

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM ESTOMATOLOGIA**

**DIOGO LENZI CAPELLA**

**MÉTODO DE CONGELAÇÃO E DESCONGELAÇÃO DE GLÂNDULAS  
SALIVARES SUBMANDIBULARES DE COELHOS : ESTUDO PILOTO**

**CURITIBA-PR**

**2011**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM ESTOMATOLOGIA**

**DIOGO LENZI CAPELLA**

**MÉTODO DE CONGELAÇÃO E DESCONGELAÇÃO DE GLÂNDULAS  
SALIVARES SUBMANDIBULARES DE COELHOS : ESTUDO PILOTO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Odontologia, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Denis Martins

Co-Orientadora: Prof. Doutora Marina de Oliveira Ribas

**CURITIBA**

**2011**

**DIOGO LENZI CAPELLA**

**MÉTODO DE CONGELAÇÃO E DESCONGELAÇÃO DE GLÂNDULAS  
SALIVARES SUBMANDIBULARES DE COELHOS : ESTUDO PILOTO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Odontologia, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Estomatologia.

**Banca examinadora**

**Prof. Dr. Wilson Denis Martins - PUCPR**

**Prof. Dra. Marina de Oliveira Ribas - PUCPR**

**Prof. Dr. Marcelo Carlos Bortoluzzi - UNOESC**

**CURITIBA**

**2011**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fernanda, por você ter gostado de mim do jeito que sou. Por ter me aceitado com meus defeitos e por saber também elogiar minhas virtudes. Por me ensinar que a cada dia que podemos recomeçar .

Agradeço aos meus pais Enio e Beatriz, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que eu os trilhasse sem medo e cheio de esperança. Pela compreensão durante minhas longas viagens e por terem vivido comigo fases difíceis, que foram matéria-prima de aprendizado.

À minha irmã Annelise, que ainda é um espírito inocente neste mundo maculado.

À minha avó, Mirte (*in memoriam*), por ter sido o arcabouço familiar por muitos anos, uma pessoa que mostrou que muitas vezes um gesto marca mais que muitas palavras, coração bondoso que dedicou toda sua vida à família, por todo o amor que me dedicou e por ter me fornecido a oportunidade deste curso.

Aos amigos queridos, de perto e de longe, a minha eterna gratidão. Fausto, Carlos, Ricardo, Daniel, Jean, Marcelo, Fábio e Vladimir. São poucos e bons amigos que, apesar de não entenderem nada do que faço, favoreceram momentos de distração tão importantes nesta etapa.

Ao diretor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Prof. Doutor Sérgio Roberto Vieira.

Ao Prof. Doutor Wilson Denis Martins, pela valiosa orientação neste trabalho, pela confiança em mim depositada, pela paciência e atenção dispensada. Foi um grande privilégio tê-lo como orientador.

À Prof. Doutora Marina de Oliveira Ribas, pela objetividade e auxílio na realização desta pesquisa. Sua inteligência fundamentada no rigor do método científico, disciplinada para a formação do professor e pesquisador, tendo sido fundamental em minha formação.

À Prof. Doutora Aline Cristina Batista Rodrigues Johann, expoente em Patologia Bucal, que me mostrou que a docência é uma arte e contribuiu para o redirecionamento de minha trajetória acadêmica. Foi e será sempre inspiração intelectual, exemplo de professora e de pesquisadora.

Ao Prof. Doutor Paulo Henrique Couto Souza, coordenador do Mestrado em Odontologia na área de Concentração em Estomatologia, cujo profissionalismo e autenticidade são um exemplo. Obrigado pela rica contribuição em minha formação pessoal e profissional.

A todos os professores do curso de Pós- Graduação, pela paciência, dedicação e ensinamentos disponibilizados nas aulas. Cada um de forma especial contribuiu para a conclusão desse trabalho e conseqüentemente para minha formação profissional.

Aos meus colegas de turma, pelo carinho e pela amizade sincera neste caminho que percorremos juntos. Tenho certeza que levaremos esses laços por toda nossas vidas. Admiro-os muito e sei que posso contar com vocês sempre, assim como podem contar comigo.

## RESUMO

**Objetivo:** O objetivo desta pesquisa é testar um método inovador de conservação extracorpórea de glândulas salivares submandibulares. O método empregado foi do resfriamento a temperaturas abaixo de 0°C (criopreservação) para futuro reimplante, baseado no método de criopreservação de paratireóides.

**Material e Método:** Foram removidas cirurgicamente 20 glândulas, sendo 10 glândulas submandibulares teste e 10 glândulas submandibulares controle. As glândulas submandibulares teste foram acondicionadas em criotubos estéreis em um meio de criopreservação preparado previamente com uma mistura de 20% (em volume) de soro autólogo, dimetil sulfoxido 20% (crioprotetor) e 60% RPMI-1640. Em seguida, submetidas a um resfriamento de aproximadamente 1°C/min por refrigeradores que atingem -20°C, -40°C e -80°C. As glândulas foram transferidas para congeladores de estocagem com nitrogênio líquido chegando a -152°C. Dois métodos de descongelamento foram testados: 1) 4 glândulas submandibulares retiradas após 30 dias do nitrogênio líquido foram descongeladas em meio RPMI 1640 e 10% de soro fisiológico em 37°C durante 10 minutos 2) 6 glândulas foram descongeladas após 60 dias em meio RPMI 1640 e 10% de soro fisiológico entre 30-32°C durante 1 minuto. As peças foram processadas e coradas por hematoxilina e eosina e submetidas a imunohistoquímica para citoqueratina 14. Para o estudo morfológico, os critérios utilizados foram integridade celular de ácinos, dos ductos e necrose. Para o estudo morfométrico, realizou-se medição de 180 campos escolhidos aleatoriamente no aumento de 400x em cada lâmina. Três medições foram feitas: a área total dos ácinos, de estruturas ductais e o número de núcleos acinares numa área retangular de 191943,2µm<sup>2</sup> de área. A imunoexpressão foi classificada em positiva ou negativa.

**Resultados:** Foram apresentadas na morfologia: 1) 4 primeiras glândulas apresentaram 100% de necrose, sendo excluídas da análise morfométrica e imunohistoquímica. 2) 6 glândulas apresentaram integridade celular de ácinos e ductos. Na morfometria, foram observados diferenças estatisticamente significativas nas áreas dos ácinos (p=0,04857) e ductos (p= 0,0000) das glândulas criopreservadas comparadas com as de controle, possuindo áreas menores comparadas com glândulas

normais, sofrendo atrofia. Não houve diferenças estatisticamente significativas no número de núcleos acinares . Na imunistoquímica, a reatividade nas glândulas amostrais com a Citoqueratina 14 foram todas positivas. Conclusão: As glândulas salivares submandibulares submetidas à criopreservação apresentaram alterações morfológicas e morfométricas (atrofia), condições compatíveis com manutenção da normalidade. Os resultados sugerem a possibilidade de um método inédito de conservação extra-corpórea de glândulas salivares submandibulares através de congelação.

## **Abstract:**

Objective: The objective of this research is to test a new method of extracorporeal preservation of the submandibular glands. The method used was cooling to temperatures below 0 ° C (cryopreservation) for future reimplantation based on the method of cryopreservation of parathyroid glands. Material and Methods: 20 surgically removed glands, 10 submandibular glands test and 10 submandibular glands control. The submandibular glands test were placed in sterile cryotubes in a cryopreservation medium previously prepared with a mixture of 20% (by volume) autologous serum, 20% dimethyl sulfoxide (cryoprotectant) and 60% RPMI-1640. Then subjected to cooling of approximately 1 ° C / min with refrigerators that reach -20 ° C, -40 ° C and -80 ° C. The glands were transferred to storage freezers with liquid nitrogen reaching -152 ° C. Two methods of thawing were tested: 1) 4 submandibular glands removed after 30 days of liquid nitrogen were thawed in RPMI 1640 and 10% saline at 37 ° C for 10 minutes 2) 6 glands were thawed after 60 days in RPMI 1640 and 10% saline solution between 30-32 ° C for 1 minute. The specimens were processed and stained with hematoxylin and eosin and subjected to immunohistochemistry for cytokeratin 14. For the morphological study, the criteria used were cellular integrity of acini, ducts and necrosis. For the morphometric study was measurement of 180 randomly chosen fields at 400x magnification on each slide. Three measurements were made: the total area of acini, ductal structures and the number of acini nuclei in a rectangular area 191943.2  $\mu\text{m}^2$ . The immunostaining was classified as positive or negative. Results: We presented the morphology: a) 4 / 1 glands showed 100% necrosis, being excluded from the morphometric analysis and immunohistochemistry. 2) 6 glands showed cellular integrity of acini and ducts. In morphometry, significant differences were observed in areas of acini ( $p = 0.04857$ ) and ducts ( $p = 0.0000$ ) of cryopreserved glands compared with the control, having smaller areas compared with normal glands, undergoing atrophy. There were no statistically significant differences in the number of acinar nuclei. In immunohistochemistry, the reactivity in the glands with Cytokeratin 14 sample were positive. Conclusion: The submandibular salivary glands subjected to cryopreservation showed morphological and morphometric (atrophy) conditions, but compatible with maintenance of normality. The results suggest the possibility of a

new method of conservation extracorporeal submandibular salivary gland by freezing.

## Lista de Figuras

Figura 1- Controle com integridade celular de ácinos mucosos formados por células piramidais com núcleos esféricos na porção basal e citoplasma claro (HE, 400x)- Hematoxilina e Eosina.....	33
Figura 2- Controle com integridade de ductos, com epitélio pseudoestratificado colunar simples formado por células prismáticas altas. (HE, 400x).....	34
Figura 3- Necrose acinar, com borramento nos limites das células, quase sempre com a perda do contorno do ácino onde os núcleos das células acinares ficam soltos. (HE, 400x).....	35
Figura 4- Atrofia acinar, com ácinos pequenos e sem grânulos, assemelhando-se a ductos. (HE, 400x).....	36
Figura 5- Janela do Image proplus mostrando a delimitação das áreas dos ácinos.....	37
Figura 6- Janela do Image proplus mostrando a delimitação das áreas dos ductos .....	38
Figura 7- Janela do Image proplus mostrando a contagem do números de núcleos em ácinos.....	39
Figura 8-Controle- lesão de pele humana.....	41
Figura 9- Ácinos submandibulares com citoplasma desorganizado (*), núcleos indistinguíveis (#) e membrana sem delimitação (flecha). Necrose acinar.....	42
Figura 10- Ácinos Submandibulares volumosos, bem delimitados, com citoplasma abundante e com núcleo de perfil elíptico.....	43
Figura 11- Marcação positiva foi observado para células mioepiteliais (flecha).....	45
Figura 12- Marcação positiva foi observado para células ductais (flecha).....	46

## Lista de Tabelas

Tabela estatística da comparação de médias nas áreas de ácinos, de ductos e número de núcleos .....	65
---	----

## **Lista de Anexos**

Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética para estudos com animais.....	66.
Anexo 2. Fragmentos de glândulas submandibulares medindo 10x 10x 10 mm...	67
Anexo 3. Criotubos com as glândulas.....	67

## Lista de Abreviaturas

PUCPR	-Pontifícia Universidade Católica do Paraná
GY	-Grays
CEA	- Comitê de Ética para estudos em Animais
DMSO	-Dimetil sulfóxido
RPMI 1640	- Roswell Park Memorial Institute 1640
HE	-Hematoxilina e Eosina
CK 14	-Citoqueratina 14

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>15</b>
<b>2. Revisão de literatura.....</b>	<b>17</b>
<b>3. Material e método.....</b>	<b>29</b>
3.1 Amostra.....	29
3.2 Método de criopreservação.....	30
3.3 Método de descongelamento.....	30
3.4 Modelo Experimental.....	31
3.5 Análise morfológica.....	31
3.6 Morfometria.....	36
3.7 Método estatístico.....	38
3.8 Estudo imunoistoquímico.....	39
<b>4. Resultados.....</b>	<b>41</b>
4.1 Análise estatística.....	41
4.2 Análise morfométrica.....	43
4.3 Análise Imunoistoquímica.....	43
<b>5. Discussão.....</b>	<b>46</b>
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>49</b>
<b>7.Referências.....</b>	<b>50</b>
<b>8.Lista de tabelas.....</b>	<b>64</b>
<b>8.Anexos.....</b>	<b>65</b>

## 1. Introdução

A radioterapia afeta não somente as células neoplásicas, mas também os tecidos normais circunjacentes, como mucosa, vasos, músculos, ossos e glândulas salivares. Os pacientes que recebem radioterapia em cabeça e pescoço podem apresentar um número significativo de complicações bucais como mucosite, xerostomia, dor bucal intensa, disgeusia e hipersensibilidade dentária (Keefe, 2006; Patel et. al., 2010; Chen et.al., 2011).

