ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA

ESTUDO BIOQUÍMICO E ULTRAESTRUTURAL DA MATRIZ EXTRACELULAR DURANTE ATROFIA EXPERIMENTAL DE GLÂNDULAS SUBMANDIBULARES DE RATOS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Odontologia (Área de Biologia e Patologia Buco-Dental) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Ciência.

Orientador: **Prof. Dr. Sérgio R. Peres Line - FOP/UNICAMP**

PIRACICABA-SP

-1996-

UNIDADE: BC
Nº CHAMADA: T/UNICAMP Z13e
V. Ex.
TOMBO BC/27919
PROC. 067/96
D [ ] D [X]
PREÇO R$ 11,00
DATA 04/07/96
Nº CPD
CM-00085547-2

Ficha Catalográfica Elaborada pela Biblioteca da FOP/UNICAMP

Z13e

Zaia, Alexandre Augusto.
Estudo bioquímico e ultraestrutural da matriz extracelular durante atrofia experimental de glândulas submandibulares de ratos / Alexandre Augusto Zaia. - Piracicaba : [s.n.], 1995.
68 f. : il.
Orientador : Sérgio Roberto Peres Line.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.
1. Glândulas salivares. 2. Matriz extracelular. 3. Metaloproteínas. I. Line, Sérgio Peres II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título

19.CDD - 616.316
- 616.3995
- 612.015

Índices para o Catálogo Sistemático

1. Glândulas salivares 616.316
2. Matriz extracelular 616.3995
3. Metaloproteínas 612.015

Este exemplar foi
definitivamente
redação da CPG/1036/33
Piracicaba, 25 de março 1996

ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA

ESTUDO BIOQUÍMICO E ULTRAESTRUTURAL DA MATRIZ EXTRACELULAR DURANTE ATROFIA EXPERIMENTAL DE GLÂNDULAS SUBMANDIBULARES DE RATOS

PIRACICABA-SP

-1996-

Z13e
27919/BC

UNICAMP

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 27/05/96, considerou o candidato aprovado.

1. SÉRGIO ROBERTO PERES LINE

2. FRANCISCO JOSÉ DE SOUZA FILHO

3. ALBINA MESSIAS ALTEMANI

4. NEY SOARES DE ARAÚJO

5. PAULO HILÁRIO SALDIVA

Dedico esse trabalho ...

...à Herika pela companhia e carinho.

Aos meus pais LOURENÇO e MARIA HELENA, pela paciência, orientação e apoio constantes.

AGRADECIMENTOS

Aos profs. da disciplina de Patologia Drs. LOURENÇO BOZZO, OSLEI PAES DE ALMEIDA, JACKS JORGE JR., MÁRCIO A. LOPES, EDGARD GRANER E RICARDO D. COLETTA, pelo companherismo, estímulo e apoio constantes.

Aos Profs. do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

Aos funcionários da Disciplina de Patologia ADRIANO LUIS MARTINS, ANA CRISTINA DO AMARAL, MARIA HELENA DE V. PERON E ROSA MARIA FORNASIER, pela colaboração nesse trabalho.

A Sra. SÍLVIA M. PAES DE ALMEIDA, pelo apoio inestimável nas preparações em Microscopia Eletrônica.

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

Ao Prof. Dr. SÉRGIO ROBERTO PERES LINE, pelo exemplo de dedicação, confiança e amizade com que orientou esse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO **1**

PROPOSIÇÃO **2**

INTRODUÇÃO **3**

GLÂNDULA SALIVAR 3
ATROFIA GLANDULAR 6
MATRIZ EXTRACELULAR 10
MEMBRANA BASAL 11
COLÁGENO IV 12
LAMININA 13
METALOPROTEINASE DA MATRIZ EXTRACELULAR 16
COLAGENASE 18

MATERIAL E MÉTODOS **20**

RESULTADOS **27**

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS **46**

CONCLUSÕES **55**

SUMMARY **56**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **57**

RESUMO

RESUMO

Atrofia obstrutiva de glândulas salivares é uma alteração comum que pode ser causada pela presença de cálculos, infecções ou processos neoplásicos. No presente estudo utilizamos microscopia eletrônica de transmissão e métodos bioquímicos para estudar alterações que ocorrem na matriz extracelular durante atrofia experimental de glândulas submandibulares de ratos. Estudos imunohistoquímicos da laminina e do colágeno IV mostraram distribuição irregular dessas proteínas ao redor das estruturas ductais e acinares atróficas. Análise em "Western blot" mostrou que glândulas submandibulares de ratos expressam laminina contendo apenas cadeias B, enquanto a cadeia A é presente em pequena quantidade. Isso foi observado tanto em glândulas normais como atróficas. Investigação da expressão da colagenase fibroblástica (MMP-1) por técnica zimográfica mostrou altos níveis desta enzima após 5 dias de atrofia. Com a evolução da atrofia, a atividade gelatinolítica regrediu gradativamente até 30 dias de atrofia. Microscopia eletrônica mostrou extensivas alterações morfológicas nas células glandulares. Células mioepiteliais de glândulas atróficas mostraram áreas com espessamento da membrana basal. A atrofia experimental de glândulas salivares pode ser usada como modelo *in vivo* para estudar eventos moleculares que ocorrem durante remodelação da matriz extracelular.

Palavras chaves: glândulas salivares, matriz extracelular, metaloproteinas.

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

A proposta desse trabalho é analisar através de estudos bioquímicos, imunohistoquímicos e ultraestruturais alterações de alguns componentes da matriz extracelular durante o processo de remodelação que ocorre após os períodos de 5, 10 e 30 dias de atrofia experimental de glândulas submandibulares de ratos provocada pela obstrução de seu ducto excretor principal.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

GLÂNDULA SALIVAR

Glândulas salivares são estruturas secretoras responsáveis pela produção de saliva. Anatomicamente as glândulas salivares dividem-se em maiores e menores. Pode-se distinguir três pares simétricos de glândulas salivares maiores: as parótidas, as submandibulares e as sublinguais, todas possuindo extensos sistemas ductais necessários para condução da saliva das unidades secretoras até a cavidade bucal. As glândulas menores apresentam sistema de ductos curtos e estão localizadas na submucosa de diversas regiões da cavidade bucal.

Embriologicamente as glândulas salivares originam-se a partir do espessamento do epitélio bucal acompanhado por invaginação das células epiteliais para o interior do tecido mesenquimal subjacente ramificando-se em um padrão arborizado, formando estruturas semelhantes a "brotos" que vão crescendo e diferenciando-se em lóbulos, originando assim as unidades secretoras. Os ductos formam-se pela degeneração das células centrais dos cordões epiteliais, completando a complexa estrutura das glândulas salivares (TEN CATE, 1985; CUTLER, 1990). A interação epitélio-mesênquima, mediada por moléculas da matriz extracelular que se encontram na interface entre as células epiteliais e o tecido conjuntivo, é um fenômeno fundamental para o desenvolvimento e manutenção da arquitetura das glândulas salivares (CUTLER, 1990; KADOYA et al, 1995).

Histologicamente as unidades secretoras das glândulas salivares são denominadas ácinos: estruturas que apresentam diversidade

de tamanho, forma e número de células. Tanto em humanos como em ratos, os ácinos podem ser constituídos por dois tipos de células: mucosas e serosas, também conhecidas como seromucosas por secretarem polissacarídeos (TEN CATE, 1985). As células mucosas apresentam estrutura piramidal com núcleo achatado localizado na sua base. As células serosas são piramidais com núcleo esférico localizado no terço basal.

Quando o ácino apresenta os dois tipos de células juntas é denominado misto. No ácino misto as células mucosas formam uma estrutura acinar típica, com extremidade em fundo de saco, revestida por crescentes de células serosas, arranjadas como semiluas. A secreção das células serosas alcançam o lume através de canalículos intercelulares.

O sistema ductal, em humanos, pode ser dividido em três classes: (a) ductos intercalares que são de menor diâmetro e estão revestidos por células cúbicas baixas com núcleo central e escasso citoplasma, (b) ductos estriados, que são uma continuação dos intercalares, possuem revestimento formado por células colunares, de núcleo central e citoplasma acidófilo e, (c) ductos excretores, cujo revestimento é variado, apresentando epitélio pseudoestratificado com células colunares altas alternadas com células basais pequenas na extremidade próxima ao ducto estriado, e epitélio pavimentoso estratificado na extremidade próxima ao epitélio bucal. Em roedores existe também, nas glândulas submandibulares, o ducto granuloso, que precede o ducto estriado. Esse ducto é formado por células colunares, com o núcleo no terço basal e os dois terços apicais preenchidos por grânulos secretores eosinófilos ricos em polipeptídeos, como Fatores de Crescimento de Nervo (NGF), Fatores de Crescimento Epidermal (EGF) (MURPHY et al, 1980; TAKAI et al, 1985) e Fatores de Crescimento Transformadores β1 (TGF- β1) (AMANO et al, 1991). AMANO et al (1993) mostrou que as glândulas salivares de ratos também são ricas em Fatores de Crescimento de Fibroblastos básicos (bFGF). Esses fatores são localizados principalmente nas células dos ductos excretores e

estriados, sendo discreta ou mesmo ausente nas células dos ductos granulosos.

Outro tipo celular também identificado no parênquima das glândulas salivares são as células mioepiteliais que se localizam junto aos ácinos e ductos, interpostas no espaço entre a membrana basal e a membrana plasmática. Essas células possuem o formato estrelar com o núcleo localizado no corpo central de onde partem prolongamentos citoplasmáticos que "abraçam" as estruturas acinares e ductais. Ultraestruturalmente são muito semelhantes a músculo liso, sendo associadas a função contrátil e suporte das células acinares (NAGATO et al, 1980; TEN CATE, 1985; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 1995).

As glândulas parótidas são formadas exclusivamente por ácinos serosos com numerosos ductos intercalares. Nas glândulas submandibulares, aproximadamente 80% dos ácinos são serosos e o restante misto. Poucos ductos intercalares são observados, sendo os ductos estriados mais facilmente encontrados. Em roedores predominam os ductos granulosos. As glândulas sublinguais são variáveis, há um predomínio das estruturas acinares mistas e os ductos intercalares e estriados são difíceis de serem observados (TEN CATE, 1985).

ATROFIA GLANDULAR

A literatura sobre atrofia de glândulas salivares é bastante extensa. A atrofia ocorre quando há empedimento da passagem do fluido salivar devido a obstrução de seu ducto excretor (JUNQUEIRA, 1950; BHASKAR et al 1956; STANDISH AND SHAFER, 1957; TAMARIN, 1971; SHIBA et al, 1972; EMMELIN et al, 1974, MARTINEZ et al, 1982; TAKAI et al, 1985; TAKAI et al, 1986; IKENO et al, 1988; HASHIMOTO et al 1992;). Em humanos, a glândula submandibular é a mais comumentemente encontrada em estado atrófico devido a formação de cálculo salivar (sialolito) no interior do ducto excretor principal (SHAFER et al, 1987; TEN CATE, 1985; SHINOHARA et al, 1992). Existem várias possibilidades para se explicar a maior incidência de cálculos nos ductos das glândulas submandibulares, como pH alcalino, alto conteúdo de mucina na secreção destas glândulas e fluxo salivar contrário a gravidade (BARNES, 1985).

Experimentalmente se tem estudado atrofia de glândulas salivares através da ligadura de seu ducto excretor principal em diversos animais: camundongos (JUNQUEIRA, 1950), ratos (STANDISH AND SHAFER, 1957), gatos (EMMELIN et al, 1974), coelhos (BHASKAR et al, 1963). Deve-se sempre tomar o cuidado de não incluir o suprimento arterial na ligadura o que levaria a infarto da glândula por isquemia (STANDISH AND SHAFER, 1957).

SHIBA et al (1972), observou que as glândulas submandibular e sublingual de ratos apresentaram edema até 3 dias após a ligadura, provocando discreto aumento no peso quando comparado com controle. Após 5 dias de atrofia, o peso diminuía e a queda era proporcional ao período de ligadura. As mudanças associadas a atrofia glandular mostraram ser mais proeminentes na glândula submandibular que na sublingual (HASHIMOTO et al, 1992).

A obstrução do ducto excretor das glândulas salivares causa redução da secreção salivar (MARTINEZ et al, 1982) e atrofia progressiva das células acinares e ductais até atingir um estado inativo ou de repouso (JUNQUEIRA, 1950; TAMARIN, 1971). Entretanto, quando essas células são estimuladas com repetidas injeções de andrógeno (testosterona) passam a apresentar moderada quantidade de grânulos secretores, indicando um potencial regenerativo do parênquima glandular (JUNQUEIRA, 1950). ARAÚJO AND TOMICH (1971), descreveram aumento no peso das glândulas salivares atróficas de ratos após tratamento com isoproterenol. O potencial regenerativo das glândulas salivares foi confirmado por JUNQUEIRA AND RABINOVITCH (1953). Esses autores mostraram que as células acinares e ductais retornaram ao aspecto histológico normal, com a volta dos grânulos secretores e mitocôndrias, que haviam praticamente desaparecidos após a recanalização do ducto ligado. Resultados semelhantes foram obtidos por BHASKAR et al (1963), que provocaram mucoceles do tipo extravasamento após incisão dos ductos ligados das glândulas submandibulares e sublinguais de camundongos com até 9,5 meses de atrofia.

