadas em aspectos tridimensionais. Inclinação de +10 e -10 graus. 6.000x; **(C,D)** Par estereoscópico da célula acinar revelando os grânulos serosos de diferentes diâmetros. As formas modificadas são claramente notadas (setas) e grânulos (\*). Inclinação de +8 e -8 graus. 11.000x.

referindo-se com relação ao tempo e temperatura de maceração e substância fixadora. O retículo endoplasmático granular das células acinares apresenta lamelas formadas por numerosas cisternas planas dispostas paralelamente entremeadas de mitocôndrias e grânulos de secreção serosa e mucosa na porção apical do citoplasma celular. Comparando os dados obtidos no presente trabalho com aqueles de ratos adultos obtidos anteriormente (Watanabe et al. 1994) verificou-se que houve alterações principalmente nas formas de grânulos de secreção onde em animais com envelhecimento apresentaram formas alongadas e irregulares. Observou-se os núcleos da célula acinar na porção basal do citoplasma celular rodeado de retículo endoplasmático granular têm sido relatados em células de vários tecidos por Tanaka (1981, 1989), Hollenberg & Lea (1988, 1989), Iwashita & Naguro (1990), Watanabe et al. (1992b, 1994,

1996, 1997a,b,c) e por D'Ávila et al. (2006). Por outro lado, salienta-se que no revestimento externo dos ácinos e ductos estriados existem a lâmina basal formada por uma estrutura esponjosa irregular contendo fibras colágenas de vários diâmetros. Aspectos similares foram descritos por Ushiki et al. (1990) referindo-se sobre as estruturas da lâmina basal das células de Schwann e por Watanabe et al. (1992b) revelando a lamina basal das células acinares da glândula submandibular de camundongos.

## REFERÊNCIAS

- Cope G.H., Pratten M.K. & Williams M.A. 1976. Correlative morphological and biochemical study of the effects of isoprenaline on the organelle and membrane content of the rabbit parotid gland. *Histochem. J.* 8:403-418.
- D'Ávila T.E., Ogawa K., Silva M.R.M.A., Motoyama A.A., Inácio E., König Junior

- B. & Watanabe I. 2006. Three-dimensional characteristics of submandibular salivary gland of ageing rats: an HRSEM study. *Annals of Anatomy* 188:431-438.
- Garret J.R. & Parsons P.A. 1973. Alkaline phosphatase and myoepithelial cells in the parotid gland of the rat. *Histochem J.* 5:463-471.
- Hanaki M., Tanaka K. & Kashima Y. 1985. Scanning electron microscopic study on mitochondrial cristae in the rat adrenal cortex. *J. Electron. Microsc.* 34:373-380.
- Hollenberg M.J. & Lea P.J. 1988. High resolution scanning electron microscopy of the retinal pigment epithelium and Bruch's layer. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 29:1380-1389.
- Hollenberg M.J. & Lea P.J. 1989. Advantages of visualization of organelle structure by high resolution scanning electron microscopy. *Scanning* 11:157-168.
- Iwashita K. & Naguro T. 1990. Intracellular structure of the olfactory epithelial cells observed by scanning electron microscopy. *Yonago Acta Medica* 33:175-194.
- Konig Jr. B. & Kuhnel W. 1986. Light and electronmicroscopical studies of the parotid and submandibular gland in the cat. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* 100:469-483.
- Leeson C.R. 1969. The fine structure of the parotid gland of the spider monkey. *Acta Anat.* 72:133-147.
- Leeson C.R. & Jacoby F. 1959. An electron microscopic study of the rat submaxillary gland during its postnatal development and in the adult. *J. Anat.* 93:287-295.
- Mitsushima A. & Tanaka K. 1990. Ultra-high resolution scanning electron microscopy in biological research. *J. Scanning Microsc.* 12:24-26.
- Pinkstaff C.A. 1980. The cytology of salivary glands. *Int. Rev. Cytol.* 63:141-261.
- Riva A. & Riva-Testa F. 1973. Fine structure of acinar cells of human parotid gland. *Anat. Rec.* 176:149-66.
- Scott B.L. & Pease D.C. 1959. Electron microscopy of the salivary and lacrimal glands of the rat. *Am. J. Anat.* 104:115-140.
- Tamarin A. 1966. Myoepithelium of the rat submaxillary gland. *J. Ultrastruct. Res.* 16:320-338.
- Tamarin A. & Sreebny L.M. 1965. The rat submaxillary salivary gland: A correlative study by light and electron microscopy. *J. Morphol.* 117:295-352.
- Tanaka K. 1981. Demonstration of intracellular structures by high resolution scanning electron microscopy. *Scan. Electron Microsc.* 2:1-8.
- Tanaka K. 1989. High resolution scanning electron microscopy of the cell. *Biol. Cell* 65:89-98.
- Tanaka K. & Naguro T. 1981. High resolution scanning electron microscopy of cell organelles by a new specimen preparation method. *Biomed. Res.* 2:63-70.
- Tanaka K., Mitsushima A., Kashima Y., Nakadera T. & Fukudome H. 1989. Ultra-high resolution scanning electron microscopy of biological materials. *Cell Tissues. Prog. Clin. Biol. Res.* 295:21-30.
- Tandler B. & Eerlandson R.A. 1976. Ultrastructure of baboon parotid gland. *Anat. Rec.* 184:115-132.
- Tandler B. & Poulsen J.H. 1976. Ultrastructure of the main excretory duct of the cat submandibular gland. *J. Morphol.* 149:183-198.
- Ushiki T., Hayashi S. & Ide C. 1990. The filamentous meshwork in the Schwann cell basement membrane as revealed by transmission and scanning electron microscopy. *Arch. Histol. Cytol.* 53:523-530.
- Young J.A. & Lenep E.W. 1978. *The Morphology of Salivary Glands.* Academic Press, London.
- Watanabe I., Ogawa K., Koriyama Y. & Yamada E. 1992a. Rat submandibular gland: fractured surface observed by scanning electron microscopy. *Revta Ciênc. Biomed.* 13: 89-93.
- Watanabe I., Koriyama Y. & Yamada E. 1992b. High resolution scanning electron microscopic study of the mouse submandibular salivary gland. *Acta Anat.* 143:59-66.
- Watanabe I., Yamada E., Kawano Y. K. & Ogawa K. 1994. Scanning electron microscopy of acinar cells of rat submandibular salivary glands. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27:1-9.
- Watanabe I., Seguchi H., Okada T., Kobayashi T., Jin Q.S. & Jiang X.D. 1996. Fine structure of the acinar and duct cell components in the parotid and submandibular salivary glands of the rat: a TEM, SEM, and HRSEM study. *Histol. Histopathol.* 11:103-110.
- Watanabe I., Jin C. & Nagata T. 1997a. Field Emission SEM, conventional TEM and HVTEM study of salivary gland in prenatal and postnatal aging mouse. *Histol. Histopathol.* 12: 447-457.
- Watanabe I., Ogawa K., Yamada E. & Konig Jr B. 1997b. Three-dimensional images of the mouse submandibular gland: an HRSEM study. *Ann. Anat.* 179:157-160.
- Watanabe I., Nagata T. & Jin C. 1997c. Development of mouse submandibular gland studied by field emission scanning electron microscopy. *Ital. J. Anat. Embryol.* 102(1):49-57.