A xerostomia é uma condição em que a função das glândulas salivares são alteradas causando hipossalivação na boca e resultando em queixas subjetivas de boca seca. O tecido glandular é altamente sensível à radiação e a disfunção salivar desenvolve-se quando as glândulas estão nas áreas irradiadas. O fluxo salivar geralmente diminui em 50% a 60% durante a primeira semana de radiação e o fluxo salivar basal atinge nível mensurável mínimo em 2 a 3 semanas após 23 Grays (Gy). Duas técnicas padrão irradiam as glândulas salivares maiores. As doses de irradiação chegam a 60-65 Gy, resultando no comprometimento total de todo o tecido glandular irradiado e desenvolvimento de xerostomia (Guchelaar et. al., 1997).

A xerostomia é permanente e devastadora. Suas consequências são inúmeras, afetando significativamente a qualidade de vida do paciente. Prejudica a mastigação, deglutição, gustação e altera a microbiota bucal, favorecendo o desenvolvimento da cárie. A mucosa bucal torna-se seca, ulcerada e dolorosa. Os pacientes desenvolvem baixa tolerância para próteses dentárias, devido à fragilidade dos tecidos e à falta de lubrificação. A fala é alterada e a deglutição fica dolorosa. A alimentação é alterada, conduzindo a distúrbios nutricionais. O sono é afetado, com os pacientes acordando para umedecer a boca seca (Vissink et al., 2010).

De modo geral, os esforços de manejo dos pacientes irradiados se concentram em dois métodos:

*Preventivos* (tratamento odontológico prévio, nutrição apropriada, higiene bucal efetiva e detecção precoce de lesões bucais; uso de agentes citoprotetores; proteções glandulares especiais durante a radioterapia e uso de feixes altamente

dirigidos e seletivos; transferência cirúrgica de glândulas salivares para posterior reimplante e transferência genética e bioengenharia).

*Terapêuticos e paliativos* (uso de fármacos; fluoretos, antimicrobianos, substitutos da saliva e sialogogos).

O objetivo desta pesquisa é analisar morfológica, morfométrica e imunoistoquimicamente a viabilidade das glândulas salivares submandibulares removidas cirurgicamente e submetidas à criopreservação, com o propósito reimplante após radioterapia.

## 2. Revisão de literatura

Carcinomas da cabeça e pescoço constituem um grupo heterogêneo de doenças complexas e são responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade na população. São várias as modalidades de tratamento para o carcinoma de cabeça e pescoço. A ressecção cirúrgica é a preferencial, pois somente o uso de radiação para a mandíbula pode resultar no desenvolvimento de osteorradionecrose. A remoção do câncer é feita com margem de 1-1,5 cm no tecido circunjacente. Metástase linfática é comum, ocorrendo em aproximadamente 45% dos pacientes. O esvaziamento cervical dos linfonodos cervicais é preconizado para a eliminação e controle da metástase. Para pacientes com lesões extensas ou com envolvimento de múltiplos linfonodos, a radioterapia pós-operatória é necessária (Ow & Myers, 2011).

A radioterapia da região da cabeça e pescoço provoca complicações agudas e crônicas. Os efeitos colaterais agudos são a mucosite, disfagia, rouquidão, eritema e descamação da pele. As complicações crônicas afetam os vasos sanguíneos, glândulas salivares, mucosa, tecido conjuntivo e osso. A intensidade das complicações está diretamente relacionadas com a dose, incluindo a dose total, fracionamento e duração do tratamento. Possíveis sequelas incluem osteonecrose, fibrose subcutânea, trismo, perda do paladar, disfunção da tireóide, estenose esofágica, cárie dentária e hipossalivação, danos no ouvido médio ou interno (Trotti, 2000; Dirix, 2006).

A irradiação das glândulas salivares causa progressiva perda da função da glândula (hipossalivação) desde o início da radioterapia. Na primeira semana ocorre diminuição de 50% a 60% no fluxo salivar e, após sete semanas, diminui para cerca de 20% (Franzen et al., 1992). Com doses menores, o dano parece ser reversível, embora a glândula parótida sofra danos irreversíveis com 25-40 Gy (Roesink, 2001).

Mudanças quantitativas e qualitativas na saliva predispõem o paciente a vários problemas (secura da boca e prejuízo das funções normais como fala, mastigação e deglutição) devido à lubrificação insuficiente. Além disso, a mucosa bucal tornar-se seca e atrófica, causando ulcerações frequentes. Epstein et al. (1999) realizaram um levantamento de 65 pacientes que sobreviveram por mais de 6 meses após a

radioterapia e constatou que 91,8% queixaram-se de boca seca, 43% tiveram dificuldade de mastigação, 63,1% com disfagia, 75,4% relataram perda de paladar, 50,8% possuíam alteração de fala, 48,5% tinham dificuldade com próteses totais removíveis e 38,5% relataram aumento da cárie dentária.

Os danos no DNA induzidos pela radiação prejudicam a divisão celular normal, resultando em morte celular ou senescência das células. Com base nas taxas de proliferação das células glandulares (60-120 dias), espera-se uma resposta tardia do tecido (> 60 dias) (Stewart & Van Der Kogel, 2002). No entanto, as mudanças na quantidade e composição da saliva indicam que essas glândulas são sensíveis e respondem antes dos danos no DNA (Coppes et al., 2002).

Lesões provocadas pela radiação levam principalmente à perda das células acinares e conseqüente diminuição na produção de saliva. Curiosamente, os ductos salivares, embora privados da função, permanecem intactos (Konings et al., 2005). A relação da apoptose e da morte celular com disfunção da glândula salivar permanece obscura. Paardenkooper et al. (1998) não observaram um aumento dose-dependente de células apoptóticas muito cedo após a radioterapia, enquanto Ávila et al. (2009) verificaram que o início da disfunção da glândula salivar induzida por radiação é resultado de apoptose induzida por p53. A hipótese de apoptose em massa, a saída de grânulos e subsequente lise de células acinares é a mais aceita para explicar a disfunção radioinduzida das glândulas salivares (Nagler et al., 1997). No entanto, vários estudos não mostram perda de células durante os primeiros dias após a irradiação, embora o fluxo de saliva seja dramaticamente reduzido (Vissink et al., 1990). Aparentemente, as células produtoras de saliva não desaparecem, mas perdem a sua função durante os primeiros dias após a irradiação.

Coppes et al. (2001) observaram que a perda da função da glândula salivar ocorre em quatro fases. A primeira fase (0-10 dias) é caracterizada por um rápido declínio no fluxo salivar, sem mudanças na secreção de amilase ou no número de células acinares. A segunda fase (10-60 dias) consiste em uma diminuição do fluxo e na secreção de amilase em paralelo com a perda de células acinares. O fluxo salivar, a secreção da amilase e o número de células acinares não mudam na terceira fase (60-120 dias). Na quarta fase (120-240 dias) ocorre um aumento no número de

células acinares, entretanto com uma deterioração morfológica tanto nas células quanto no tecido.

Konings et al. (2005) sugeriram dois mecanismos distintos para explicar a disfunção radioinduzida da glândula salivar. Primeiro, há um defeito no funcionamento celular por causa do dano à membrana seletiva, danificando os receptores muscarínicos que controlam as vias da excreção de água, não ocorrendo morte ou lise imediata das células. Tardiamente ocorre morte de células progenitoras e células-tronco, assim inibindo a renovação celular adequada.

A secreção salivar continua a declinar vários meses após a radioterapia (Valdez, 1991). Posteriormente, é possível alguma recuperação celular até 12 a 18 meses após a radioterapia, dependendo da dose recebida e o volume do tecido da glândula irradiada. No entanto, em geral, desenvolve-se uma xerostomia irreversível (Roesink, 2001).

Entretanto, BRAAM et al. (2005) relataram que a produção salivar poderia ainda se recuperar parcialmente, com cerca de 32% no aumento do fluxo salivar em 1 a 5 anos após a radioterapia. Este dado não é aceito de forma geral, e outro estudo longitudinal encontrou pouca recuperação ao longo do tempo em pacientes que receberam radiação nas glândulas salivares (Eisbruch & Terrell, 2003).

De modo geral, os esforços de manejo dos pacientes irradiados têm sido concentrados em dois métodos: preventivos, como exemplo: uso de agentes citoprotetores (Wasserman et al., 2005; Jellema et al., 2006; Hensley et al., 2009); uso de feixes de radiação com intensidade modulada (Eisbruch et al., 1999; Vergeer et al., 2009); transferência cirúrgica de glândulas salivares para posterior reimplante (Kumar et al., 1990; Macleod e Robbins 1992; Greer et al., 2000; Spiegel et al., 2000; Spiegel et al. 2001; Seikaly et al., 2001; Jha et al., 2003; Seikaly et al., 2004) e implantação de células tronco ( Lombaert et al., 2006) e terapêuticos como exemplo o uso de medicamentos (Bjornstrom et al., 1990, Johnson et al., 1993; Le Veque et al., 1993, Hamlar et al., 1996 Ringash et al., 2004; Gornitsky et al., 2005); fluoretos e antimicrobianos (Jellema et al., 2001); substitutos da saliva e sialogogos (Epstein et al., 1991). Entre os métodos preventivos, a radioproteção direta pode ser alcançada pelo uso de amifostina. Quando a amifostina entra na corrente sanguínea, é

rapidamente hidrolisada pela fosfatase alcalina do endotélio e convertida em sua forma ativa, WR-1065. Esta forma ativa penetra nas células e núcleos, onde atua como um protetor contra os radicais livres, prevenindo assim danos causados pela radiação ao DNA. Embora a amifostina tenha o potencial para reduzir xerostomia durante e após o tratamento, uma proporção significativa de pacientes continuam a apresentar xerostomia. A administração intravenosa da amifostina é acompanhada de muitos efeitos colaterais e mais estudos são necessários para confirmar o benefício da amifostina (Wasserman et al., 2005, Jellema et al. 2006, Hensley et al., 2009).

Outra tentativa de prevenção é a radiação com intensidade modulada. Muda-se o cronograma da radioterapia comum, fracionada em mais sessões e permitindo uma focalização maior na neoplasia e, portanto, trazendo a possibilidade de melhor proteção dos tecidos vizinhos (por exemplo, glândulas salivares). A radioterapia de intensidade modulada é atualmente recomendada para câncer de cabeça e pescoço, pois limita a dose de radiação acumulada nos tecidos normais e pode reduzir a dose para parótida, submandibular, sublingual e glândulas salivares menores e ao mesmo tempo ajudar a manter o fluxo salivar (Eisbruch et al., 1999). Apesar da radiação de intensidade modulada reduzir significativamente a possibilidade da xerostomia quando comparada com a radioterapia convencional, aproximadamente 40% dos pacientes ainda se queixam de xerostomia após este tratamento (Vergeer et al., 2009).

As técnicas de transferência de glândulas salivares em humanos foram introduzidas recentemente e poucas pesquisas foram publicadas a respeito (Jha et al. 2003, Seikaly et al., 2004). Trata-se, porém, de uma técnica com grande relevância científico-social, uma vez que os sofrimentos dos pacientes irradiados são extremos.

Glândulas sublinguais foram transferidas como enxerto livre (sem reanastomose microvascular) para o fórnice do olho de coelhos, como tratamento para a xeroftalmia. Kumar et. al. (1990) observaram diminuição de ulcerações de córnea em 75% e glândulas transplantadas permaneceram pelo menos 50% funcionais após o transplante. Macleod e Robbins (1992) seguiram com um procedimento semelhante em 8 pacientes humanos: 7 deles relataram melhora significativa na xeroftalmia. Geerling et. al. (1998) descreveram 22 pacientes que se submeteram a

transplante de glândula submandibular microvascular para tratamento de xeroftalmia; 88% dos casos as glândulas mantiveram-se viáveis em 3 meses e 75% após 1 ano. Daqueles pacientes com transplantes viáveis, 75% pararam de usar o colírio, com alguns exigindo a redução cirúrgica do tamanho da glândula.