TAMARIN (1971), realizou um estudo minucioso em microscopia eletrônica de transmissão sobre a "restauração" da morfologia das células acinares e ductais após desobstrução do ducto excretor de glândulas submandibulares de ratos com 31 dias de atrofia. Esse autor observou recuperação total do parênquima glandular 180 dias após desobstrução do ducto ligado, sendo que as células acinares regeneraram mais rapidamente que as células ductais. Por não observar morte celular e figuras de mitoses serem extremamente raras, o autor concluiu que a recuperação da glândula ocorreu pela reativação das células acinares e ductais e não pela diferenciação de novas células.

A atrofia da glândula salivar é acompanhada por diminuição no número de mitocôndrias das células acinares e ductais (TAMARIN, 1971) e consequente diminuição na atividade de enzimas

oxidativas, limitando-se apenas a manutenção das funções vitais da célula (SHIBA et al, 1972).

Apesar da grande modificação ocorrida nas células acinares e ductais das glândulas salivares durante a atrofia, as células mioepiteliais aparentemente não sofreram alterações quando analisadas em microscopia eletrônica (TAMARIN, 1971). SHIBA et al (1972), não observou diminuição na ação de enzimas fosfatase alcalina presentes na membrana plasmática destas células. SHINOHARA et al (1992), estudando sialadenites obstrutivas crônicas mostraram modificações na ultraestrutura das células mioepiteliais com aumento na quantidade de vesículas lipídicas e grânulos de lipofuscina. EMMELIN et al (1974), notaram que apesar das células mioepiteliais persistirem após a ligadura da glândula, sua arquitetura encontrava-se bastante alterada quando observada em microscopia eletrônica, com células contendo numerosas estruturas semelhantes a lipofuscina e a membrana basal apresentando áreas da espessamento grosseiro adjacentes às regiões de "enrugamento" da membrana plasmática na superfície da célula.

HASHIMOTO et al (1992), observaram através de reações imunohistoquímicas, diminuição da expressão das proteínas S-100 e de EGF em glândulas atróficas de ratos. A redução dessas proteínas estava associada a degranulação das vesículas dos ductos granulosos que armazenam esses peptídeos. Estes mesmos autores, usando anticorpos para evidenciar actina em glândulas atróficas, notaram que as células mioepiteliais em glândulas sublinguais com até 21 dias de atrofia apresentaram intensidade de coloração semelhante a glândula normal, enquanto que em glândulas submandibulares, com mesmo período de atrofia, a intensidade de coloração estava bastante reduzida. Este padrão distinto das reações imunohistoquímicas em cada glândula sugere, segundo os autores, que mudanças associadas à atrofia glandular sejam mais proeminentes na glândula submandibular. SHINOHARA et al (1992), também utilizando o marcador actina para analisar células mioepiteliais em glândulas submandibulares de humanos com sialadenites crônicas

obstrutivas, notaram que a marcação ficou reduzida e irregular, sugerindo que além das modificações estruturais ocorridas nestas células, possa haver também uma diminuição na sua atividade.

TAKAI et al (1985), analisando os EGF e NGF em camundongos, notaram que 10 dias após a ligadura, nenhuma marcação era observada. Entretanto, ao se fazer injeções repetidas de testosterona no animal logo após a ligadura, preservou-se a morfologia das células granulosas e a marcação foi positiva até o 10º dia de atrofia, vindo a diminuir somente a partir do 14º dia.

A expressão de queratina também foi analisada durante atrofia glandular em ratos e camundongos. TAKAI et al (1986), notaram que em glândulas normais a expressão da queratina é limitada ao ducto estriado e ducto excretor sendo ausente nos túbulos granulosos. Nas glândulas atróficas o epitélio do ducto intercalar, ducto granuloso, estruturas semelhantes a ducto, ductos estriados e excretores passaram a apresentar positividade para queratina. Segundo os autores, essa alteração indica que as células ductais sofrem metaplasia escamosa, visto que os marcadores utilizados eram específicos para células de epitélio escamoso. HASHIMOTO et al (1992) obtiveram resultados semelhantes ao analisarem a expressão da citoqueratina do tipo II em glândulas submandibulares e sublinguais atróficas de ratos.

MATRIZ EXTRACELULAR

A matriz extracelular surgiu com a evolução das espécies que passaram de organismos unicelulares para pluricelulares, necessitando assim de uma matriz intercelular responsável pela adesividade e troca de informações entre as células.

A matriz extracelular compreende uma intrincada rede de componentes fibrosos embebidos em gel de polissacarídeos hidratados, glicosaminoglicanas e proteoglicanas. Além de servir como suporte para as células, a matriz extracelular também exerce influência no desenvolvimento, migração, proliferação, forma e funções metabólicas das células (ALBERTS et al, 1989).

A matriz extracelular desempenha um importante papel na morfogênese e diferenciação das glândulas salivares. Os colágenos do tipo I, III e IV, além da laminina e condroitin sulfato participam da morfogênese e citodiferenciação das células glandulares, enquanto que o colágeno IV sozinho parece desempenhar importante papel na diferenciação das células secretoras (CUTLER, 1990).

As proteínas da matriz extracelular sofrem constante turnover. Elas são sintetizadas e degradadas rapidamente por processos muito bem controlados. A degradação dos componentes da matriz extracelular é feita por quatro vias aparentemente distintas: (1) metaloproteinases; (2) ativadores de plasminogênio; (3) clivagem por enzimas lisossomais após fagocitose por células especializadas e (4) degradação de material mineralizado mediado por osteoclastos (BIRKEDAL-HANSEN, 1993).

MEMBRANA BASAL

A membrana basal foi descrita pela primeira vez por TODD AND BOWMAN em 1857, como uma fina e delicada estrutura que separa as células epiteliais do tecido conjuntivo. Ela compreende um tipo especial de matriz extracelular constituída de uma fina camada com aproximadamente 50 nm de espessura, que separa as células endoteliais e epiteliais do tecido conjuntivo subjacente, além de formar um envoltório individualizado ao redor de células adiposas, células musculares lisas, cardíacas, esqueléticas e células de Schwann. A membrana basal fica em íntimo contato com essas células e esse contato é mediado por receptores presentes na superfície celular que se ligam fortemente a proteínas da membrana basal (TIMPL, 1989). Em análise ultraestrutural, a membrana basal é formada por uma lâmina lúcida e uma lâmina densa. A lâmina lúcida é adjacente a membrana da célula e apresenta baixa densidade eletrônica, enquanto a lâmina densa é adjacente ao tecido conjuntivo apresentando alta densidade eletrônica (MARTINEZ-HERNANDEZ et al, 1983). Essa organização é observada na maioria dos tecidos, porém ela pode apresentar variações. Em glomérulos renais de adultos, a membrana basal é trilaminar, com lâmina densa espessa (80 nm) localizada entre duas lâminas lúcidas de 40 nm cada (THORNING et al, 1977).

A composição química da membrana basal apresenta certa complexidade, sendo composta principalmente por colágeno do tipo IV, heparan sulfato, condroitin sulfato, proteoglicanos e uma glicoproteína de alto peso molecular denominada laminina (PAULSSON, 1987; MARTIN AND TIMPL, 1987). As principais funções da membrana basal incluem: suporte físico a diversas estruturas, união e ultrafiltração. Além disso, a membrana basal assume arranjos distintos em diversas alterações patológicas, como diabetes e neuropatias onde a membrana encontra-se bastante espessada (MARTINEZ-HERNANDEZ et al, 1983). Laminina e

colágeno IV possuem vários sítios de ligação celular que interagem com distintos receptores celulares, podendo assim interferir no comportamento da célula (TIMPL, 1989).

A remoção da lâmina basal de células basais do epitélio provoca diversas alterações nessas células, como arredondamento na sua morfologia, perda de coesão celular, aparecimento de microvilosidades e mudança na organização estrutural do citoesqueleto, indicando que a lâmina basal participa da estabilidade morfológica do epitélio (BANERJEE et al, 1977). Segundo DICKSON AND WARBURTON (1992), há fortes evidências que a membrana basal de glândulas mamárias de ratas seja sintetizada por células mioepiteliais e que durante o processo de involução da glândula, essas mesmas células sejam as responsáveis pela sua degradação através da liberação de enzimas da matriz metaloproteinase.

COLÁGENO IV

O colágeno compreende uma família de proteínas encontradas na matriz extracelular. As moléculas dos colágenos são formadas por 3 cadeias α que se associam na forma de hélices unidas através de pontes de hidrogênio. Cada cadeia α é codificada por um gene grande com cerca de 50 exons. O colágeno é secretado na forma de procolágeno, que sofre a ação de enzimas proteolíticas e transforma-se em protocolágeno o qual se polimeriza formando as fibrilas colágenas (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 1995). A organização das fibrilas colágenas na matriz extracelular adapta-se às necessidades do tecido. Já foram descritos 13 tipos diferentes de colágenos. Os tipos I, II e III apresentam arranjo fibrilar e são os mais abundantes no tecido conjuntivo. O colágeno tipo IV é encontrado exclusivamente na lâmina basal, onde é um de seus

principais componentes (ALBERTS et al, 1989; VUORIO AND CROMBRUGGHE, 1990).

O colágeno tipo IV é formado por 2 cadeias α_1 e 1 cadeia α_2 formando um complexo altamente insolúvel, porém não apresenta estrutura fibrilar como os colágenos tipo I, II e III (ALBERTS et al, 1989). Ele é produzido pelas células epiteliais, adiposas, musculares, Schwann e endoteliais. Concentra-se exclusivamente nas membranas basais onde é o componente mais abundante. A construção de uma forte estrutura de suporte é certamente uma das principais funções do colágeno IV, além disso, essa molécula possui sítios de ligação para diversas proteínas como laminina, fibronectina, proteoglicanas, nidogênio e proteínas transmembrânicas das células, completando assim a complexa arquitetura molecular da membrana basal (TIMPL, 1989).

SKALOVA AND LEIVO (1992) mostraram através de estudos imunohistoquímicos, que em glândulas salivares normais, o colágeno IV encontra-se arranjado de forma linear ao redor dos ácinos e ductos e que esse padrão é mantido em tumores glandulares benignos. Porém em tumores invasivos, como carcinoma adenóide cístico, a distribuição do colágeno torna-se irregular, com ácinos e ductos apresentando áreas de ruptura ou ausência total de marcação.

LAMININA

Laminina é uma glicoproteína não colagênica de alto peso molecular (800.000 Da) que se localiza exclusivamente na membrana basal de células epiteliais, musculares, adiposas e endoteliais. É a primeira proteína da matriz extracelular a ser sintetizada durante a embriogênese (MIOSGE et al, 1993). Foi isolada pela primeira vez por TIMPL et al em 1979, a partir de extrato de tumor Engelbrecht

Holm Swarm (EHS) de camundongo, o qual produz abundante matriz de membrana basal. A molécula de laminina descrita por esses autores, é formada por 3 cadeias polipeptídicas, uma longa com peso molecular de 400 kD identificada como cadeia A e duas menores, pesando aproximadamente 200 kD cada, conhecidas como B_1 e B_2, sendo cada cadeia codificada por genes diferentes (MARTIN AND TIMPL, 1987). Essas cadeias são unidas por bandas de dissulfito, dando à molécula uma conformação de cruz. A laminina pode-se ligar a diversas outras moléculas como colágeno IV, heparan sulfato, heparina e nidogênio (TIMPL, 1989). A laminina pode também ligar-se à superfície das células através de receptores transmembrânicos específicos. Ligações desse tipo estão associados a manutenção da polaridade das células epiteliais (CAMPBELL AND TERRANOVA, 1988; KLEIN et al, 1990).

A identificação de múltiplos receptores para a molécula de laminina sugere que essa glicoproteína participe de diversas funções como migração, adesão, diferenciação e proliferação celular, além de desempenhar papel importante em situações patológicas como invasão e metástase de tumores, doenças auto-imunes, adesão bacteriana e outras. Essa diversificada atividade biológica da laminina é provavelmente decorrente de suas diversas isoformas, bem como das inúmeras subunidades existentes nas cadeias A, B_1 e B_2 (TRYGGVASON ,1993; KADOYA et al, 1995).

Análises da laminina oriundas de outros tecidos e de linhagens celulares derivadas de camundongos e ratos, mostraram que as cadeias A, B_1 e B_2 não são coordenadamente expressas. A maioria das amostras analisadas revelaram que a cadeia A é expressa em pequenas quantidades em tecidos diferenciados adultos (KLEINMAN et al, 1987; PAULSON AND SALADIN, 1989; EHRIG et al, 1990; KUCHERER-EHRET et al, 1990). Foram também descritos variantes da laminina constituídos por novas cadeias polipeptídicas. HUNTER et al (1989) descreveram cadeias polipeptídicas que apresentavam homologia com as cadeias B da laminina. Esse polipeptídeo possui peso molecular

de 190 kDa e foi denominada de laminina S (sináptica), por estar presente na junção neuromuscular. EDGAR et al (1988) descreveram uma molécula de laminina onde as cadeias B_1 e B_2 estavam associadas a duas cadeias polipeptídicas que eram antigenicamente distintas da cadeia A. PAULSSON AND SALADIN (1989) mostraram que a laminina isolada do coração de camundongos continha cadeia extranumerária de 300 kDa que se associava covalentemente às cadeias B. Apesar de vários outros polipeptídeos que se associam ou que exibem homologia com as cadeias da laminina terem sido reportados (DAVIES et al, 1985; EHRIG et al, 1990), o significado desta diversidade de associação de cadeias polipeptídicas é ainda desconhecido. Pode-se, no entanto, especular que a laminina não é uma única entidade, mas uma família de proteínas constituída por diversas cadeias polipeptídicas que são expressas diferencialmente. As diversas combinações dessas cadeias polipeptídicas dariam características químicas distintas às diversas membranas basais dos diferentes órgãos e tecidos. Essas características químicas por sua vez refletiriam não só na estrutura das membranas basais, mas também na interrelação da laminina com as células adjacentes, influenciando no comportamento das mesmas.