Estudos em animais demonstraram a viabilidade de transplante de glândulas submandibulares e de tecido parotídeo. Greer et al. (2000) obtiveram sucesso realizando transplante imediato de tecido glandular da parótida e das submandibulares para uma bolsa submucosa na bochecha de hamsters. A análise histológica das glândulas transportadas demonstrou tecido intacto, organizado e viável.

Spiegel et al. (2000, 2001) realizaram dois experimentos de transplante microvascular e reimplante de glândulas submandibulares em coelhos e em ratos. As glândulas submandibulares foram transplantadas subcutaneamente, com anastomoses microvasculares, para a virilha dos ratos. Após diversos intervalos de tempo, os campos foram reabertos e as glândulas examinadas, macro e microscopicamente. Apresentaram viabilidade, com morfologia normal. No estudo em coelhos, os autores realizaram segunda cirurgia, também com técnicas microvasculares, transplantando as glândulas para a região cervical. As glândulas igualmente se mostraram viáveis.

Demonstrou-se recentemente que a glândula submandibular de humanos pode sobreviver à transferência cirúrgica e continuar com a função adequada após radioterapia da cabeça e pescoço. As glândulas foram transferidas para o espaço submental e protegidas por barreiras adequadas durante a fase radioterápica. Posteriormente, a funcionalidade das glândulas foi demonstrada pela verificação do fluxo salivar e radioisótopos. A esta manobra cirúrgica foi dado o nome de procedimento Seikaly – Jha. Esta opção só é viável em pacientes para os quais está prevista radioterapia pós-operatória, pois a transferência é feita como parte da intervenção cirúrgica. Obviamente, nem sempre é fácil prever quais pacientes vão necessitar de radioterapia pós-operatória e alguns pacientes podem recusar tratamento. Em alguns pacientes, a proximidade do câncer com a glândula impede sua transferência, sendo esta a maior limitação deste procedimento (Seikaly et al., 2001). Jha et al. (2003) realizaram o maior estudo para este tratamento, em que 17

de 60 pacientes (28,3%) foram submetidos a transferência de glândula salivar e todas as glândulas sobreviveram à transferência e funcionaram bem. A técnica cirúrgica não teve complicações e acrescentou uma média de 45 minutos para o procedimento cirúrgico. A glândula submandibular foi deixada pediculada e então rodada anteriormente sob o ventre anterior do músculo digástrico; a artéria e veia faciais foram preservadas. Os resultados na prevenção da xerostomia são convincentes: 81% dos pacientes não tiveram nenhuma ou mínima xerostomia, e 19% tiveram de moderada a severa xerostomia. Estudos longitudinais foram publicados recentemente e 83% dos pacientes relataram quantidades normais de saliva dois anos após a radioterapia (Seikaly et al., 2004).

Como se pode observar nos estudos anteriormente mencionados, nenhum estudo na literatura, até o presente momento, aborda a hipótese de conservação extracorpórea de glândulas salivares para reimplante posterior à radioterapia. Kolahi & Mansourian (2010) publicaram na revista *Medical Hypotheses* a hipótese de se fazer autotransplante de glândulas salivares menores criopreservadas pós-radioterapia, sem nenhuma pesquisa realizada. Não há nenhuma pesquisa na literatura que apresente um método de criopreservação de glândulas salivares.

O resfriamento a baixas temperaturas (criopreservação) é muito utilizado para ovócitos humanos, embriões, esperma e tecidos gonadais. Estão bem estabelecidos vários protocolos para criopreservação de esperma humano e embriões, a maioria estabelecidos há mais de 15 anos e classificados como “resfriamento lento” ou “procedimentos de resfriamento equilibrado” (Leibo, 1986; Mazur, 1990).

Nesses procedimentos de resfriamento lento, crioprotetores (anticongelantes) são adicionados à solução em torno da célula e da amostra e, em seguida, resfriados a uma taxa ditada pelo tamanho e permeabilidade da célula. O primeiro crioprotetor que surgiu foi o glicerol, descoberto acidentalmente. O subsequente desenvolvimento de técnicas de criopreservação teve um enorme impacto em muitas áreas, principalmente na medicina reprodutiva (Pegg, 2002).

Os danos celulares da congelação acontecem de duas formas: danos diretos a partir de cristais de gelo e danos secundários causados pelo aumento da concentração do crioprotetor, tóxico em altas dosagens. O congelamento intracelular

é letal, mas pode ser evitado pela congelação suficientemente lenta e sob concentrações aceitáveis de crioprotetor. Os crioprotetores agem principalmente por reduzir a quantidade de gelo que se forma em qualquer temperatura abaixo de zero. O transporte de crioprotetores para dentro e fora das células e tecidos é bem conhecido, mas a experiência direta é crucial para o desenvolvimento do processo de criopreservação (Pegg, 2002). A taxa de descongelamento e a remoção do crioprotetor também devem ser adequadas para o descongelamento e preservação das características da célula (Shaw & Jones, 2003).

Na busca de um protocolo que se equiparasse em glândulas salivares, foi realizada uma busca bibliográfica de tecidos que tivessem maior semelhança estrutural e funcional. Em relação ao tecido glandular, a criopreservação de tecido de paratireóide, inicialmente descrita por Wells et al. (1974), é usada para preservar o tecido, mantendo a viabilidade das células e a função da glândula. Esta técnica é aceita como uma terapia padrão em cirurgia endócrina. Especialmente após paratireoidectomia subtotal ou total de hiperparatireoidismo secundário.

O sucesso na manutenção da função do tecido paratireóide criopreservado e autoimplantado têm grande variabilidade na literatura. Wagner et al. (1986) relataram diversos graus de necrose tecidual da paratireóide criopreservada em comparação ao tecido a fresco. O mesmo grupo sugeriu que o processo de criopreservação determina graus variáveis de dano celular e o reimplante de tecido criopreservado necessitaria de maior quantidade de paratireóide para compensar essa perda celular.

Herrera et al. (1992) relataram que a viabilidade de células de paratireóide e função secretora mantém-se em um intervalo de criopreservação por até 2 anos.

Tanaka et al. (1996) demonstraram que a arquitetura da paratireóide foi preservada depois da criopreservação em sete das oito amostras. Uma das oito espécimes obtiveram uma diminuição do número de células da paratireóide.

Smeds et al. (1999) realizaram um estudo em que o tecido humano de paratireóide foi criopreservado por 55 meses e, em seguida, xenotransplantado em camundongos. Na análise microscópica, o tecido foi morfológicamente viável.

Com resultados contrários, Cohen et al. (2005) demonstraram que nenhum tecido da paratireóide continuou funcionando depois de 22 meses de criopreservação após autotransplante em seres humanos. Eles concluíram que a duração da criopreservação foi preditor significativo da falência do enxerto.

Para Montenegro et al. (2008), a observação microscópica de tecido não se relacionou ao sucesso funcional após reimplante. Embora não tenham observado dano celular significativo à microscopia óptica, o tecido criopreservado apresentava menor secreção de PTH.

Guerrero et. al. (2008) avaliaram 106 espécimes da paratireóide criopreservada. A viabilidade de amostras criopreservadas foi de 71% (10/14) em 24 meses e 1% (1 / 92) das amostras armazenadas por mais de 24 meses.

Moffett & Suliburk (2011) publicaram o procedimento mais atual para a técnica de criopreservação do tecido de paratireóide. Para preservar a integridade e prevenir a contaminação, qualquer manipulação do tecido da paratireóide deve ser feita sobre o gelo com os reagentes refrigerados e técnica estéril. O tecido colhido é imediatamente colocado em meio de cultura RPMI-1640 refrigerado, estéril e transportado para um refrigerador. Se o meio de cultura não está disponível na sala de cirurgia, uma solução estéril de soro fisiológico é uma alternativa adequada.

O tecido é então transferido para uma placa de Petri sobre gelo contendo RPMI-1640, e picado em 1 a 2 mm<sup>3</sup> com um bisturi. Os fragmentos são então armazenados em um meio de criopreservação preparado com uma mistura de 20% (em volume) de soro autólogo, 20% de dimetil sulfóxido (crioprotetor) e 60% de RPMI-1640. Aproximadamente 1 a 1,5 mL do meio de criopreservação é fracionado em criotubos de 2 mL e 15 a 20 pedaços de tecidos são então inseridos nos criotubos. O congelamento deve ser realizado de forma lenta e gradativa (1°C/min), para que não ocorra a formação de cristais de gelo intracelular com danos à célula. O tecido deve ser congelado alcançando -70°C, onde ficarão 24h. Depois são transferidos para um sistema de nitrogênio líquido, alcançando -135°C para o armazenamento a longo prazo (Moffett & Suliburk,2011).

Para a preparação do autotransplante, os frascos são retirados do armazenamento e colocados em banho-maria a 37°C, sendo agitados suavemente até descongelarem. Outro passo importante no processo de criopreservação é o descongelamento até 8 minutos. Deve ser rápido para aumentar a integridade das células, evitando ocorrer o fenômeno de recristalização (descongelamento e recongelamento das moléculas de água) que pode ocorrer durante o reaquecimento lento. Após esta fase, os tecidos são colocados em soluções salinas e meios nutritivos para obter a diminuição progressiva da concentração do crioprotetor, que é tóxico para as células nesta temperatura. O tecido é lavado em um meio composto de 20% de soro autólogo e 80% de RPMI-1640. O dimetil sulfoxido residual é removido do sobrenadante. O tecido é então armazenado em um recipiente contendo RPMI-1640 fresco e está pronto para o transplante (Moffett & Suliburk ,2011).

Cabe aqui considerações sobre as alterações celulares que estão relacionadas a criopreservação.

Segundo Cotran et al. (2007), as alterações morfológicas referem-se às alterações estruturais em células ou tecidos. A célula normal está confinada a uma gama bastante estreita da função e estrutura. No entanto, é capaz de lidar com estímulos através de adaptações fisiológicas e morfológicas. Assim, novos estados estacionários são alcançados, preservando da viabilidade da célula. Se os limites de resposta a um estímulo adaptativo é ultrapassado, ou quando a célula é exposta a um agente prejudicial ou stress, desencadeia uma sequência de eventos chamada lesão celular. Lesão celular é reversível até um certo ponto, mas se o estímulo persiste ou é suficientemente grave desde o início, a célula atinge um "ponto de não retorno" e sofre lesão celular irreversível e, finalmente, a morte celular.

#### Atrofia

Encolhimento no tamanho da célula por perda de substância celular é conhecido como atrofia. Ela representa uma forma de resposta adaptativa e pode culminar em morte celular. Quando um número suficiente de células está envolvido, todo o tecido sofre atrofia. Atrofia pode ser fisiológica ou patológica. As mudanças fundamentais celulares associadas com atrofia são uma diminuição do tamanho celular e manutenção de sua viabilidade. Embora as células atroficas diminuam a função,

elas não estão mortas. Os mecanismos bioquímicos responsáveis pela atrofia afetam o equilíbrio entre a síntese de proteínas e degradação. O aumento da degradação de proteínas provavelmente desempenha um papel-chave na atrofia. Hidrolases ácidas (por exemplo, catepsinas), assim como a via da ubiquitina-proteassoma degradam proteínas citosólicas e nucleares. Em muitas situações, atrofia também é acompanhada por um aumento acentuado no número de vacúolos autofágicos (Cotran et al., 2007).

Atrofia é uma resposta adaptativa ativa e específica, e não é uma desconexão passiva de processos celulares. Além disso, é reversível, e a restauração do meio ambiente que existia antes de atrofia permite que as células voltem ao seu tamanho e função normais (Rubins, 2011).

## Necrose

Células lesadas irreversivelmente invariavelmente sofrem alterações morfológicas que são reconhecidos como a morte celular. Existem dois tipos de necrose celular, morte e apoptose, que diferem na sua morfologia e mecanismos. Quando a lesão das membranas é grave, enzimas lisossomais entram no citoplasma e digerem a célula, e os conteúdos celulares vazam, resultando em necrose. Alguns estímulos nocivos, especialmente aqueles que danificam o DNA, induzem um outro tipo de morte, a apoptose, a qual é caracterizada por dissolução nuclear sem perda completa da integridade da membrana. Considerando que a necrose é sempre um processo patológico, a apoptose não está necessariamente associada a lesão celular. Necrose refere-se a um espectro de alterações morfológicas resultante da ação de enzimas de degradação progressiva na célula letalmente ferida. A aparência morfológica de necrose é o resultado da desnaturação de proteínas intracelulares e digestão enzimática da célula. As enzimas são derivados a partir dos lisossomas das próprias células mortas ou a partir dos lisossomas de leucócitos imigrantes, durante as reações inflamatórias (Cotran et al., 2007).

A necrose é caracterizada por inchaço celular e de suas organelas, a depleção de ATP, o aumento da permeabilidade da membrana plasmática perda de macromoléculas e morte celular. Os estímulos que levam a necrose são altamente variáveis e produzem diversos e reconhecíveis padrões histológicos e citológicos. A

necrose coagulativa é um termo que se refere a leves alterações morfológicas nas células mortas, onde o seu contorno é mantido. Quando corado com hematoxilina e eosina, o citoplasma de uma célula necrótica é mais eosinofílica do que o habitual. O núcleo se torna menor, fragmentado e perde a coloração da cromatina. A aparência de tecido necrótico é descrita como necrose de coagulação por causa de sua semelhança com coagulação das proteínas que ocorrem após aquecimento. Embora este termo é baseado em conceitos obsoletos, continua a ser útil como uma descrição morfológica (Rubins, 2011).

#### Citoqueratina 14

Citoqueratinas formam os filamentos intermediários tanto nas células epiteliais queratinizadas quanto nas não queratinizadas. Células epiteliais diferenciadas podem ser distinguidas pela sua expressão de diferentes tipos de citoqueratina. Queratinas (citoqueratinas) são representadas por duas classes, tipo I e tipo II, e para formarem os filamentos intermediários sempre são necessários uma citoqueratina de cada classe, formando pares (Moll et al. 1982; Sun et al. 1984). A coloração de tecidos humanos normais com anticorpos específicos para a queratina mostrou que o epitélio é subdividido em compartimentos de diferenciação distintas. (Franke et al 1980; Asch. et al 1981. Lane et al. 1985; Knapp et al. 1987). A maioria dos epitélios consistem em múltiplos tipos celulares pela sua expressão de queratina. A citoqueratina 14 é expressa em todos os queratinócitos (Nelson e Sun, 1983). Dois tipos de células também são distinguíveis no epitélio glandular: células basais ultraestruturalmente distinta (mioepitelial) e células luminiais (secretora) dos ductos (Moll et al.1982). As células basais de um epitélio glandular, na interface com o mesênquima e separados a partir dele apenas pela lâmina basal, são geralmente populações de células progenitoras desse tecido. Essas células provavelmente são responsáveis pelo turnover celular do epitélio, onde a perda de células é compensada pela produção de novas células (Potten, 1979). Qualquer célula situada na interface de dois tecidos deve ser capaz de transmitir sinais físicos e químicos de um tecido para o outro. No mesênquima estão circulando fatores de crescimento e hormônios que irão se ligar em membranas de células basais (Purkis et al., 1990).

### 3. Material e método

O presente estudo experimental foi aprovado pelo CEA número 100. Para as amostras foram coletadas 20 glândulas, sendo 10 glândulas submandibulares controle e 10 glândulas submandibulares teste de 10 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) Nova Zelândia machos, albinos, com peso entre 2.200 e 3.000 gramas e aproximadamente 90 dias de vida. Os animais utilizados foram mantidos em condições sanitárias de biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). Os coelhos eram clinicamente sadios e foram submetidos a controle de ectoparasitas e endoparasitas. Todos os animais foram identificados por numeração e acomodados individualmente em gaiolas plásticas com grade metálica superior e chão de serragem. As gaiolas eram diariamente higienizadas e mantidas em temperatura ambiente de 23°C, no intuito de diminuir riscos de contaminação e infecções. Água e ração foram fornecidos *ad libitum*. Os animais foram anestesiados e mantidos vivos para a retirada das glândulas e depois de finalizada a cirurgia era aumentada a dose para induzir a morte dos animais. A morte dos animais foi conduzida por injeção letal de tiopental sódico via peritoneal no Laboratório de Cirurgia Experimental da Disciplina de Técnica Operatória da PUCPR. Os animais foram contidos em sacos especiais, segundo os critérios de controle de zoonoses estabelecidos pela Vigilância Sanitária. As glândulas salivares submandibulares foram cortadas com lâminas de bisturi em fragmentos de cerca de 10 x 10 x 10 mm (Anexo 1).

#### 3.1 Amostra

Grupo Controle : de 5 animais foram retiradas as 10 glândulas salivares submandibulares, depositadas em recipiente com formol a 10% e enviadas ao laboratório de Patologia Experimental para o processamento histológico

Grupo Teste: de 5 animais foram retiradas 10 glândulas salivares submandibulares e aplicado o método de criopreservação descrito a seguir.

### **3.2 Método de criopreservação**

As glândulas (Grupo Teste) foram colocadas em recipientes estéreis com solução nutriente previamente formulada (RPMI 1640 + soro autólogo) a 4°C, armazenadas no gelo e encaminhadas ao Laboratório de Engenharia Molecular da PUCPR. Após, foi inserido 1 fragmento de 10mm de cada espécime em criotubo estéril preenchido por 1,5mL de meio de criopreservação preparado previamente com uma mistura de 20% (em volume) de soro autólogo, 20% de dimetil sulfóxido (crioprotetor) e 80% de RPMI-1640 e transportados para um refrigerador (Fanen-Modelo 349) a uma temperatura de -20°C (Anexo 2).

Baseado no método descrito por Moffett & Suliburk (2011) o processo foi lento e gradual. Primeiramente os criotubos foram colocados em refrigeradores (Fanen-Modelo 349) que atingem até -20°C, sendo retirados depois de 30 minutos. Em sequência, os criotubos foram armazenados em refrigeradores (Fanen-Modelo 349) que alcançam -40°C, onde ficaram por 1 hora. Logo após, os criotubos foram armazenados em um refrigerador de -80°C (Fanen-Modelo 456), onde permaneceram por 24 horas. Ao término deste congelamento, as glândulas foram transferidas para congeladores de estocagem com nitrogênio líquido (Sanyo, modelo ultra-low temperature freezer - MDF-1), chegando a -152°C. Após 30 dias, 4 glândulas conservadas por criopreservação foram descongeladas e após 60 dias 6 glândulas foram descongeladas.

### **3.3 Método de descongelamento**

O processo de descongelação nunca foi realizado em glândulas salivares. Foi utilizado o método padronizado para as glândulas paratireóides, descongelando as 10 amostras de forma rápida. As primeiras 4 amostras foram retiradas em 30 dias e descongeladas com soro fisiológico em banho-maria a 37°C, com agitação constante até completamente descongelado. As amostras de tecidos foram lavadas com RPMI 1640 (Ginco®) e 10% de soro fisiológico três vezes para remover o dimetil sulfóxido (Lgc®) a 37°C durante 10 minutos (Tanaka et al., 1996; Caccitolo et al., 1997; Guerrero, 2010; Moffett & Suliburk, 2011).

O descongelamento das outras 6 glândulas foi feito em 60 dias com soro fisiológico em banho-maria com a temperatura de 30-32 °C durante 1 minuto, seguido de diluição gradual do crioprotetor com solução de RPMI 1640 e 10% de soro fisiológico três vezes entre 30-32 °C durante 1 minuto. O protocolo foi modificado na tentativa de aprimoramento da técnica. As peças são fixadas em formol 10% e levadas ao laboratório de patologia para estudo histológico onde foram processadas e emblocadas em parafina, a partir dos quais foram obtidos cortes que foram corados por hematoxilina e eosina.

### **3.4 Modelo experimental**

As peças foram organizadas da seguinte forma:

Grupo Controle - 10 glândulas submandibulares de controle imediatamente fixadas em formol (Submandibular Controle)

Grupo Teste- 4 glândulas submandibulares congeladas e descongeladas após 30 dias e 6 glândulas submandibulares congeladas e descongeladas em 60 dias.

### **3.5 Análise morfológica**

A análise histopatológico foi realizado por um único observador com um microscópio óptico Olympus BX 50 em aumento de 400x. A análise foi baseada em critérios estabelecidos por Azevedo et. al. (2003, 2005), Sá (2009) e Nery et. al. (2010).

Os seguintes aspectos microscópicos foram analisados:

Integridade celular de ácinos serosos, com células acinares em “forma de pêra” com membrana bem definida, citoplasma basofílico e granulado e núcleo central e integridade celular de ácinos mucosos, formados por células piramidais com núcleos esféricos na porção basal e citoplasma claro ( Martinez-Madrugal & Micheau, 1989) (Figura 1).

Integridade de ductos estriados e intercalares, com os ductos intercalares apresentando única camada de epitélio cuboidal e o ducto estriado apresentando epitélio pseudoestratificado colunar simples formado por células prismáticas altas

(Figura 5) ( Martinez-Madriral & Micheau, 1989). Para fins de análise foram todos agrupados nas categorias ductos.

Necrose, com o borramento dos limites das células, quase sempre com a perda do contorno do ácino onde os núcleos das células acinares ficam soltos (Figura 6) e atrofia acinar com ácinos pequenos e sem grânulos, assemelhando-se a ductos (Figura 6) (SÁ, 2009). Critérios de insucesso foram atribuídos à variável necrose, sendo que a presença deste critério representou a falha da congelação, não sendo estes casos submetidos à análise morfométrica e imunoistoquímica.

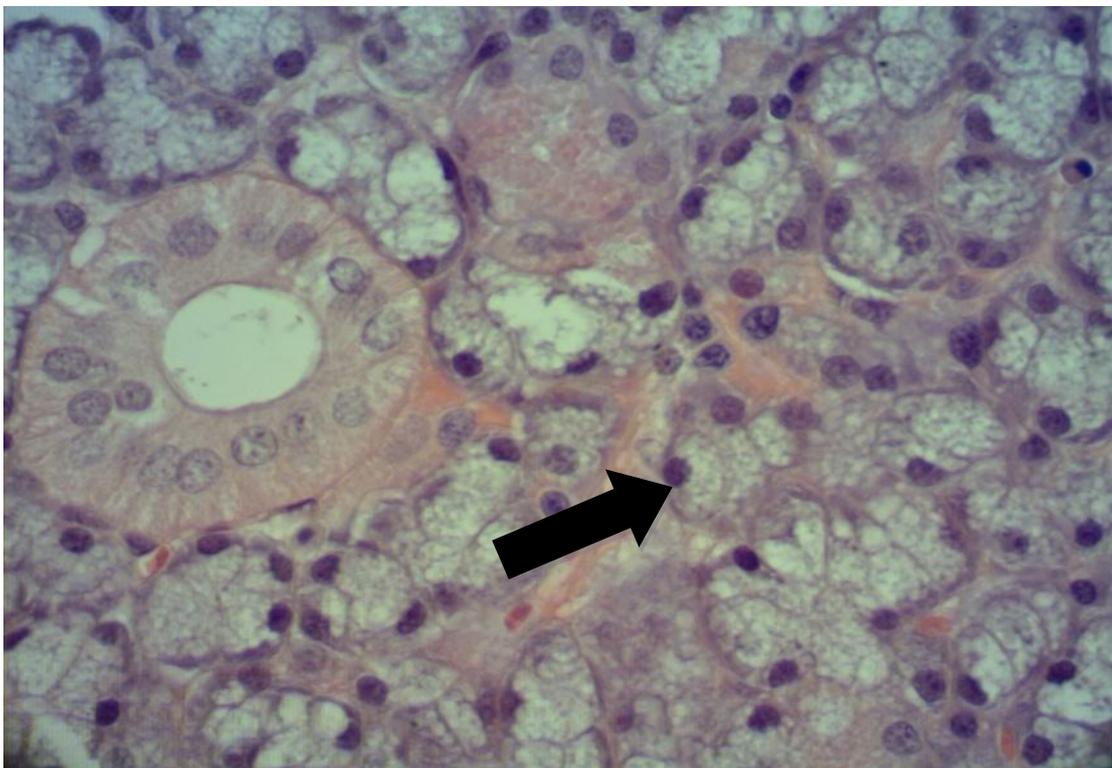


Figura 1- Controle com integridade celular de ácinos mucosos formados por células piramidais com núcleos esféricos na porção basal e citoplasma claro (HE, 400x)