Em glândulas salivares normais de humanos a laminina é expressa na membrana basal que circunda os ácinos, ductos, células adiposas e nervos periféricos, porém em casos de tumores glandulares, padrões distintos de expressão podem ser observados. Um padrão de expressão linear, semelhante ao normal, é detectado em tumores benignos e carcinoma de células acinares, enquanto que em carcinoma adenóide cístico, a laminina encontra-se distribuída de forma irregular, com áreas de interrupção e em alguns casos, completamente ausente (SKALOVA AND LEIVO, 1992). Resultados semelhantes foram observados por D'ARDENE et al (1986) e WETZELS et al (1992) que analisaram expressão da laminina em carcinoma adenóide cístico e adenoma pleomórfico.

METALOPROTEINASES DA MATRIZ EXTRACELULAR

A integridade da matriz extracelular é mantida por processos constantes de formação e degradação de seus componentes. As metaloproteinases compreendem um grupo de enzimas proteolíticas que participam da remodelação da matriz extracelular através da degradação das macromoléculas do tecido conjuntivo, incluindo colágeno, laminina, fibronectina e core proteico das proteoglicanas. As metaloproteinases têm importante função na reabsorção e remodelamento fisiológico da matriz extracelular durante o desenvolvimento do indivíduo e processos de cicatrização (SALO et al, 1994), além de estar associada a processos patológicos, como metástase tumoral (SOINI AND AUTIO-HARMAINEN, 1993; STETLER-STEVENSON et al, 1993; AZUMA et al, 1993), doença periodontal (BIRKEDAL-HANSEN, 1993) e artrite reumatóide (SOUZA et al, 1993). As metaloproteinases são sintetizadas como zimógenos inativos e sua ativação no meio extracelular ocorre com a quebra da ligação zinco-cisteina que bloqueia a ação da enzima (BIRKEDAL-HANSEN, 1993).

A ação dessas enzimas é controlada por inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMP), que são glicoproteinas sintetizadas por diversas células do organismo e agem como inibidores fisiológicos das metaloproteinases (MURPHY et al, 1985; HOWARD et al, 1991; ALVARES et al, 1995). A diminuição ou alteração na expressão de TIMP tem sido associada a processos de metastização de tumores (AZUMA et al, 1993).

O quadro I mostra os principais membros da matriz metaloproteinase e suas principais características.

Quadro I: Membros da matriz metaloproteinases e suas principais características.

nome	Abrev.	P.M.(kDa)	substrato na MEC
Colagenase			
colagenase de fibroblasto	(MMP1)	57/52	colágeno I, II, III, VII, X
colagenase de neutrófilo	(MMP8)	75	colágeno I, II, III.
Colagenase IV			
gelatinase A	(MMP2)	72	gelatina, fibronectina, elastina, colágeno IV, V, VII e X
gelatinase B	(MMP9)	92	gelatina, elastina, colágeno IV e V
Estromelisina			
estromelisina 1	(MMP3)	60/55	proteoglicanas, gelatina, fibronectina, laminina, colágeno IV, V, IX
estromelisina 2	(MMP10)	60/55	proteoglicanas, gelatina, fibronectina, laminina, colágeno IV, V, IX
estromelisina 3	(MMP11)	?	?
Metaloelastase	(MMP12)	55	elastina e fibronectina
Matrilisina	(MMP7)	28	fibronectina, laminina, colágeno IV, gelatina, proteoglicanas.

AZUMA et al (1995) sugeriram que a atividade de enzimas metaloproteinases está envolvida na patogenia das mucoceles do tipo extravasamento, pois eles observaram através de zimograma de gelatina um nível bem maior de colagenase do tipo IV presente no muco dessas lesões quando comparado com a saliva normal coletada a partir do ducto de Wharton.

DICKSON AND WARBURTON (1992) mostraram que durante a involução de glândulas mamárias de ratas há um aumento na síntese da gelatinase A (MMP2) e estromelisina (MMP3). Segundo esses autores, o aumento dessas duas metaloproteinases estaria associado

principalmente a uma estimulação na síntese dessas enzimas pelas células mioepiteliais.

COLAGENASE

As colagenases são as únicas enzimas da família das metaloproteinases com capacidade para degradar colágeno. Elas clivam a tríplice hélice do colágeno em peptídeos simples que então são sensíveis a ação de outras proteinases. As colagenases são divididas em dois tipos geneticamente distintos, uma com peso molecular de 57/52 kDa chamada de colagenase fibroblástica ou intersticial (MMP-1) e outra altamente glicosilada, com peso molecular de 75 kDa, conhecida como colagenase neutrofílica ou polimorfonuclear (MMP-8). A colagenase fibroblástica foi a primeira enzima da família das melaproteinases a ser caracterizada (GROSS AND LAPIERE, 1962). Ela é produzida por genes expressos nos fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, macrófagos, osteoblastos e condrócitos (HERRON et al, 1986; CAMPBELL et al, 1987; BIRKEDAL-HANSEN, 1993). Os dois tipos de colagenases apresentam homologia bastante alta, entretanto a colagenase de PMN é bem mais glicozilada que a do tipo fibroblástica. As funções biológicas de ambas enzimas são as mesmas, porém há uma diferença marcante em relação a regulação da transcrição. A colagenase do tipo PMN encontra-se pronta e armazenada no interior dos grânulos dos leucócitos, sendo rapidamente liberada para o meio extracelular quando a célula é estimulada. A colagenase fibroblástica inicia sua transcrição somente após a célula ser estimulada demorando de 6 a 12 horas para ser detectada no meio extracelular (BIRKEDAL-HANSEN, 1993).

TERONEN et al (1995), observaram a presença das duas colagenases na parede de diversos tipos de cistos odontogênicos,

sugerindo que essas enzimas seriam importantes para o remodelamento da cápsula cística, podendo inclusive contribuir para o controle do crescimento cístico.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

ATROFIA GLANDULAR

Foram utilizados ratos (wistar), machos, adultos, pesando aproximadamente 120g, provenientes do Biotério Central da UNICAMP. Os animais foram alimentados com ração e água "ad libitum". Sob anestesia com injeção intraperitoneal de hidrato de cloral 10% (0,4 ml para 100g de peso do animal), foi realizado tricotomia na região ventral do pescoço, assepsia local e incisão sagital mediana de aproximadamente 4 cm de comprimento. As glândulas submandibulares foram identificadas e o ducto excretor principal do lado direito foi dissecado com tesoura de ponta rômbica e isolados dos vasos sanguíneos que irrigam a glândula. Um fio de algodão foi passado ao redor do ducto e amarrado firmemente, tomando-se o cuidado de não incluir os vasos que nutrem a glândula na ligadura, o que acarretaria em necrose por isquemia. A glândula do lado esquerdo permaneceu como controle e a ferida cirúrgica foi suturada com pontos simples isolados. Os animais foram sacrificados por inalação excessiva de éter etílico nos períodos de 5, 10 e 30 dias após a ligadura. As glândulas foram retiradas, limpas e pesadas. As glândulas destinadas a extração de proteínas foram rapidamente estocadas em nitrogênio líquido.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Foram utilizados 2 ratos de cada período para análise ultraestrutural. As glândulas foram cortadas em pequenos fragmentos e fixadas em glutaraldeido 2,5% durante 14 horas. Os fragmentos foram lavados em tampão fosfato de Sorensen (pH 7,3) e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%. Após lavagem com solução salina, os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol e imersos em óxido de propileno, sendo então incluídos em araldite. Cortes semi-finos foram corados com azul de toluidina e ultra-finos com acetato de uranila e citrato de chumbo. As lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico Zeiss EM 10 da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

IMUNOHISTOQUÍMICA

Foram utilizados 3 animais de cada período para análise imunohistoquímica. Os anticorpos anti-laminina e anti-colágeno IV foram produzidos em coelhos a partir de laminina e colágeno IV obtidos de tumor murino EHS de camundongos. As glândulas foram fixadas em formol 10% por 14 horas, processadas e incluídas em parafina. Cortes de 4 μm foram obtidos e estendidos em lâminas de vidro previamente untadas com organo-cilano. Os cortes foram hidratados e imersos em solução a 3% de peróxido de hidrogênio diluído em metanol por 15 minutos para inativação da peroxidase endógena. Os cortes foram lavados com H_2O e incubados a 37 °C, por 30 minutos, em pepsina 0,4% diluída em solução contendo 0,01N de HCl e glicerina. As lâminas foram lavadas em água, imersas em solução a 1% de albumina sérica bovina (BSA) diluída em salina tamponada com fosfato (PBS) e mantida em

câmara úmida por 30 minutos. Após esse período, o excesso foi removido e colocou-se anticorpo primário (anti-laminina ou anti-colágeno IV produzidos em coelhos) diluído 1:200 em solução de 0,3% de BSA em PBS com 0,1% de Tween 20 por 2 horas em câmara úmida a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas com PBS e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com anticorpo secundário, conjugado com peroxidase, diluído 1:250 em solução 0,3% de BSA em PBS com 0,1% de Tween 20. Os cortes foram lavados com PBS e revelados com solução 0,2% de diaminobenzoidina diluída em PBS contendo 0,2% de peróxido de hidrogênio 30%. As lâminas foram então montadas e analisadas em microscópio de luz.

COLETA DE PROTEÍNAS

Laminina

Foram utilizadas glândulas de 3 animais de cada grupo. Cada glândula foi cortada em pequenos fragmentos com lâmina de bisturi e vigorosamente macerados em homogeneizador manual de vidro junto com 15 ml de tampão contendo 50 mM de TRIS, 150 mM de NaCl, 2 mM de PMSF, 2 mM de NEM, pH 7,4 à 4 °C. O homogeneizado foi centrifugado à 15.000 rpm por 20 min. à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o processo repetido. Após a segunda lavagem o precipitado foi ressuspendido em 500 µl de tampão contendo 50 mM de TRIS (pH 7,4), 150 mM de NaCl, 10 mM de EDTA, 2 mM de PMSF, 2 mM NEM, e mantido sob agitação por 1 hora à temperatura de 4 °C para extração da laminina. O material foi então centrifugado à 14.000 rpm por 20 minutos à 4 °C e o sobrenadante estocado à -20 °C. O processo de extração da laminina foi repetido e o novo sobrenadante estocado junto com o anterior.

Colagenase

Foram utilizadas três glândulas de cada grupo. A porção interna da glândula foi cuidadosamente separada da cápsula. O material obtido da porção interna foi transferido para um homogeneizador manual de vidro e macerado com 15 ml de tampão contendo 0,25 % de TRITON X 100, 10 mM de $CaCl_2$, 2 mM de PMSF e 2 mM de NEM à 4 °C. O homogeneizado foi então centrifugado à 15.000 rpm por 20 minutos à 4 °C. O sobrenadante descartado e o processo de lavagem repetido. O precipitado foi ressuspendido em 500 µl de tampão contendo 50 mM de TRIS, 150 mM de $CaCl_2$, 2 mM de NEM, 2 mM de PMSF, pH 7,4 e mantido em banho-maria à temperatura de 40 °C por 30 minutos para extração da colagenase. A amostra foi centrifugada à 14.000 rpm por 20 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e estocado à -20 °C. O processo de extração da colagenase foi repetido e a nova amostra estocada junto com a anterior. A colagenase da cápsula também foi extraída seguindo-se a mesma metodologia.

CARACTERIZAÇÃO DAS GELATINASES POR ZIMOGRAMA

A atividade proteolítica da colagenase foi analisada em gel de SDS-poliacrilamida com concentração final de 9% de poliacrilamida impregnada com 1,6 mg de gelatina por ml de gel.

O volume de cada amostra para a corrida eletroforética foi baseado na quantificação proteica total lida em espectofotômetro segundo a técnica de Bradfort (BRADFORT, 1976).

O controle usado como peso molecular era composto por 10 µg BSA, 10 µg de Pepsina e 10 µg de colágeno acrescidos de 20 µl de tampão de amostra contendo β-mercaptoetanol e fervidas por 5 minutos para desnaturação das proteínas.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Todas as amostras de extrato de glândulas foram misturadas com tampão de amostra sem β-mercaptoetanol e a corrida eletroforética realizada com voltagem contínua de 15 mA em temperatura de 4 °C. Após o término da corrida, o gel foi colocado em recipiente com 100 ml de solução contendo 2% de TRITON X 100 e mantido sob agitação por 30 minutos em temperatura ambiente, para remoção da SDS. Essa lavagem foi realizada por duas vezes. O gel foi então incubado à 37 °C por 14 horas sob agitação em 150 ml de tampão contendo 10 mM de TRIS, 5 mM de $CaCl_2$, pH 8,0 para ativação da colagenase. O gel foi corado com Coomasiie Brilliant Blue R 0,25% e as gelatinases foram visualizadas pela capacidade de digerir o substrato formando bandas claras que contrastam com o restante do gel, onde o substrato está intacto e fortemente corado de azul. A identificação das gelatinases foi feita de acordo com o peso molecular.

INATIVAÇÃO DAS METALOPROTEINASES

Amostras de extrato da glândula com 5 dias de atrofia foram submetidas a eletroforese e lavadas nas mesmas condições mencionadas anteriormente. Em seguida foram incubadas por 14 hs à 37 °C em tampão Tris-HCl/$CaCl_2$ contendo um dos seguintes inibidores: 0,5 mM 1,10-fenantrolina, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM PMSF. Posteriormente, o gel foi corado com Coomasiie Brilliant Blue R 0,25% por 4 hs.

DENSITOMETRIA

A densitometria dos géis de zimograma foram realizados em densitômetro Bio Rad, modelo GS-700 e analisado em software ***Molecular Analysis*** da Bio Rad.

CARACTERIZAÇÃO DA LAMININA POR "WESTERN-BLOT"

O volume de cada amostra para corrida eletroforética, foi baseado na quantificação proteica total obtida segundo a técnica de Bradfort (BRADFORT, 1976).

Para controle positivo foi utilizado laminina extraída de tumor murino EHS de camundongo.

Todas as amostras foram misturadas com tampão de amostra contendo β-mercaptoetanol e fervidas por 5 minutos para desnaturação das proteínas. As amostras foram aplicadas em gel gradiente 3-10% de poliacrilamida contendo SDS. A corrida eletroforética foi realizada com voltagem contínua de 15 mA em temperatura ambiente. A transferência para o papel de nitrocelulose foi feita com voltagem contínua de 150 mA em temperatura de 4 °C durante 24 horas. A fita de nitrocelulose foi então corada com Ponceaus 0,25% para confirmação da transferência. As fitas foram imersas em solução a 1% de BSA em PBS e mantidas em câmara úmida por 30 minutos. Após esse período, o excesso foi removido e colocou-se anticorpo primário, anti-laminina produzido em coelho, diluído 1:500 em solução a 0,3% de BSA em PBS com 0,1% de Tween 20, por 2 horas em câmara úmida a temperatura ambiente. As fitas foram lavadas com PBS e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente em câmara úmida com anticorpo secundário conjugado com peroxidase e diluído 1:1000 em solução 0,3% de BSA em

PBS com 0,1% de Tween 20. A fita foi lavada em PBS e revelada com solução 0,2% de diaminobenzoidina em PBS contendo 0,2% de peróxido de hidrogênio 30%. Para controle negativo foi utilizado anticorpo IgG anti-rabbit diluído 1:500 em solução a 0.3% de BSA em PBS com 0,1% de Tween 20.

RESULTADOS

RESULTADOS

PESO DAS GLÂNDULAS

A análise do peso das glândulas serviu como controle do sucesso da atrofia das glândulas, sendo que as glândulas consideradas atróficas que não apresentavam diferença de peso em relação à glândula normal foram descartadas. Durante a evolução da atrofia houve queda progressiva do peso glandular, sendo que a maior alteração de peso foi observada entre a glândula normal e após 5 dias de atrofia, conforme mostra o gráfico I.

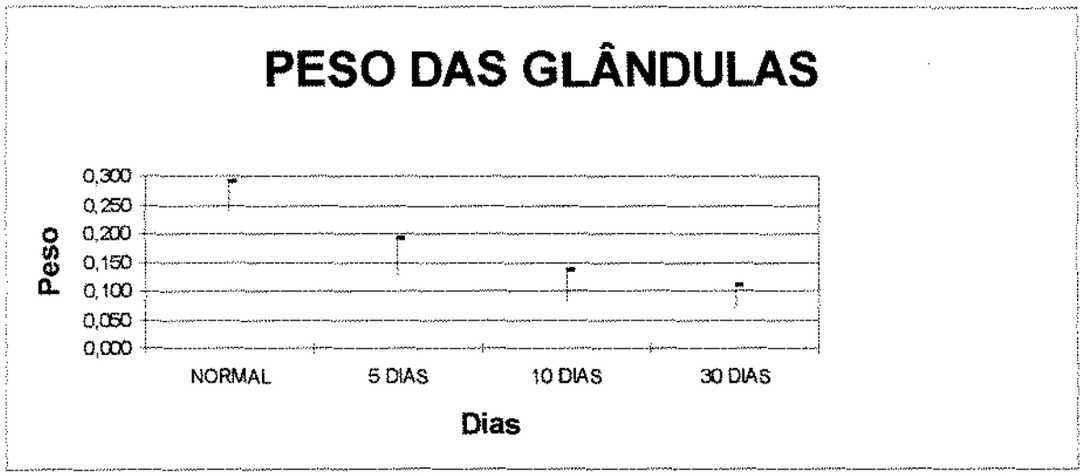


Grafico I: variação do peso das glândulas submandibular e sublingual de rato após 5, 10 e 30 dias de atrofia.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Glândula normal

As células acinares apresentaram formato triangular com núcleo arredondado localizado na porção basal da célula. O citoplasma era rico em retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias concentrados principalmente ao redor do núcleo. A porção média e apical da célula aparecia preenchida por vesículas de secreção eletron-lúcida contendo fina granulação eletron-densa (fig. 1A). Dentre as estruturas ductais, as células dos ductos granulosos foram as mais proeminentes, apresentando formato retangular com núcleo arredondado localizado na porção basal, circundado por mitocôndrias e abundante retículo endoplasmático rugoso. Os 2/3 apicais do citoplasma eram preenchidos por grânulos de secreção eletron-densos de tamanhos variados (fig. 1B).

Na superfície das células acinares e ductais repousava células mioepiteliais com o citoplasma preenchidos por microfilamentos arranjados paralelamente, semelhante a músculo liso. A superfície destas células eram fortemente unidas a membrana plasmática das células acinares e ductais por junções do tipo desmosoma. Na superfície das células mioepiteliais notava-se a presença de uma membrana basal distendida e linear, composta por lâminas lúcida e densa com espessuras semelhantes (Fig. 1C).

Glândula atrófica

As alterações observadas foram gradativas à evolução do processo de atrofia da glândula, sendo que as modificações mais intensas apareceram após 30 dias de atrofia. Com 5 dias de atrofia, grande parte das células acinares ainda mantinham grânulos de secreção, porém com redução na relação núcleo/citoplasma (Fig. 2A),

enquanto que as células dos ductos granulosos perderam todos seus grânulos (Fig. 2B). Após 10 dias de atrofia, as alterações morfológicas das células acinares e ductais ficaram mais proeminentes, com total desaparecimento dos grânulos de secreção e redução do retículo endoplasmático rugoso (Fig. 3A e B). Com 30 dias, as células ductais e acinares apresentaram grande diminuição na relação núcleo/citoplasma, assumindo formato cúbico, com o núcleo ocupando a porção central da célula. Os grânulos de secreção eram ausentes e o retículo endoplasmático rugoso bastante reduzido (Fig. 4A e B). As alterações morfológicas das células mioepiteliais, foram menos intensas que nos outros tipos celulares. Observou-se grânulos de lipofuscina dispersos pelo citoplasma e alterações na morfologia da célula, com "enrugamento" acentuado em algumas áreas da superfície celular. Uma alteração marcante foi observada na membrana basal das células mioepiteliais, onde notou-se espessamento bastante acentuado em algumas áreas, originando formas de aparências bizarras, semelhante a dobras (Fig. 5A, B, C, D).

IMUNOHISTOQUÍMICA

A imunomarcação para laminina e colágeno IV em glândulas submandibulares normais e atróficas de ratos mostrou que as duas proteínas são localizadas na membrana basal ao redor das estruturas ductais e acinares. Em glândulas normais, tanto a laminina e colágeno IV são distribuidos de forma regular, formando uma camada fina, retilínea e ininterrupta. Com a atrofia da glândula, a distribuição de ambas proteinas tornou-se irregular e desorganizada. Essas modificações tornaram-se mais evidentes após 10 dias de atrofia, porém com 30 dias de atrofia, observou-se marcação mais forte da laminina e

do colágeno IV ao redor de algumas estruturas ductais e acinares da glândula (Figs. 6 e 7).

QUANTIFICAÇÃO PROTEÍCA

A quantificação proteíca total das amostras foi necessária para se obter volumes de amostras com a mesma quantidade de proteína total para corrida eletroforética da colagenase e laminina. A concentração total de proteínas variou bastante durante a atrofia conforme mostra o quadro II.

Quatro II. Média da densidade ótica obtida das amostras de glândulas submandibulares de ratos normais e atróficas.

GLÂNDULA	D.O.
5 dias normal	0,291
5 dias atrófica	0,181
10 dias normal	0,258
10 dias atrófica	0,109
30 dias normal	0,216
30 dias atrófica	0,092

ANÁLISE ZIMOGRÁFICA

Os zimogramas realizados com extratos da porção interna de glândulas salivares normais e atróficas revelaram, em todas as amostras, a presença de colagenase formando dupla banda com peso molecular de aproximadamente 55 kDa. Outras bandas estavam presentes apenas nos extratos de glândula normal, com peso molecular inferior a 40 kDa (Fig. 8). Análise densitométrica do gel revelou que o

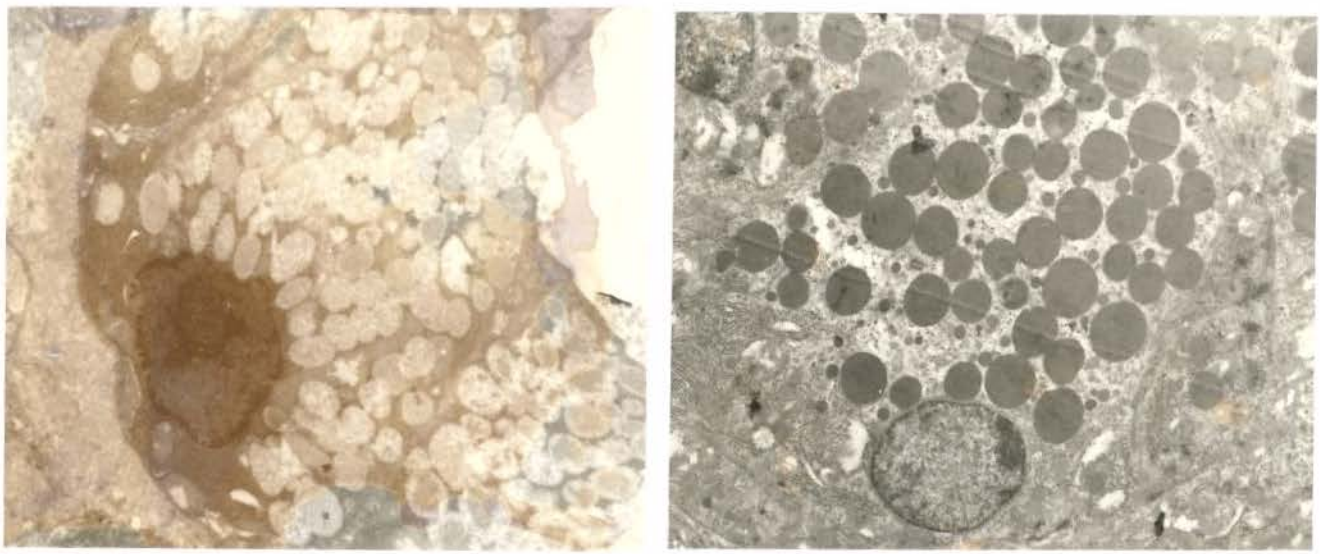
nível da atividade gelatinolítica das bandas com 55 kDa, eram bem maiores nos períodos de 5 e 10 dias de atrófia quando comparado com a glândula normal. Após 30 dias, a atividade gelatinolítica caía para níveis próximos ao normal (gráfico II). Quando os extratos das glândulas eram incubado com solução tampão ativadora contendo 0,5 M de 1,10-fenantrolina ou 0,5 M de EDTA, as bandas com pesos moleculares de 55 kDa eram totalmente inibidas, porém nenhuma inibição nestas bandas era observada quando a incubação continha 0,5 M de PMSF (Fig. 9). A espessa banda de baixo peso molecular observada nas amostras de glândulas normais foi totalmente inibidas com PMSF, mas não com EDTA ou 1,10-fenantrolina.

Os zimogramas realizados com o extrato obtido da cápsula da glândula revelaram presença de banda com o mesmo peso molecular (Fig. 10). A análise densitométrica mostrou que o nível de atividade gelatinolítica do extrato da glândula com 5 dias de atrofia era bem mais elevado que o normal e os outros períodos atróficos (gráfico III). Quando o gel foi incubado em 0,5 M de 1,10-fenantrolina ou 0,5 M de EDTA, a inibição da atividade gelatinolítica foi total, enquanto que a incubação com 0,5 M de PMSF não provocava nenhum tipo de inibição.

ANÁLISE DE "WESTERN BLOT" DA LAMININA

A análise da expressão das cadeias de laminina pela técnica de "Western blot", revelou que em glândulas submandibulares de ratos, a cadeia A é expressa em pequenas quantidades quando comparada com a expressão das cadeias B_1 e B_2 . Essa característica de expressão da laminina foi observada tanto em glândulas normais como atróficas. Durante a atrofia glandular notou-se uma redução na expressão das cadeias B da laminina em relação a glândula normal. Essa redução era mais visível no período de 5 dias de atrofia, apresentando aumento

na expressão nos períodos de 10 e 30 dias. Uma banda acima da cadeia A, com peso molécular aproximado de 600 kDa, também foi detectada nas amostras analizadas (Fig. 11).



a

b

c

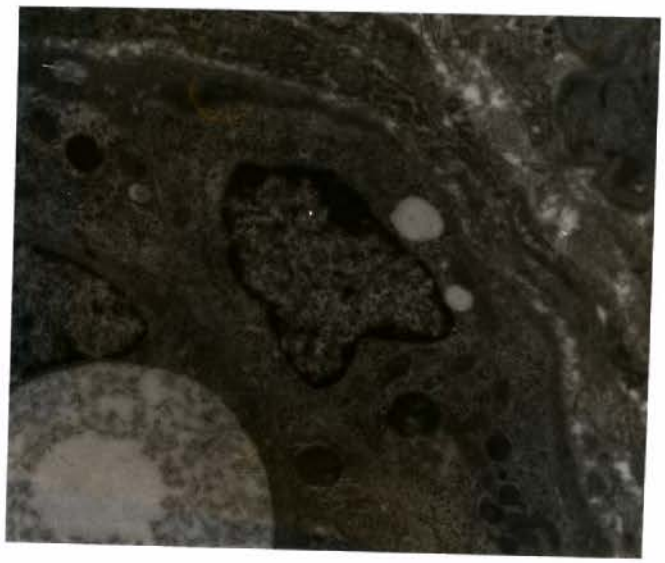
Fig.1 - Microscopia Eletrônica (M.E.) de glândula submandibular de rato. A- célula acinar (x5.800); B- célula do ducto granuloso (x5.800); C- membrana basal normal (→) (x24.500) .

a

b

Fig. 2 - M.E. de glândula submandibular de rato com 5 dias de atrofia. A- célula acinar (x5.800); B- célula do ducto granuloso (x5.800).