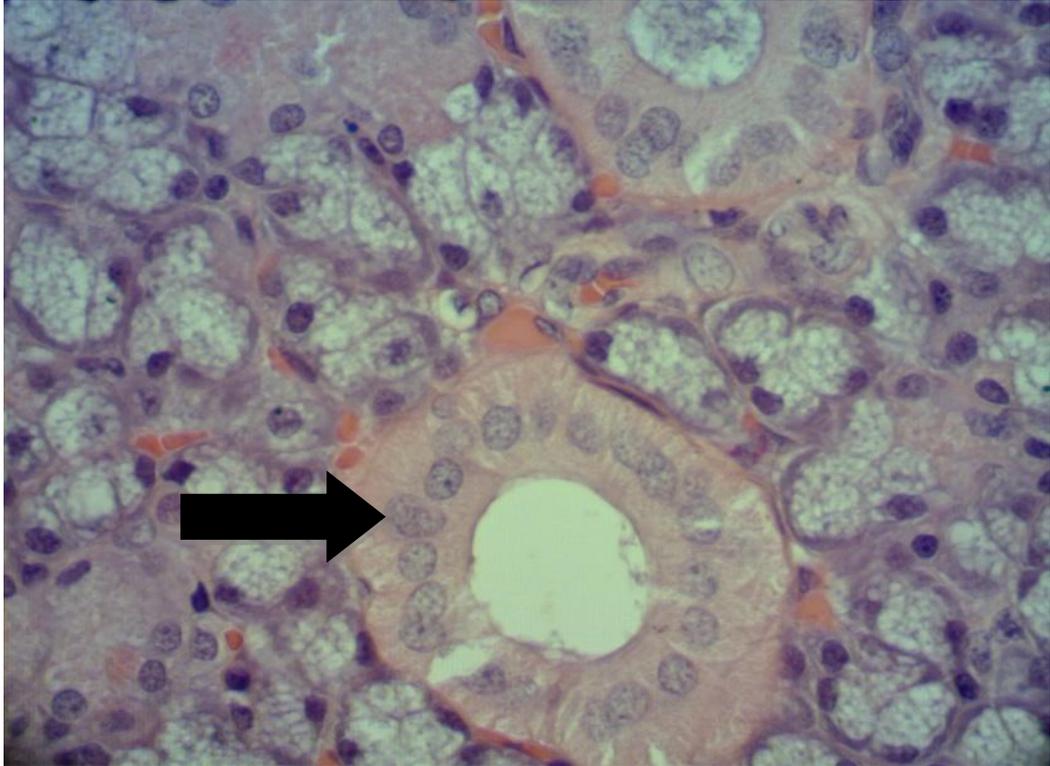


Figura 2- Controle com integridade de ductos, com epitélio pseudoestratificado colunar simples formado por células prismáticas altas. (HE, 400x)

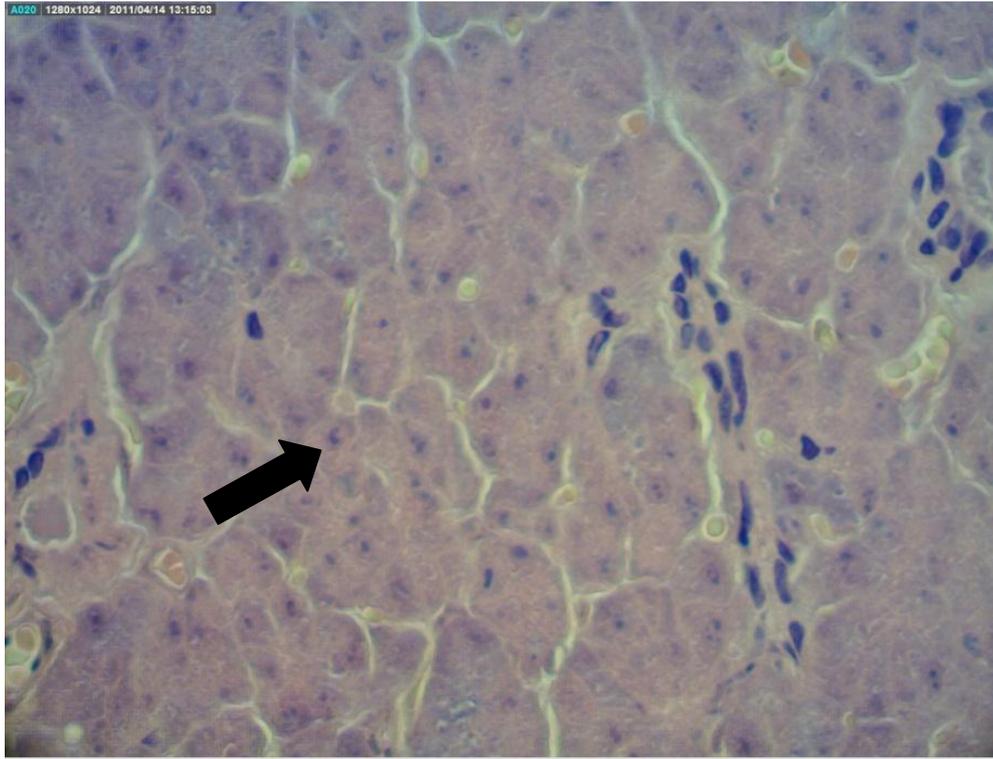


Figura 6- Necrose acinar, com borramento nos limites das células, quase sempre com a perda do contorno do ácino onde os núcleos das células acinares ficam soltos. (HE, 400x)

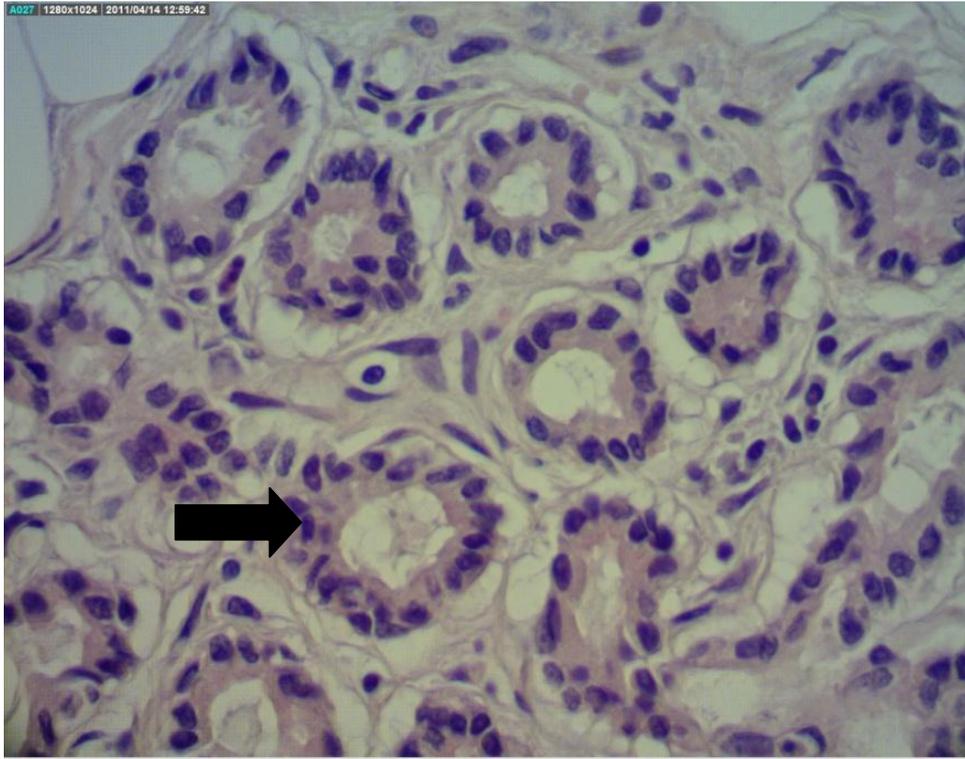


Figura 7- Atrofia acinar, com ácinos pequenos e sem grânulos, assemelhando-se a ductos. (HE, 400x)

### 3.6 Morfometria

A partir de cortes corados por HE, 30 imagens foram aleatoriamente capturadas por uma microcamera Dinolite acoplado a um microscópio óptico (Olympus BX 50) em uma magnificação de 400x. As imagens foram analisadas no programa IMAGE PROPLUS versão 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

Três medições foram feitas: a área total dos ácinos (Figura 8), de estruturas ductais (Figura 9) e o número de núcleos acinares numa área retangular de 191943.2 $\mu\text{m}^2$  (Figura 10). Esta metodologia foi baseada em estudos de Ellies et.al. (1999) e Teymoortash et. al. (2007).