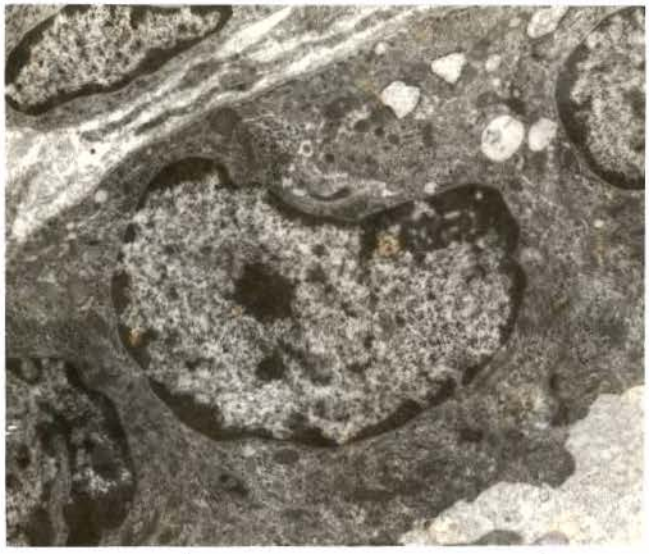
a



b

Fig. 3 - M.E. de glândula submandibular de rato com 10 dias de atrofia.
A- célula acinar (x5.800); B- célula do ducto granuloso (x5.800).

a



b

Fig. 4 - M. E. de glândula submandibular de rato com 30 dias de atrofia. A- célula acinar (x5.800); B- célula do ducto granuloso (x5.800).

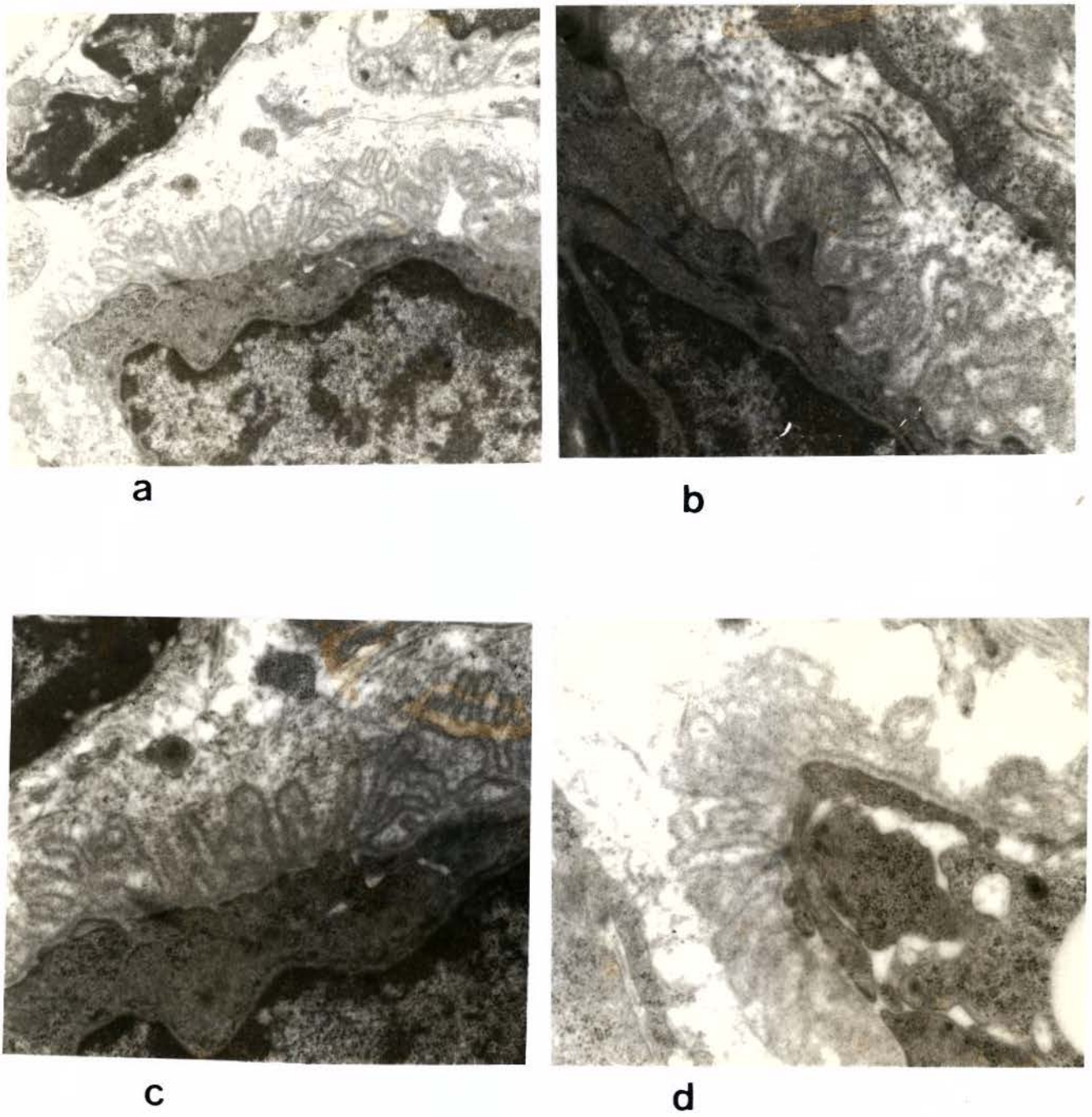


Fig. 5 - M.E. de glândula submandibular atrófica de rato. Note o espessamento e as dobras da membrana basal das células mioepiteliais após 30 dias de atrofia. A - x16.400; B, C, D - x24.500.

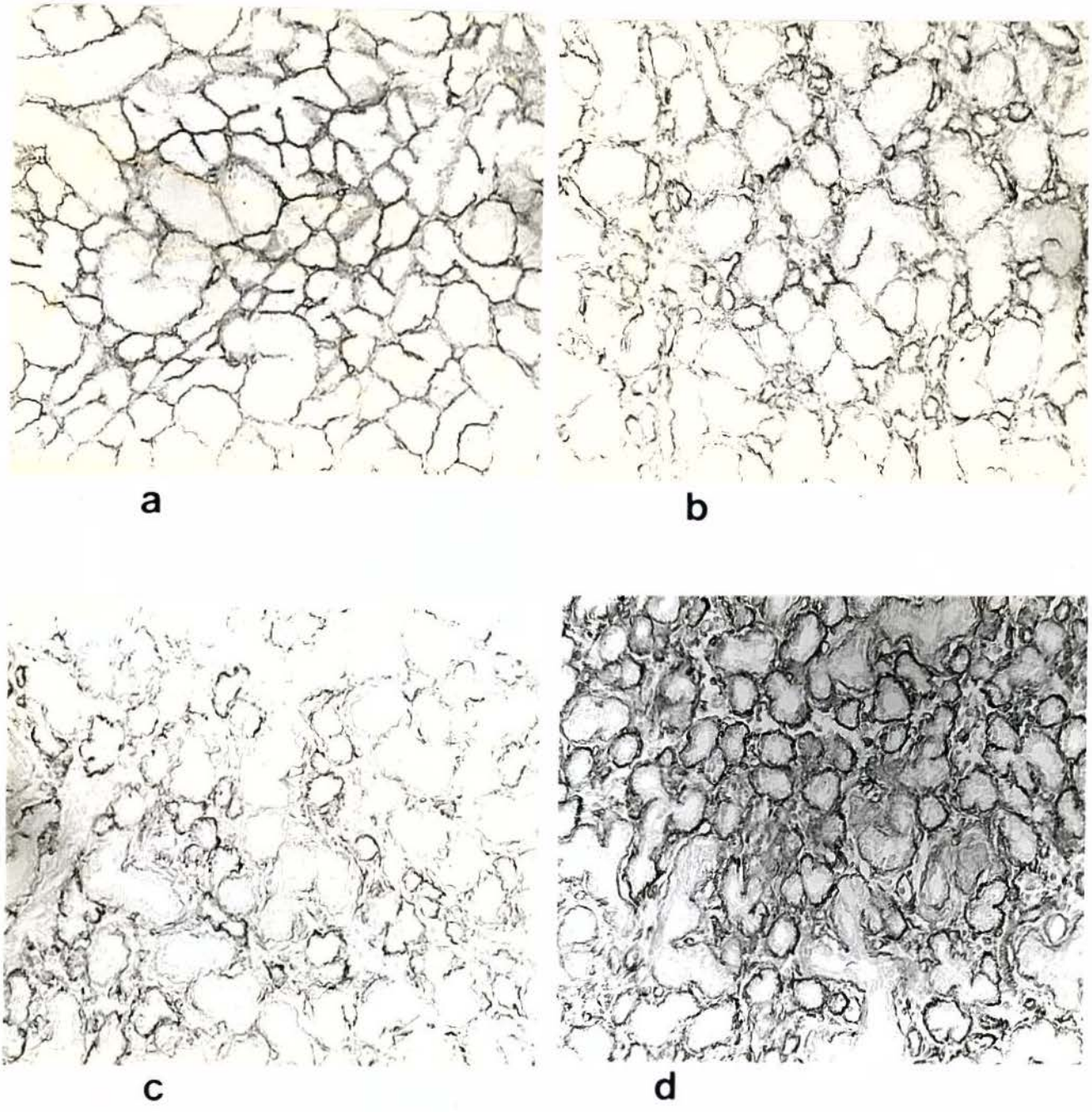


Fig. 6 - Imunohistoquímica de laminina. A - glândula normal; B - 5 dias de atrofia; C - 10 dias de atrofia; D - 30 dias de atrofia. Note uma distribuição irregular e redução da proteína após 5, 10 e 30 dias de atrofia (x130).

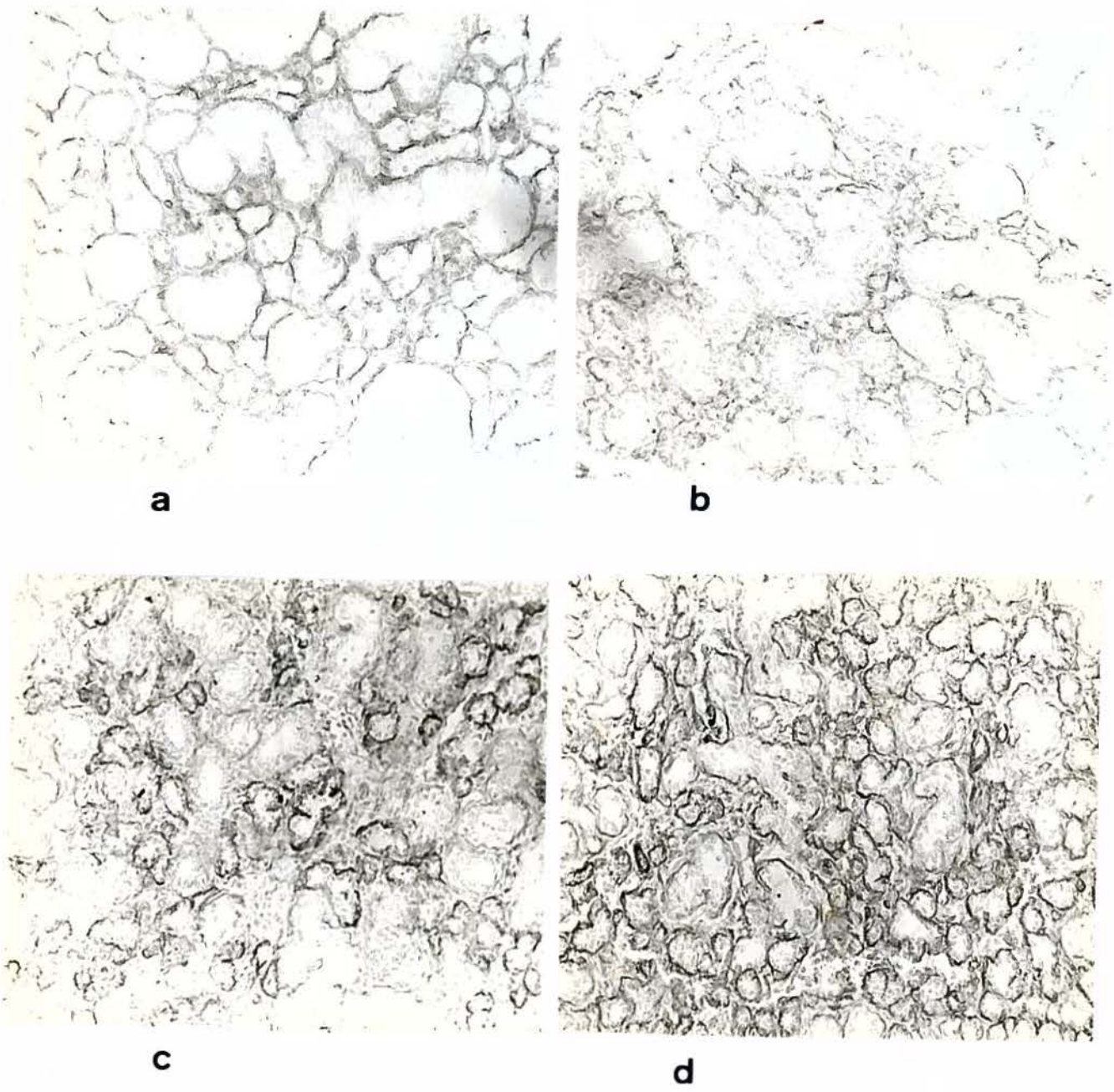


Fig. 7 - Imunohistoquímica do colágeno IV. A - glândula normal; B - 5 dias de atrofia; C - 10 dias; D - 30 dias. Note que nos períodos de 5, 10 e 30 dias de atrofia há diminuição na intensidade de marcação da proteína (x130).