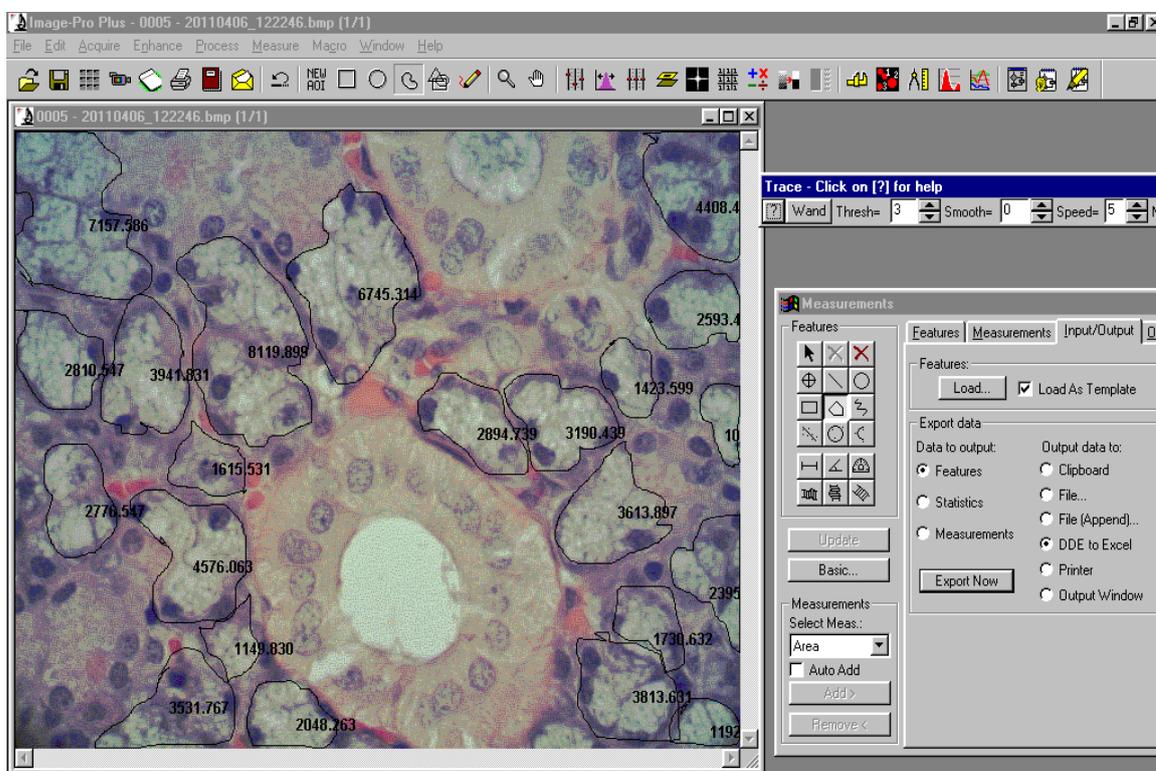


Figura 8- Janela do Image proplus mostrando a delimitação das áreas dos ácinos

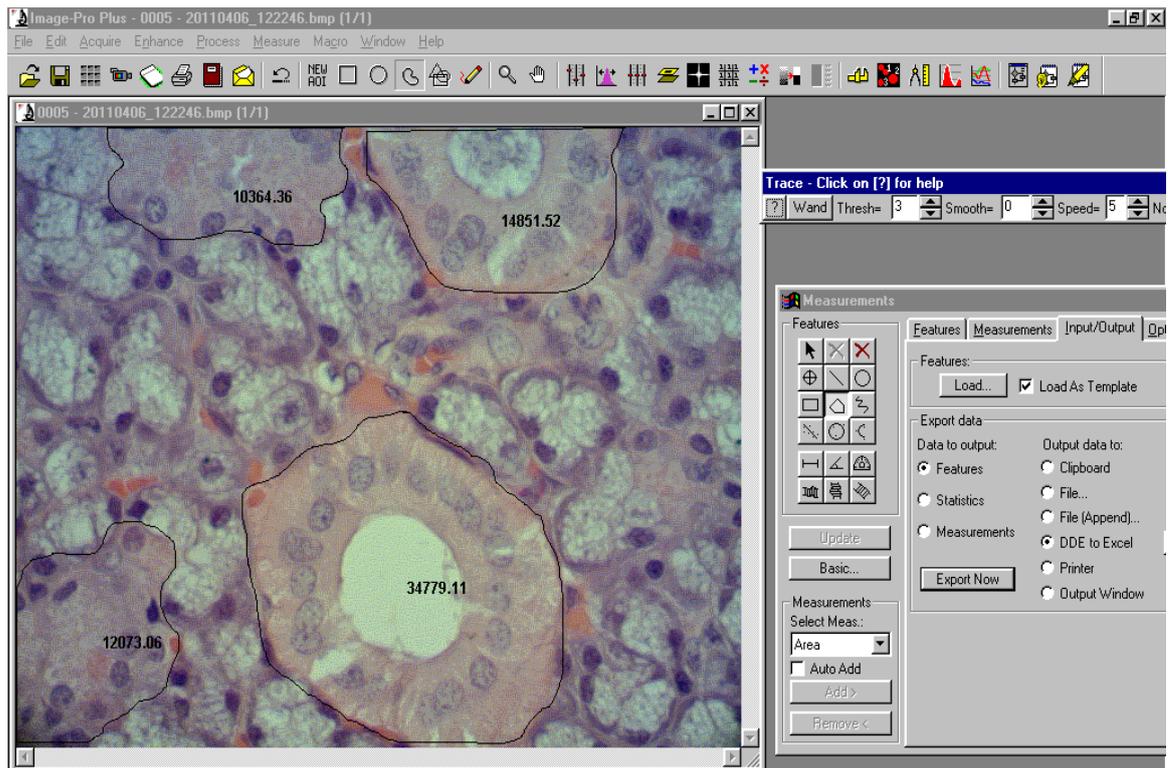


Figura 9- Janela do Image proplus mostrando a delimitação das áreas dos ductos

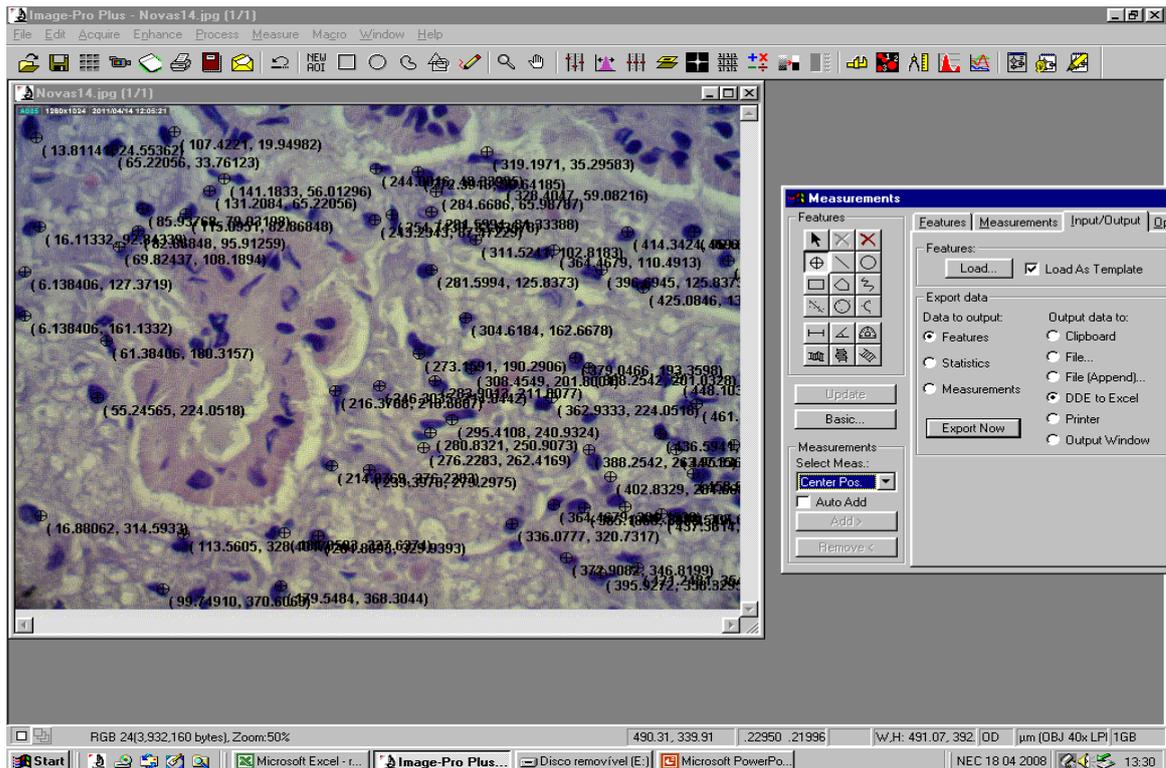


Figura 10- Janela do Image proplus mostrando a contagem do números de núcleos em ácidos

### 3.7 Método Estatístico

Os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade de variâncias de Levene segundo grupos e o teste T para amostras independentes para comparação de médias.

### 3.8 Estudo Imunoistoquímico

O Protocolo Imunohistoquímica PUCPR:

Kit Advance (Dako®)

- 1.0 – Controles: Lesão de pele e glândulas submandibulares normais
- 1.1 – Humano: sempre usar (prova a eficiência do anticorpo)
- 1.2 – Específico do animal (prova reatividade do material)
- 1.3 – Negativo: sempre usar (possível reação inespecífica: não recebe anticorpo)
- 2.0 – Secagem das lâminas overnight: 37° C
- 3.0 – Desparafinização: usar xilol em temperatura ambiente (2x 10 min); álcool etílico absoluto (3x 1 min); álcool etílico 80% (1x 1 min)
- 4.0 - Bloqueio da peroxidase endógena: solução de peróxido de hidrogênio e metanol 5% (diluir o peróxido em metanol). Lavar em água destilada.
- 5.0 – Recuperação antigênica: Levar as lâminas mergulhadas em recuperador Imuno Retrifer (Dako®) à cuba de banho-maria à 99° C por 40 min. Após, deixar esfriar à temperatura ambiente.
- 6.0 – Lavar em água destilada, e riscar lâmina por lâmina com caneta hidrofóbica Dako pen (Dako®), delimitando a área do corte. Até pingar as alíquotas deixar em tampão TBS tris pH 7.3, evitando a secagem do corte.
- 7.0 – Pingar as alíquotas de anticorpos e levar em câmara úmida à geladeira overnight.
- 8.0 – Lavar as lâminas em tampão TBS tris pH 7.3 e deixar no tampão por 15 min.
- 9.0 – Lavar novamente em tampão, secar e pingar Advance link (Dako®) e deixar por 30 min.
- 10.0 – Lavar em tampão e pingar Advance enzyme (Dako®) e deixar por 30 min.

11.0 – Lavar em tampão, secar e pingar cromógeno DAB (1:1) até a visualização da cor castanha e lavar rápido em água destilada.

12.0 – Contracorar com Hematoxilina de Harris por 5 min. Lavar em água da torneira e deixar por 5 min.

12.0 – Desidratar com álcool etílico absoluto (3x 1 min.)

13.0 – Diafanizar com xilol (3 x 5 min). Montar

Neste estudo foi utilizada a citoqueratina 14 (CK14, clone LL002, diluição 1:100, DBS, Pleasanton, California, EUA), também conhecida como citoqueratina basal, expressa em células basais do epitélio (Figura 14), células mioepiteliais da mama e salivares, células basais de ductos das glândulas salivares e glândulas sudoríparas, corpúsculos de Hassall do timo, glândulas paratireóides, bainha do folículo e glândulas sebáceas (Chu & Weiss, 2002). As lâminas foram submetidas a imunistoquímica considerando positivas as células coradas pela cor marrom.

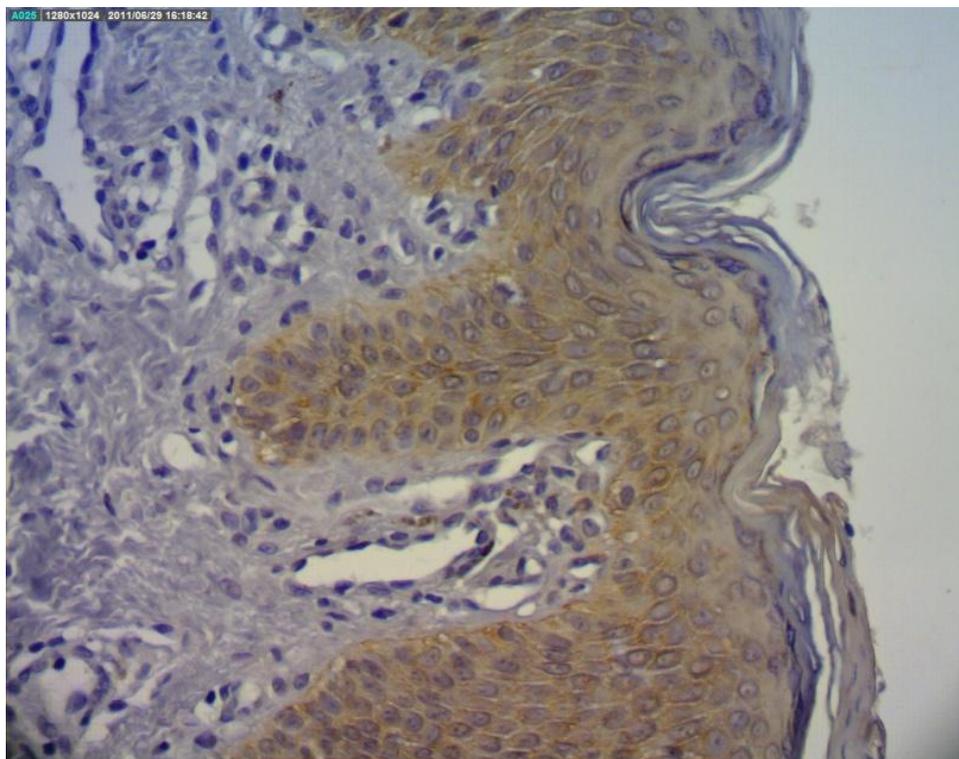


Figura 11-Controle- lesão de pele humana

## 4. Resultados

### 4.1 Análise morfológica

As primeiras glândulas quatro (4) glândulas submandibulares descongeladas revelaram alterações significativas comparadas com as de controle. Nas quatro (4) amostras a estrutura nuclear e o citoplasma apareceram completamente indistintos e a membrana desintegrada, caracterizando a ausência de integridade dos ácinos e ductos (Figura 12).

Todas essas características citadas foram consideradas pelo avaliador como necrose e estas amostras não foram submetidas ao exame morfométrico nem imunohistoquímico.