1- gl. normal
2- gl. normal
3- gl. normal
4- 5 dias de atrofia
5- 10 dias de atrofia
6- 30 dias de atrofia

Fig. 8 - Zimograma de gelatina realizado com extrato retirado do interior da glândula. A maior atividade da enzima é observada nos períodos de 5 e 10 dias de atrofia.

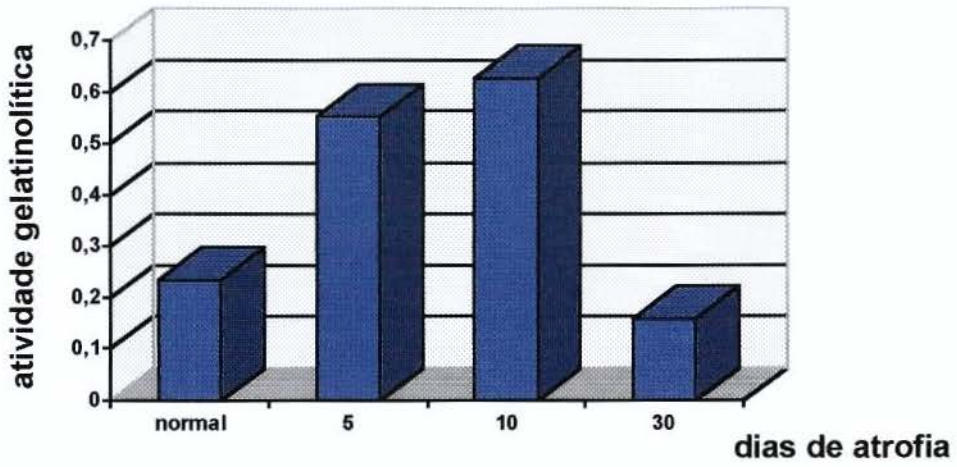


Gráfico I - Atividade gelatinolítica da colágenase do extrato da porção interna da glândula.

1- gl. normal
2- gl. normal
3- gl. normal
4- 5 dias de atrofia
5- 10 dia+s de atrofia
6- 30 dias de atrofia

Fig. 9 - Zimograma de gelatina realizado com extrato retirado da cápsula da glândula. Note que com 5 dias de atrofia a atividade da enzima e bem maior que nos outros períodos.

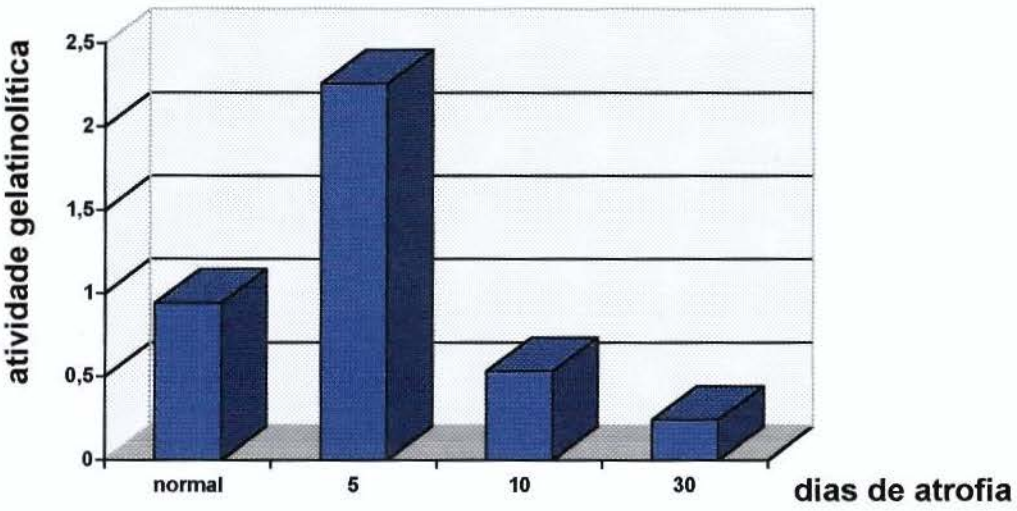
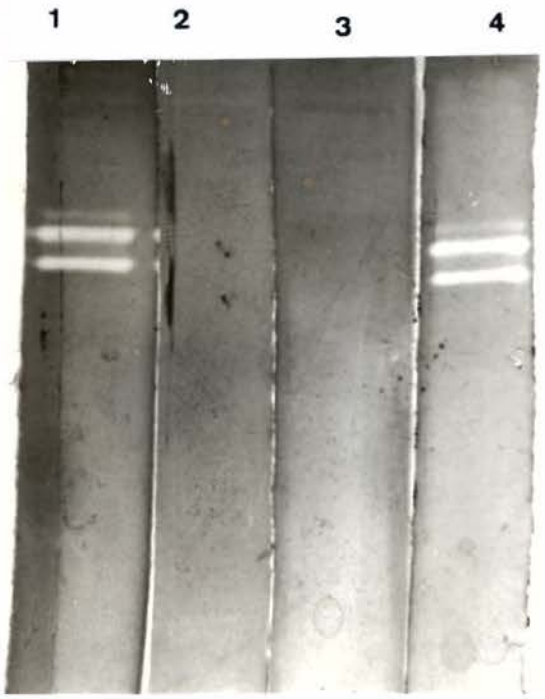
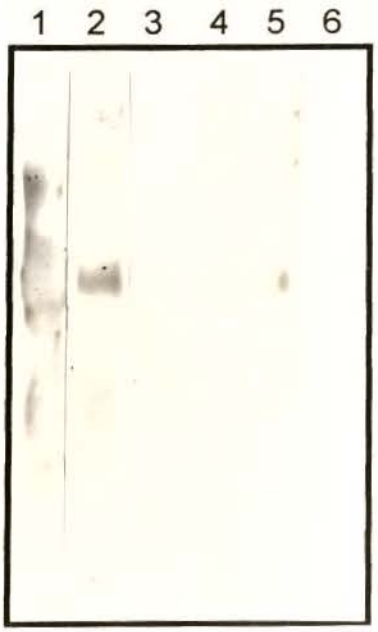


Gráfico II - Análise densitométrica da atividade gelatinolítica da colagenase extraída da cápsula da glândula.



1- incubação normal
2- incubação com fenantrolina
3- incubação com EDTA
4- incubação com PMSF

Fig. 10 - Zimograma de gelatina realizado com extrato obtido da cápsula da glândula após 5 dias de atrofia e incubados com diversos inibidores. A inibição da atividade da enzima após incubação com fenantrolina e EDTA e nenhuma inibição com PMSF, coloca a enzima dentro do grupo das metaloproteinases.



1- laminina de EHS
2- gl. normal
3- 5 dias de atrofia
4- 10 dias de atrofia
5- 30 dias de atrofia
6- controle negativo

Fig. 11 - "Western blot" realizado com extrato da glândula submandibular de rato. Notar presença de 3 bandas principais no extrato com pesos moleculares aproximadas de 200 kDa, 400 kDa e 600 kDa.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Atrofia experimental de glândulas salivares têm sido bastante usada como modelo experimental em inúmeros estudos. A obstrução do ducto excretor principal produz uma atrofia progressiva levando as células do parênquima glandular a atingir um estado primitivo ou de repouso com aumento da fibrose na região intersticial. As alterações observadas durante atrofia glandular experimental podem ser comparadas com as descritas durante a involução fisiológica de glândulas mamárias após o período lactífero ou em situações patológicas como a sialadenite obstrutiva crônica.

O controle do peso das glândulas foi importante para confirmação da atrofia glandular. As glândulas que não apresentaram alterações de peso após ligadura do ducto excretor foram descartadas do trabalho. A maior variação no peso glandular foi observada entre o controle e o período de 5 dias de atrofia. A grande degranulação das células acinares e, principalmente, das células dos ductos granulosos, observado em glândulas com 5 dias de atrofia através da microscopia eletrônica, poderia justificar a acentuada queda de peso ocorrida durante esse período. Variações de peso em glândulas salivares atróficas também foram descritas por SHIBA et al. em 1972. Segundo esses autores, glândulas atróficas apresentam discreto aumento de peso até o terceiro dia de atrofia. Após esse período, o peso diminui gradativamente com a evolução da atrofia. EMMELIN et al (1974), usando fio de seda para ligadura do ducto de glândulas submandibulares de gatos relatou que mesmo após a ligadura, pequena quantidade de secreção ainda pode ser detectada, sugerindo que a atrofia não é totalmente alcançada.

A análise ultraestrutural revelou que as células acinares e ductais sofrem alterações morfológicas profundas durante a evolução da atrofia, assumindo um aspecto morfológico de célula primitiva com formato cúbico, desaparecimento dos grânulos de secreção e redução acentuada do retículo endoplasmático rugoso e das mitocôndrias. Diversos corpúsculos de lipofuscina aparecem no citoplasma dessas células. Esses corpúsculos são compostos principalmente por estruturas lipoproteicas provenientes da decomposição da cápsula de organelas como mitocôndrias. As alterações morfológicas ocorreram de forma gradativa com a evolução da atrofia, sendo que após 30 dias as alterações foram mais proeminentes. TAMARIN (1971), mostrou em seu minucioso trabalho de microscopia eletrônica feito em glândulas atróficas de ratos com até 30 dias de atrofia, que as alterações morfológicas do parênquima glandular são reversíveis, sendo que as células reassumem sua morfologia normal após a recanalização do ducto.

As células mioepiteliais apresentaram alterações morfológicas mais discretas durante a atrofia glandular quando comparada com as células acinares e ductais. Presença de corpúsculos de lipofuscina observadas no citoplasma indica que essas células também sofreram alterações degenerativas durante o processo de atrofia. Essa mesma característica foi descrita em glândulas submandibulares de humanos com lesões obstrutivas por SHINOHARA et al (1992). A alteração mais significativa ocorreu na arquitetura da superfície dessas células. A membrana plasmática apresentou enrugamento formando projeções irregulares e bizarras. Adjacente a essas alterações a membrana basal encontrava-se espessada, com acúmulo de material eletron-lúcido rico em grânulos eletron-densos, enquanto em regiões onde a superfície da célula estava retilínea, a membrana basal apresentava-se normal. RADNOR (1972) mostrou características semelhantes na membrana basal de glândulas mamárias de ratas durante o período de involução. Essas alterações da membrana

basal poderiam ser explicadas como aumento na síntese de seus componentes pelas células mioepiteliais, estimulada pela maior liberação de fatores de crescimento durante a atrofia glandular, porém isso não explicaria porque nas áreas onde a superfície da célula é retilínea não se observa esse espessamento. Uma explicação plausível é que o espessamento da membrana basal ocorre por diminuição da superfície celular causando acúmulo dos componentes da membrana nas áreas adjacentes ao enrugamento, sugerindo que o turnover da membrana basal seja lento, não acompanhando as alterações da membrana plasmática. Hipótese semelhante é compartilhada por EMMELIN et al (1974), que observaram espessamento grosseiro da membrana basal em células mioepiteliais de glândulas submandibulares atróficas de gatos.

Deve-se considerar também que o acúmulo da membrana basal possa ser em decorrência do desequilíbrio entre a síntese e a degradação dos seus componentes, a exemplo do que ocorre em processos patológicos como diabetes mellitus (MARTINEZ-HERNANDEZ AND AMENTA, 1983) e adenoma pleomórfico (LINE, 1989; SKALOVA AND LEIVO, 1992).

Laminina e colágeno IV são proteínas exclusivas da membrana basal. A expressão dessas proteínas em glândulas salivares concentra-se principalmente ao redor das estruturas acinares, ductais e mioepiteliais. As alterações na morfologia da membrana basal das células mioepitelias de glândulas salivares atróficas, mostradas na análise ultraestrutural, estimulou o interesse em estudar imunohistoquimicamente a expressão da laminina e do colágeno IV nessas glândulas. As células mioepiteliais são consideradas as principais formadoras de membrana basal em glândulas mamárias e salivares (DICKSON AND WARBURTON, 1992; SKALOVA AND LEIVO, 1992). As análises imunohistoquímicas mostraram uma distribuição linear dessas proteínas ao redor das estruturas ductais e acinares em glândulas submandibulares normais. Nessas glândulas, as membranas basais das estruturas acinares e ductais encontram-se muito próximas, ocorrendo

provavelmente uma dupla visualização das proteínas. Com a atrofia, os ácinos e ductos distanciam-se levando a uma consequente diminuição na intensidade de marcação da reação observada em algumas regiões. A microscopia eletrônica mostrou que durante a evolução da atrofia, ocorre um acúmulo de membrana basal em algumas regiões das células mioepiteliais, com maior concentração de proteínas, principalmente após 30 dias de atrofia. A forte marcação da laminina e colágeno IV em algumas regiões durante esse período, corresponderia às áreas de acúmulo da membrana basal.