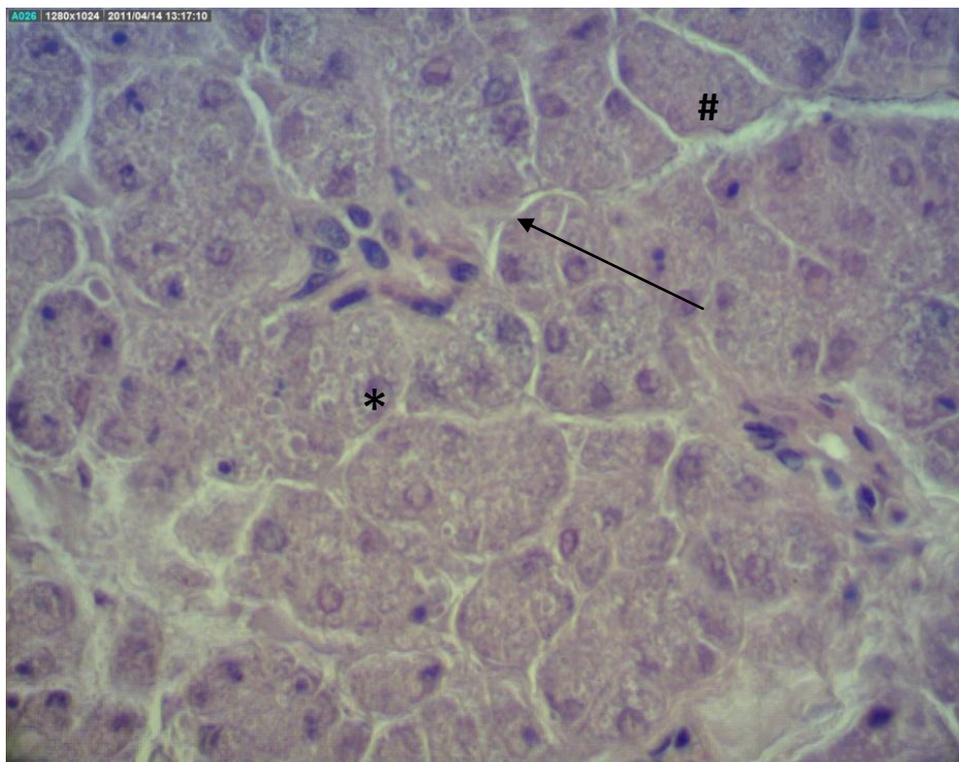


Figura 12- Ácinos submandibulares com citoplasma desorganizado (\*), núcleos indistinguíveis (#) e membrana sem delimitação (flecha). Necrose acinar

Após 60 dias, as outras 6 amostras do grupo teste foram descongeladas com o protocolo modificado. Todas estas glândulas apresentaram integridade de ácinos, de ductos e núcleos distintos (Figura 13). Estas 6 glândulas submandibulares foram analisadas morfometricamente e imunoistoquimicamente.

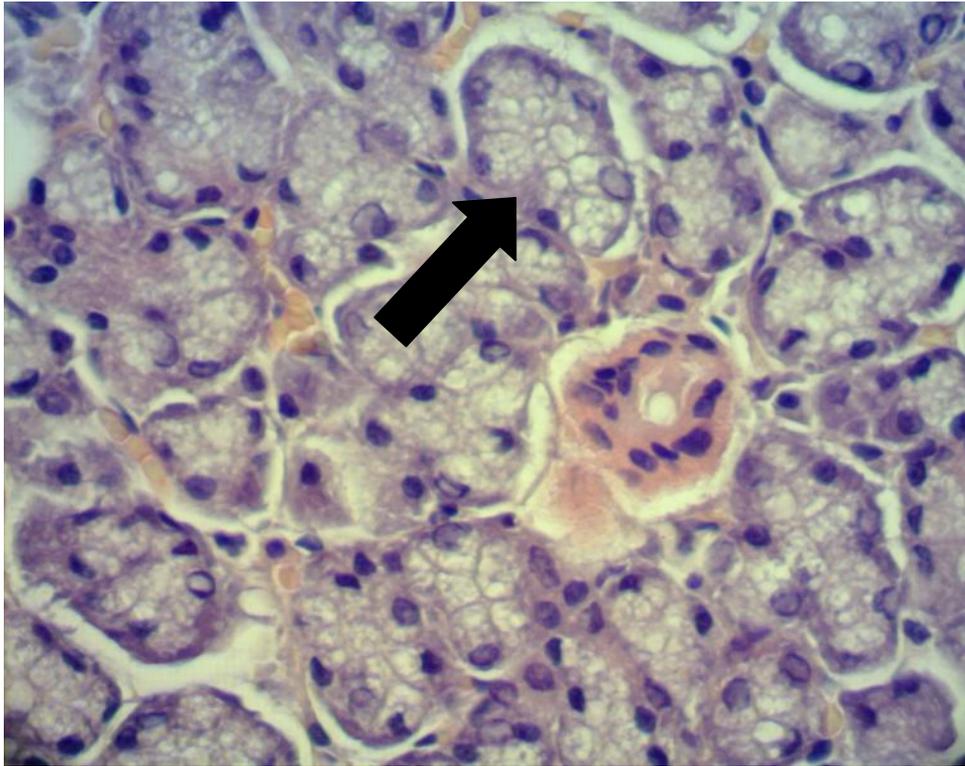


Figura 13- Ácinos Submandibulares volumosos, bem delimitadas, com citoplasma abundante e com núcleo de perfil elíptico

#### 4.2 Análise morfométrica

Tabela estatística da comparação de médias nas áreas de ácinos, de ductos e número de núcleos . O Valor  $p < 0,05$  indica diferença nos valores médios da variável segundo grupo.

Variável	Grupo	Campos	Médias	t-test
				Valor p
Área de ácinos	Glândulas Controle	180	131.442	0,04857
	Glândulas Teste	180	127.283	
Área de ductos	Glândulas Controle	180	34.870	0,00000
	Glândulas Teste	180	23.039	
Número de núcleos	Glândula Controle	180	81,80	0,49610
	Teste / Glândula Congelada	180	82,73	

#### 4.3 Análise Imunoistoquímica

As glândulas salivares amostrais foram positivas para CK 14. As células mioepiteliais foram coradas em todas as glândulas comparadas com o controle (Figura 14) . A coloração das células acinares foi ausente. A maioria das células basais do ducto também foram coradas comparadas com a de controle (Figura 15)

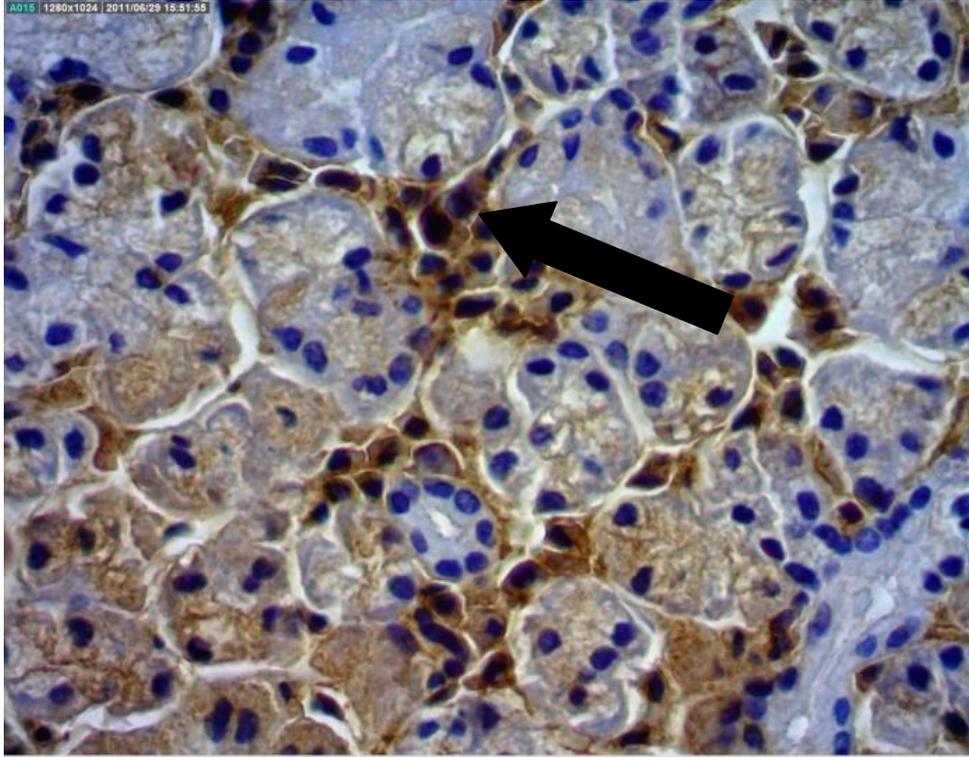


Figura 14- Marcação positiva foi observado para células mioepiteliais (flecha)

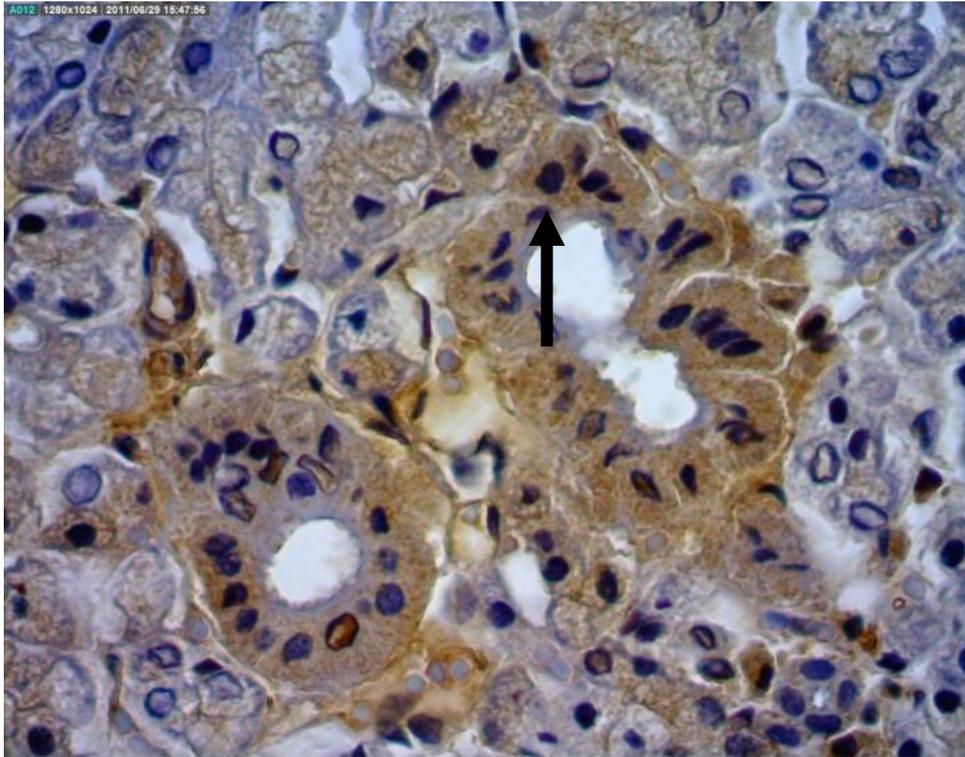


Figura 15- Marcação positiva foi observado para células ductais (flecha)

## 5. Discussão

A criopreservação de tecidos é estudada há muito tempo. No entanto, a capacidade de congelar tecido de forma viável e confiável é uma meta desafiadora. A criopreservação envolve o benefício da hipotermia, que reduz o metabolismo celular e evita sua degeneração. Mas o processo não é inócuo. Diferentes métodos e protocolos são usados para criopreservar células ou tecidos com diferentes soluções de criopreservação (Pegg, 2002).

Este é o primeiro estudo que verificou um método de congelação para as glândulas salivares, onde foi baseado em estudos de criopreservação de glândulas paratireóides. Foram testados dois protocolos de descongelação, sendo um desfavorável e outro favorável.

Nas primeiras 4 amostras retiradas do nitrogênio depois de 30 dias, utilizou-se o método idêntico de criopreservação de paratireóides mostrado em estudos de Wagner et al.(1986), Herrera et al. (1992), Tanaka .et. al.(1996), Smeds et al. (1999), Montenegro et al. (2008), Guerrero (2010) e Moffett & Suliburk (2011)

Wagner et al.(1986) avaliaram histologicamente a relação entre células viáveis e células necróticas no tecido criopreservado. Eles demonstraram que 2% a 20% das células se tornaram necróticas após criopreservação. O mesmo grupo sugeriu que o processo de criopreservação determina graus variáveis de dano celular e o replante de tecido criopreservado necessitaria de maior quantidade de tecido para compensar essa perda celular (Wagner et al.,1986).