Distribuição semelhante ao das glândulas normais foi descrito por SKALOVA AND LEIVO (1992) em tumores benignos de parótidas de humanos, enquanto que, em tumores malignos a expressão dessas proteínas tornava-se irregular. Segundo esses autores, o grau de diferenciação das células é fator importante para a síntese dos componentes da membrana basal, quanto maior a anaplasia das células neoplásicas, maiores irregularidades são observadas na expressão da laminina e do colágeno IV (D'ARDENNE et al, 1986; WETZELS et al, 1992; SKALOVA AND LEIVO, 1992). O padrão irregular de expressão das proteínas da membrana basal, descrita em tumores malignos de glândulas salivares, é semelhante ao observado em glândulas atróficas. As irregularidades na expressão dessas proteínas, observados com a evolução da atrofia, poderia também estar associado às transformações regressivas que as células do parênquima glandular sofrem, assumindo características de célula primitiva. Durante a atrofia glandular, tanto as células acinares e ductais, como as células mioepiteliais sofreram um processo progressivo de regressão. As células mioepiteliais apresentaram modificações menos intensas que as outras células do parênquima glandular, porém as modificações ocorreram conforme demonstrado pela presença de corpos de lipofuscina no citoplasma observados em microscopia eletrônica, além de redução na expressão das proteínas S-100 e actina descrito por HASHIMOTO et al, em 1992. Esse processo regressivo das células glandulares deve acarretar

diminuição no metabolismo celular causando desequilíbrio no turnover dos componentes da membrana basal.

O interesse pelo estudo do comportamento da membrana basal em tumores malígnos têm crescido muito nos últimos anos devido a possibilidade de associar suas alterações com o prognóstico e grau de metastização dos tumores. SKALOVA AND LEIVO (1992) sugeriram que a redução ou perda da expressão do colágeno IV e da laminina em tumores malignos de glândulas salivares de humanos possa ocorrer em consequência da diminuição da síntese ou aumento da degradação dessas proteínas. MONTEAGUDO et al (1990), demonstraram através de técnicas imunohistoquímicas a presença de colagenase do tipo IV em glândulas mamárias normais de humanos e em células neoplásicas de mama. Esses autores sugeriram que essa enzima participe tanto no "turnover" normal da membrana basal de glândulas mamárias como em casos patológicos. Mais recentemente, DICKSON AND WARBURTON (1992) mostraram através da técnica de imunofluorescência aumento gradativo na expressão de colagenase do tipo IV até o 10° dia de involução de glândulas mamárias de ratas. A técnica de zimograma de gelatina não permitiu visualizar a presença de colagenases do tipo IV em glândulas salivares normais ou atróficas, sugerindo que essas metaloproteinases não sofram grande aumento de atividade durante a atrofia das glândulas salivares de ratos. Porém, técnicas mais sensíveis devem ser utilizadas para comprovar estes dados.

A laminina é uma glicoproteína de alto peso molecular encontrada exclusivamente na membrana basal. Inicialmente foi descrita como sendo composta por 3 cadeias, uma cadeia A de 400 kDa e duas B com 200 kDa cada. Significativos progressos têm sido obtidos nos últimos anos sobre o entendimento da estrutura e expressão da laminina. TRYGGVASON (1993) publicou ampla revisão descrevendo diversas isoformas da laminina, mostrando que o formato inicial dessa molécula descrita por TIMPL et al, em 1979, a partir de tumor de EHS, é na

realidade apenas um membro da extensa família das lamininas. Os experimentos de "Western blot" mostraram que em glândulas submandibulares de ratos a cadeia A da laminina é expressa em pequenas quantidades, sendo provavelmente substituída por uma proteína homóloga. Isso foi observado tanto em glândulas normais como atróficas. LINE et al (1995) mostraram expressão semelhante de laminina em língua de rato. Segundo esses autores, a pequena quantidade da cadeia A seria proveniente dos sítios sinápticos e músculo liso ao redor de artérias, enquanto que a maior parte das cadeias B_1 e B_2 seria de músculo estriado que é o componente mais abundante na língua. EHRIG et al (1990), mostraram que a membrana basal de músculo estriado em diversos sítios analisados não contém a cadeia A, sendo formado por cadeias B_1, B_2 e merosina, que é uma proteína homóloga à cadeia A. Nossos resultados não permitem afirmar que em glândulas submandibulares de ratos, as cadeias B_1 e B_2 estejam unidas a merosina, pois o anticorpo usado no "Western blot" não era específico para essa proteína. Característica semelhante de expressão da molécula de laminina foi descrita também durante a embriogênese de diversos órgãos de camundongos por KLEIN et al (1990). Esses autores encontraram isoformas da laminina contendo cadeia A concentradas principalmente na membrana basal de células epiteliais, sugerindo que essa cadeia seja importante para a polarização do epitélio. MARINCOVICH et al (1992), identificaram uma variante da laminina, com cadeia de 190 kDa em substituição à cadeia A, distribuída exclusiva na junção derme-epiderme da pele. Isoformas de laminina com ausência da cadeia A são comuns em órgãos de camundongos e ratos, porém, suas propriedades e funções biológicas são ainda desconhecidas. Células endoteliais, mesenquimais e de músculo liso de camundongos expressam isoformas da laminina sem cadeia A (KLEIN et al, 1990). A possibilidade de que a diminuição da expressão da cadeia A observada nos nossos resultados seja em consequência da degradação seletiva da cadeia A durante a corrida

eletroforética ou falha na transferência para o papel de nitrocelulose parece pouco provável, visto que a laminina de tumor de EHS, usado como controle, apresentava cadeia A. O significado das diversas combinações das cadeias de laminina é ainda desconhecido. Provavelmente essa diversidade de associações acarrete em características químicas distintas da proteína, refletindo na interrelação da laminina com as células adjacentes, influenciando no comportamento das mesmas. De acordo com Paulsson and Saladin (1989), a banda visualizada acima da cadeia A, com peso molecular de aproximadamente 600 kDa, deve ser produto de ligação covalente entre as diversas cadeias de laminina.

As análises de Western blot mostraram redução relativa na expressão da laminina em glândulas atróficas quando comparadas com glândulas normais. Essa redução foi bem evidente no grupo com 5 dias de atrofia. Resultados imunohistoquímicos já haviam mostrado que durante atrofia glandular ocorre redução aparente na expressão da laminina. O aumento relativo dessa proteína durante os períodos de 10 e 30 dias de atrofia, visualizado pelo "Western blot", vêem de encontro aos resultados imunohistoquímicos. O aumento progressivo da expressão da laminina ocorrido nos períodos de 10 e 30 dias de atrofia se deve em parte a diminuição relativa na concentração proteica total do extrato de EDTA em relação a concentração de laminina. Essa redução da laminina em glândulas atróficas deve ser resultado de um desequilíbrio no turnover dessa proteína, com diminuição na secreção ou aumento de sua degradação.

Com a evolução da atrofia glandular nota-se aumento significativo de fibras colágenas nos espaços intersticiais e, principalmente, na cápsula da glândula. Durante a atrofia, diversos fatores de crescimento, tais como fatores de crescimento fibroblástico (AMANO et al, 1993) e fatores de crescimento transformador β (AMANO et al, 1991) são liberados por células ductais. Esses fatores podem atuar

como ativador da síntese e secreção de colágeno em culturas de fibroblastos (FINE AND GOLDSTEIN, 1987; VARGA et al, 1987; NARAYANAR et al, 1989; GRANDE et al, 1993). Além desses agentes estimulando o aumento da secreção de colágeno durante o processo de atrofia glandular, a redução na degradação dessa proteína devido a diminuição dos níveis de expressão da colagenase fibroblástica nos períodos de 10 e 30 dias de atrofia, principalmente na cápsula, colabora para o aumento das fibras colágenas.

Os níveis de atividade da colagenase fibroblástica (MMP1) podem ser demonstrados por sua ação em gel impregnado com gelatina. A formação de duas bandas claras, com pesos moleculares de aproximadamente 55 kDa revelaram a presença dessa enzima nas amostras analisadas. Quando o nível de atividade era alto, as bandas se uniam formando uma única banda espessa, porém pela análise densitométrica era possível detectar dois picos mais intensos de atividade. A inibição da ação gelatinolítica dessa enzima pela 1,10-fenantrolina e EDTA, caracterizou-a como sendo do grupo das metaloproteinases.

ALVARES et al (1995), mostraram que a síntese de colagenase é estimulada quando fibroblastos humanos do ligamento periodontal são expostos a fatores de crescimento do tipo interleucina-1 β (IL-1β) e fator de crescimento derivado de plaquetas (FCDP). A IL-1β, que é um peptídeo secretado por leucócitos, principalmente linfócitos do tipo CD-4, induz um aumento de 5 a 9 vezes na secreção de colagenase pelos fibroblastos. Os FCDP, que são proteínas retidas em vesículas secretoras presentes no citoplasma de plaquetas, produz um aumento de 3 a 5 vezes na secreção dessa metaloproteinase. É possível que o aumento na atividade de metaloproteinase observado no período de 5 dias seja devido a estímulo de fatores liberados pelas células inflamatórias e plaquetas presentes na região em consequência do trauma cirúrgico provocado durante a realização da ligadura ductal. Com

a evolução da atrofia, o processo de cicatrização se estabelece no local, diminuindo a presença de células inflamatórias e de plaquetas, com consequente diminuição da síntese da colagenase pelos fibroblastos. Além da colagenase secretada pelos fibroblastos, células endoteliais (HERRON et al, 1986) e células inflamatórias como monócitos e macrófagos (CAMPBELL et al, 1987; BIRKEDAL-HANSEN, 1993), também podem secretar colagenase fibroblástica no local.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1- Atrofia glandular acarreta modificações na morfologia das células do parênquima glandular e do meio extracelular.

2- Glândulas submandibulares normais e atróficas de ratos expressam reduzidas quantidades de cadeia A da laminina.

3- A atrofia da glândula provoca alterações no padrão de distribuição da laminina e do colágeno IV presentes ao redor dos ácinos e ductos glandulares.

4- Observa-se aumento da colagenase de fibroblastos nos períodos iniciais de atrofia. Com a evolução da atrofia, há diminuição na expressão da enzima.

SUMMARY

SUMMARY

Obstructive atrophy of salivary glands is a common disease. It may occur by ductal obstruction caused by calculus, infection or neoplastic processes. In the present work we have used electron microscopy and biochemical methods to study the changes that occur in the expression laminin, type IV collagen and metaloproteinases during the experimental atrophy of the submandibular gland in rats. Immunohistochemical studies of laminin and type IV collagen showed an irregular distribution of there proteins around atrophies ducts and acini. The composition of laminin chains was not altered during glandular atrophy. Western blot analysis showed that rat submandibular gland laminin contain B chains, while A chain seems to be present only in small amounts. Investigation of the expression of fibroblast collagenase (MMP-1), by zimographic analysis showed high levels of this enzyme after 5 days of ligation. Gelatinolytic activity decrease progressively until 30 days of atrophy. Electron microscopy showed extensive morphologic changes in glandular cells. Myoepithelial cells showed "wrinkling" of outer plasma membrane leading to a thickening of the associated basement membrane. We conclude that the atrophy of salivary gland is an useful *in vivo* model to study the molecular events that take part in the remodeling of the extracellular matrix.

Key words: salivary glands, matrix extracellular, metalloproteins.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON JD. Molecular Biology of the Cell. 2ª Ed. New York & London: Garlnd Publishing Inc, 1989.

ALVARES O, KLEBE R, GRANT G, COCHRAN DL. Growth factor effects on the expression of collagenase and TIMP-1 in periodontal [1]ligament cells. *J Periodontol* 1995; **66**: 552-58.

AMANO O, TSUJI T, NAKAMURA T, ISEKI S. Expression of transforming growth factor b1 in the submandibular gland of the rat. *J Histochem Cytochem* 1991; **39**: 1707-11.

AMANO O, YOSHITAKE Y, NISHIKAWA K, ISEKI S. Basic Fibroblast growth factor in rat salivary glands. *Cell and Tissue Res* 1993; **273:** 467-74.

ARAUJO NS, TOMICH CE. Experimental production of mucus-retention phenomenon in animals treated with isoproterenol. *Oral Surg* 1971; **31**: 849-60.

[1] Referências de acordo com as normas de publicação da revista JOURNAL ORAL PATHOLOGY.

AZUMA M, TAMATANI T, FUKUI K, YOSHIDA H, KAMOGASHIRA T, OGINO K, SUZUKI T, SATO M. Role of plasminogen activators, metalloproteinases and the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the metastatic process of human salivary-gland adenocarcinoma cells. *Int J Cancer* 1993; **54**: 669-76.

AZUMA M, TAMATANI T, FUKUI K, YUKI T, HOQUE MO, YOSHIDA H, SATO M. Proteolytic enzymes in salivary extravasation mucoceles. *J Oral Pathol Med* 1995; **24**: 299-302.

BANERJEE SD, COHN RH, BERNFIELD MR. Basal lamina of embryonic salivary epithelia. Production by the epithelium and role in maintaining lobular morphology. *J Cell Biol* 1977; **73**: 445-463.

BARNES L. Surgical Pathology of the Head and Neck. New York: Marcel Dekker Inc, 1985.

BECKER U, NOWACK H, GAY S, TIMPL R. Production and specificity of antibodies against the aminoterminal region in type III collagen. *Immunology* 1986; **31**: 57-65.

BHASKAR SN, BOLDEN TE, WEINMANN JP. Experimental obstructive adenitis in the mouse. *J Dent Res* 1956; **6**: 852-62.

BHASKAR SN, LILLY GE, BHUSSRY B. Regeneration of the salivary glands in the rabbit. *J Dent Res* 1963; **45**: 37-41.

BIRKEDAL-HANSEN H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* 1993; **64**: 474-84.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytic Biochem* 1976; **72**: 248-54.

CAMPBELL EJ, CURY JD, LAZARUS CJ, WELGUS HG. Monocyte pro-collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Biol Chem* 1987; **262**: 15862-68.

CAMPBELL JH, TERRANOVA VP. Laminin: molecular organization and biological function. *J Oral Pathol* 1988; **17**: 309-23.

CUTLER LS. The role of extracellular matrix in the morphogenesis and differentiation of salivary glands. *Adv Dent Res* 1990; **4**: 27-33.

D'ARDENNE AJ, KIRKPATRICK P, WELLS CA, DAVIES JD. Laminin and fibronectin in adenoid cystic carcinoma. *J Clin Pathol* 1986; **39**: 138-44.

DAVID R, BUCHNER A. Elastosis in benign and malignant salivary gland tumors. A histochemical and ultrastructural study. *Cancer* 1980; **45**: 2301-10.

DAVIES GE, MANTHORPE M, ENGVALL E, VARON S. Isolation and characterization of rat schwanoma neurite-promoting factor: evidence that the factor contains laminin. *J Neurosci* 1985; **5**: 2662-71.

DICKSON SR, WARBURTON MI. Enhanced synthesis of gelatinase and stromelysin by myoepithelial cells during involution of the rat mammary gland. J *Histochem Cytochem* 1992; **40**: 697-703.

EDGAR D, TIMPL R, THOENEN H. Structural requirements for the stimulation of neurite outgrowth by two variant of laminin and their inhibition by antibodies. *J Cell Biol* 1988; **106**: 1299-1306.

EMMELIN N, GARRET JR, OHLIN P. Secretory activity and the myoepithelial cells salivary glands after duct ligation in cats. *Arch Oral Biol* 1974; **19**: 275-83.

EHRIG K, LEIVO I, ARGRAVES WS, REIOSLAHTE E, ENGVALL E. Merosin, a tissue-specific basement membrane protein, is laminin-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 3264-68.

FINE A, GOLDSTEIN RA. The effect of transforming growth factor-b on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts. *J Biol Chem* 1987; **262**: 3897-3902.

GRANDE J, MELDER D, ZINSMEISTER A, KILLEN P. Transforming growth factor-b1 induces collagen IV gene expression in NIH-373 cells. *Lab Invest* 1993; **69**: 387-95.

GROSS J AND LAPIERE CM. Collagenolytic activity in amphibian tissue: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1962; **54**: 1197-1204.

HASHIMOTO J, YAMADA K, OGATA K, TAKAI Y, MORI M. Immunoreaction of keratin, actin, S-100 protein and rat-EGF in duct-ligated rat salivary glands. *J Oral Pathol Med* 1992; **21**: 214-20.

HERRON GS, BANDA MJ, CLARK EJ, GAVRILOVIC J, WERB Z. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors. *J Biol Chem* 1986; **261**: 2814-18.

HOWARD EW, BULLEN EC, BANDA MI. Preferential inhibition of 72 and 92 kDa gelatinase by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J Biol Chem* 1991; **266**: 13070-75.

HUNTER DD, PORTER BE, BULOCK JW, ADAMS SP, MERLIE JP, SANES JR. Sequence of a motor neuron-selective adhesive site in the synaptic basal laminin protein S-laminin. *Cell* 1989; **59**: 905-13.

IKENO K, SAIKATSU S, UNO T, IKENO T. Effects of prolonged duct ligation of the rat salivary glands on the activity of trypsin-like protease. *Arch Oral Biol* 1988; **33**: 613-15.

JUNQUEIRA LC. Cytological, cytochemical and biochemical observations on secreting and resting salivary glands. *Exp Cell Res* 1950; **2**: 327-38.

JUNQUEIRA LC, BIGNOLAS G, BRENTANI RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979; **11**: 447-55.

JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. Histologia Básica. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

JUNQUEIRA LC, RABINOVITCH M. Reversibility of the phenomena induced by excretory duct ligature in the rat submaxillary gland. *Texas Rep Biol Med* 1954; **12**: 94-7.

KADOYA Y, KADOYA K, DURBEEJ M, HOLMVALL K, SOROKIN L, EKBLOM P. Antibodies against domain E3 of laminin-1 and integrin α6 subunit perturb branching epithelial morphogenesis of submandibular gland, but by different modes. *J Cell Biol* 1995; **129**: 521-34.

KLEIN G, EKBLOM M, FECKER L, TIMPL R, EKBLOM P. Differential expression of laminin A and B chains during development of embryonic mouse organs. *Development* 1990; **110**: 823-37.

KLEINMAN HK, EBIHARA I, KILLEN PD, SASAKI M, CANNON FB, YAMADA Y, MARTIN GR. Genes for basement membrane proteins are coordinately expressed in differentiating F9 cells but not in normal adult murine tissues. *Development Biol* 1987; **112**: 373-8.

KUCHERER-EHRET A, POTTGIESSER J, KREUTZBERG H, THOENEN H, EDGAR D. Developmental loss of laminin from the interstitial extracellular matrix correlates with decreased laminin gene expression. *Development* 1990; **110**: 1285-93.

LINE SRP. Diversidade da expressão dos componentes da matriz extracelular do adenoma pleomórfico da parótida. São Paulo, 1989 (Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP).

LINE SRP, FORTES L, GRANER E, ALMEIDA OP. Immunochemical characterization and distribution of laminin in the rat tongue. *Acta Histochem* 1995; **97**: 307-12.

MARINKOVICH MP, LUNSTRUM GP, KEENE DR, BURGESON RE. The dermal-epidermal junction of human skin contains a novel laminin variant. *J Cell Biol* 1992; **119**: 695-703.

MARTINEZ-HERNANDEZ A, AMENTA PS. The basement membrane in pathology. *Lab Invest* 1983; **48**: 656-77.

MARTINEZ IM, BYLUND DB, CASSITY N. Progressive secretory dysfunction in the rat submandibular gland after excretory duct ligation. *Arch Oral Biol* 1982; **27**: 443-50.

MARTIN GR, TIMPL R. Laminin and other basement membrane components. *Ann Rev Cell Biol* 1987; **3**: 57-85.

MIOSGE N, GUNTHER E, BECKER-RABBENSTEIN V, HERKEN R. Ultrastructural localization of laminin subunits during the onset of mesoderm formation in the mouse embryo. *Anatomy and Embryology* 1993; **187**: 601-5.

MONTEAGUDO C, MERINO MI, SAN-JUAN J, LIOTTA LA, STEFLER-STEVENSON WG. Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal, benign and malignant breast tissue. *Am J Pathol* 1990; **136**: 585-91.

MURPHY G, REYNOLDS JJ, WERB Z. Biosynthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases by human fibroblasts in culture. Stimulation by 12-0 tetradecanoylphorbol 13 acetate and interleukin 1 in parallel with collagenase. *J Biol Chem* 1985; **260**: 3079-83.

MURPHY RA, WATSON AY, METZ J, FORSSMANN WG. The mouse submandibular gland: an exocrine organ for growth factors. J *Histochem Cytochem* 1980; **28**: 890-902.

NAGATO T, YOSHIDA H, YOSHIDA A, UEHARA Y. A scanning electron microscope study of myoepithelial cells in exocrine glands. *Cell and Tissue Res* 1980; **209**: 1-10.

NARAYANAN AS, PAGE RC, SWANSON J. Regulation by transforming growth factor-b in the presence of other inflammatory mediators. *Biochem J* 1989; **260**: 463-69.

PAULSSON M. Noncollagenous proteins of basement membranes. *Coll Rel Res* 1987; **7**: 443-61.

PAULSSON M, SALDIN K. Mouse heart laminin. *J Biol Chem* 1989; **264**: 18726-32.

PEARSE AGE. Histochemistry Theoretical and Applied. 4ª Ed. New York: Churchill Livingstone, 1985.

RADNOR CJP. Myoepithelium in the involution mammary glands of the rats. *J Anatomic* 1972; **112**: 355-65.

ROBBINS SL. Robbins Patologia Extrutural e Funcional. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

SALO T, MAKELA M, KYLMANIEMI M, AUTIO-HARMAINEN H, LARJAVA H. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Lab Invest* 1994; **70**: 176-82.

SHAFER WG, HYNE MK, LEVY BM. Tratado de Patologia Bucal. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987.

SHIBA R, HAMADA T, KAWAKATSU K. Histochemical and Electron microscopical studies on the effect of duct ligation of rat salivary glands. *Arch Oral Biol* 1972; **17**: 299-309.

SHINOHARA M, OKA M, YAMADA K, HASHIMURA K, YUBA K, MORI M. Immunohistochemical and electronmicroscopic studies of obstructive lesions in submandibular glands. *J Oral Pathol Med* 1992; **21**: 370-75.

SIMSON JAV, SPICER SS, SETSER ME, MARTINEZ JR. Histochemistry and ultrastructure of rat submandibular acinar cells. Effects of chronic reserpine on secretion. *Lab Invest* 1978; **39**: 157-66.

SKALOVA A AND LEIVO I. Basement membrane proteins in salivary gland tumors. *Virch Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992; **420**: 425-31.

SOINI Y, AUTIO-HARMAINEN H. Synthesis and degradation of basement membranes in benign and malignant salivary gland tumors. A study by in situ hybridization. *J Pathol* 1993; **170**: 291-6.

SOUZA SJ, PACHECO MM, SONOHARA S, BRENTANI MM, BRENTANI RR. Regulation of extracellular matrix-degrading proteases. *Ciência e Cultura* 1993; **45**: 313-8.

STANDISH SM, SHAFER WG. Serial histologic effects of rat submaxillary and sublingual salivary glands duct and blood vessel ligation. *J Dent Res* 1957; **36**: 866-79.

STETLER-STEVENSON WG, LIOTTA LA, KLEINER DE. Extracellular matrix 6: Role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J* 1993; **7**: 1434-41.

TAKAI Y, ASANO K, CLEMENTE RP, MORI M. Lectin histochemical of submandibular glands following duct-ligation in mice and rats. *J Oral Pathol* 1985; **14**: 740-9.

TAKAI Y, SUMITOMOS S, MORI M. Immunohistochemical demonstration of keratin proteins in duct-ligated salivary glands of mice and rats. *J Oral Pathol* 1986; **15**: 16-20.

TAKAI Y, SUMIMOTO S, NODA Y, ASANO K, MORI M. Immunohistochemical observation of EGF and NGF in submandibular glands after duct ligation with or without testosterone administration. *J Oral Pathol* 1985; **14**: 322-31.

TAMARIN A. Submaxillary gland recovery from obstruction. I- Overall changes and electron microscopic alterations of granular duct cells. *J Ultrastruct Res* 1971; **34**: 276-87.

TAMARIN A. Submaxillary gland recovery from obstruction. II- Electron microscopic alterations of acinar cells. *J Ultrastruct Res* 1971; **34**: 288-302.

TEN CATE AR. Histologia Bucal. Desenvolvimento, Estrutura e Função. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985.

TERONEN O, SALO T, LAITINEN J, TORNWALL J, YLIPAAVALNIEMI P, KONTTINEN YT, HIETANEN J, SORSA T. Characterization of interstitial collagenases in jaw cyst wall. *Eur J Oral Sci* 1995; **103**: 141-7.

TERONEN O, SALO T, KONTTINEN YT, RIFKIN B, VERNILLO A, RAMAMURTHY NS, KJELDSEN L, BORREGAARD N, HIETANEN J, SORSA T. Identification and characterization of gelatinases/types IV collagenases in jaw cysts. *J Oral Pathol Med* 1995; **24**: 78-84.

THORNING D AND URACKO R. Renal glomerular basal lamina scaffold: embryologic development, anatomy and role in cellular reconstruction of rat glomerulli injured by freezing and thawing. *Lab Invest* 1977; **37**: 105-11.

TIMPL R. Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem* 1989; **180**: 487-502.

TIMPL R, ROHDE H, ROBEY PG, RENNARD SI, FOIDART JM, MARTIN GR. Laminin - A glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 1979; **254**: 9933-37.

TODD PB, BOWMAN W. The physiological anatomy and physiology of man. Philadelphia, Blanchard and Lea, 1857.

TRYGGVASON K. The laminin family. *Current Opinion in Cell Biol* 1993; **5**: 877-82.

VARGA T, ROSENBLOOM J, JIMENEZ SA. Transforming growth factor-b causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNA in normal human dermal fibroblasts. *Biochem J* 1987; **247**: 597-604.

VUORIO E, CROMBRUGGHE B. The family of collagen genes. *Ann Rev Biochem* 1990; **59**: 837-72.

WETZELS RHW, VAM DER VELDEN LA, SCHAAFSMA HE, MANNI JJ, LEIGH IM, VOOIJS GP, RAMAEKERS FCS. Immunohistochemical localization of basement membrane type VII collagen and laminin in neoplasm of the head and neck. *Histopathol* 1992; **21**: 459-64.