Herrera et al. (1992) avaliaram in-vitro a viabilidade celular por uma técnica de fluorescência e de secreção do hormônio da paratireóide e encontraram células viáveis superior a 88%. Não foi observada diferença significativa na comportamento secreção entre tecido fresco e criopreservados.

Para Tanaka et. al.(1996), o exame histológico de rotina indicou que a arquitetura da paratireóide foi preservada após a descongelação, e que não houve diferença histológica no tecido. A técnica de criopreservação / descongelação e transplante de tecido de paratireóide produziu uma taxa de sucesso de 75%.

Smeds et al. (1999) analisaram o tecido de paratireóide humano xenotransplantado após a criopreservação. A morfologia do tecido transplantado foi comparado ao do tecido original após o descongelamento e tecido viável foi observada em 20 dos 26 camundongos (77%).

Montenegro et al. (2008), analisaram histologicamente 15 paratireóides criopreservadas. A necrose foi achada em dois casos. Em 13 pacientes, o tecido implantado era normal à microscopia óptica.

Todos estes autores previamente citados utilizaram da mesma técnica de criopreservação das glândulas, descrito recentemente em artigo de revisão por Moffett & Suliburk (2011), o qual ressalta que a criopreservação pode afetar a capacidade de tecido de revascularizar e regenerar, levando a menores taxas de sucesso. Criopreservação também pode causar necrose dos tecidos (Moffett & Suliburk, 2011).

Na análise morfológica das primeiras 4 submandibulares descongeladas, já se observou problemas neste método, e a necrose nestas células se mostrou presente em todas as amostras. As alterações morfológicas descritas por Cotran et al.(2007) e Rubins (2011) como a morte celular foram facilmente reconhecidos nestas amostras. A análise morfológica revelou o contorno e a membrana celular mantida. O citoplasma é mais eosinofílico e núcleo menor e menos corado.

Visto isso, foi feita uma mudança na técnica de descongelação, tendo como hipótese que a temperatura de 37°C durante 10 minutos era muito elevada para aquela pequena quantidade de tecido glandular. As glândulas apresentavam lesões celulares que resultavam em necrose devido à temperatura de descongelação e este provavelmente era um ponto falho no método, que deveria ser corrigido para o restante das glândulas.

De maneira experimental, o descongelamento das outras 6 glândulas congeladas por 60 dias em nitrogênio foi realizado com soro fisiológico com a temperatura de 30-32 °C durante 1 minuto, Isto evitou a exposição demasiada da glândula às altas temperaturas do descongelamento.

Estas glândulas já apresentavam, ao microscópio óptico, células com uma evidente diferença estrutural comparadas com as anteriores, com limites bem definidos e núcleos bem visíveis. Estas 6 glândulas foram submetidas aos testes morfométricos e imunoistoquímicos.

De acordo com os resultados morfométricos, foram observados diferenças estatisticamente significativas nas áreas dos ácinos ( $p=0,04857$ ) e ductos ( $p=0,0000$ ) das glândulas criopreservadas comparadas com as de controle. O teste morfométrico neste estudo piloto demonstra que tanto as células acinares quanto os ductos criopreservadas possuem áreas menores comparadas com glândulas normais, sofrendo atrofia. O número de núcleos por campo não apresentou diferenças entre os grupos teste e controle, possivelmente por não existir um aumento no número de células acinares com o processo de congelação.

Segundo Rubins (2011), a atrofia é uma resposta adaptativa ativa e específica. No caso da técnica modificada de criopreservação, a exposição à baixas temperaturas aos ácinos provocou uma resposta adaptativa, diminuindo seu tamanho e função. Importante ressaltar que a atrofia é um processo reversível por definição (Cotran et al. ,2007 & Rubins ,2011) e sugere-se que reimplante destas glândulas, em condições semelhantes às que foram retiradas, permita que as células voltem ao seu tamanho e função normais.

Sendo o primeiro estudo que aplica um método de criopreservação em glândulas salivares submandibulares, não existem resultados anteriores para comparar estes resultados e mais estudos semelhantes com amostras maiores são necessários para confirmar estes achados.

A reatividade pela CK14 nas glândulas amostrais foi positiva em todos os casos. As células mioepiteliais foram coradas em todas as glândulas. A coloração das células acinares foi ausente. A maioria das células basais do ducto também foi corada. Este processo indica que estas proteínas estão estruturalmente preservadas, mesmo após submetidas ao processo de criopreservação.

Potten (1979) já afirmou que as células basais do epitélio são de fundamental importância no turnover celular, repondo as células perdidas e Purkis et al(1990)

ressaltou a importância das células basais no equilíbrio do tecido, pois possuem receptores de fatores de crescimento e estímulos hormonais. A criopreservação das células mioepiteliais e do ducto é importante, pois estas células podem ser uma fonte de proliferação celular das glândulas após o reimplante e também podem restabelecer o equilíbrio entre o mesênquima e os ácinos.

## **6. Conclusão**

Considerando os limites da metodologia utilizada no presente trabalho, parece lícito concluir que:

1. As glândulas salivares submandibulares submetidas à criopreservação pela técnica padrão para PT apresentaram alterações morfológicas (necrose) sugestivas de comprometimento da sua viabilidade, por tratar-se de condição irreversível.
2. As glândulas salivares submandibulares submetidas à criopreservação pela técnica modificada apresentaram alterações morfológicas e morfométricas (atrofia), condições compatíveis com manutenção da normalidade.
3. As glândulas salivares submandibulares submetidas à criopreservação com a técnica modificada apresentaram reatividade imunoistoquímica à CK 14 semelhante às glândulas submandibulares normais, condição compatível com manutenção da normalidade.

## 7. Referências

Azevedo LR. Alterações microscópicas com a idade em glândulas sublinguais humanas. Estudo post mortem. 102 f. Tese (Doutorado em Estomatologia). Universidade de São Paulo: Faculdade de Odontologia de Bauru; 2003.

Azevedo LR, Damante JH, Lara VS, Lauris JR. Age-related changes in human sublingual glands: a post mortem study. *Arch Oral Biol*. 2005 Jun;50(6):565-74. Epub 2005 Jan 7. PubMed PMID: 15848150.

Baykul T, Yilmaz HH, Aydin U, Aydin MA, Aksoy M, Yildirim D. Early diagnosis of oral cancer. *J Int Med Res*. 2010 May-Jun;38(3):737-49. Review. PubMed PMID: 20819411.

Beeken L, Calman F. A return to "normal eating" after curative treatment for oral cancer. What are the long-term prospects? *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1994 Nov;30B(6):387-92. PubMed PMID: 7719222.

Björnström M, Axéll T, Birkhed D. Comparison between saliva stimulants and saliva substitutes in patients with symptoms related to dry mouth. A multi-centre study. *Swed Dent J*. 1990;14(4):153-61. PubMed PMID: 2147787.

Braam PM, Roesink JM, Moerland MA, Raaijmakers CP, Schipper M, Terhaard CH. Long-term parotid gland function after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005 Jul 1;62(3):659-64. PubMed PMID: 15936542.

Caccitolo JA, Farley DR, van Heerden JA, Grant CS, Thompson GB, Sterioff S. The current role of parathyroid cryopreservation and autotransplantation in parathyroid surgery: an institutional experience. *Surgery*. 1997 Dec;122(6):1062-7. PubMed PMID: 9426420.

Chambers MS, Garden AS, Kies MS, Martin JW. Radiation-induced xerostomia in patients with head and neck cancer: pathogenesis, impact on quality of life, and management. *Head Neck*. 2004 Sep;26(9):796-807. Review. PubMed PMID: 15350026.

Chen SC, Liao CT, Chang JT. Orofacial pain and predictors in oral squamous cell carcinoma patients receiving treatment. *Oral Oncol*. 2011 Feb;47(2):131-5. Epub 2010 Dec 13. PubMed PMID: 21147547.

Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology*. 2002 May;40(5):403-39. Review. PubMed PMID: 12010363.

Cohen MS, Dilley WG, Wells SA Jr, Moley JF, Doherty GM, Sicard GA, Skinner MA, Norton JA, DeBenedetti MK, Lairmore TC. Long-term functionality of cryopreserved parathyroid autografts: a 13-year prospective analysis. *Surgery*. 2005 Dec;138(6):1033-40; discussion 1040-1. PubMed PMID: 16360388.

Cooper JS, Ang KK. Concomitant chemotherapy and radiation therapy certainly improves local control. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005 Jan 1;61(1):7-9. PubMed PMID: 15629587.

Coppes RP, Vissink A, Konings AW. Comparison of radiosensitivity of rat parotid and submandibular glands after different radiation schedules. *Radiother Oncol*. 2002 Jun;63(3):321-8. PubMed PMID: 12142096.

Coppes RP, Zeilstra LJ, Kampinga HH, Konings AW. Early to late sparing of radiation damage to the parotid gland by adrenergic and muscarinic receptor agonists. *Br J Cancer*. 2001 Sep 28;85(7):1055-63. PubMed PMID: 11592779; PubMed Central PMCID: PMC2375094.

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Pathologic Basis of Disease*. 7th Edition. Philadelphia: Saunders, 2007.

Dirix P, Nuyts S, Van den Bogaert W. Radiation-induced xerostomia in patients with head and neck cancer: a literature review. *Cancer*. 2006 Dec 1;107(11):2525-34. Review. PubMed PMID: 17078052

Ellies M, Laskawi R, Götz W, Arglebe C, Tormählen G. Immunohistochemical and morphometric investigations of the influence of botulinum toxin on the submandibular gland of the rat. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1999;256(3):148-52. PubMed PMID: 10234485.

Eisbruch A, Ten Haken RK, Kim HM, Marsh LH, Ship JA. Dose, volume, and function relationships in parotid salivary glands following conformal and intensity-modulated irradiation of head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1999 Oct 1;45(3):577-87. PubMed PMID: 10524409.

Eisbruch A, Terrell JE. The relationships between xerostomia and dysphagia after chemoradiation of head and neck cancer. *Head Neck*. 2003 Dec;25(12):1082; author reply 1082-3. PubMed PMID: 14648868.

Epstein JB, McBride BC, Stevenson-Moore P, Merilees H, Spinelli J. The efficacy of chlorhexidine gel in reduction of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* species in patients treated with radiation therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1991 Feb;71(2):172-8. PubMed PMID: 1900602.

Epstein JB, Emerton S, Kolbinson DA, Le ND, Phillips N, Stevenson-Moore P, Osoba D. Quality of life and oral function following radiotherapy for head and neck cancer. *Head Neck*. 1999 Jan;21(1):1-11. PubMed PMID: 9890345.

Franzén L, Funegård U, Ericson T, Henriksson R. Parotid gland function during and following radiotherapy of malignancies in the head and neck. A consecutive study of salivary flow and patient discomfort. *Eur J Cancer*. 1992;28(2-3):457-62. PubMed PMID: 1591063.

Geerling G, Sieg P, Bastian GO, Laqua H. Transplantation of the autologous

submandibular gland for most severe cases of keratoconjunctivitis sicca. *Ophthalmology*. 1998 Feb;105(2):327-35. PubMed PMID: 9479295.

Geerling G, Collin JR, Dart JK. Ophthalmic experience with submandibular gland transplantation for severe dry eyes. *Laryngoscope*. 2009 Jul;119(7):1445-6. PubMed PMID: 19358208.

Guerrero MA, Evans DB, Lee JE, Bao R, Bereket A, Gantela S, Griffin GD, Perrier ND. Viability of cryopreserved parathyroid tissue: when is continued storage versus disposal indicated? *World J Surg*. 2008 May;32(5):836-9. PubMed PMID: 18228092.

Guerrero MA. Cryopreservation of parathyroid glands. *Int J Endocrinol*. 2010;2010:829540. Epub 2010 Dec 8. PubMed PMID: 21197072; PubMed Central PMCID: PMC3004380.

Gornitsky M, Shenouda G, Sultanem K, Katz H, Hier M, Black M, Velly AM. Double-blind randomized, placebo-controlled study of pilocarpine to salvage salivary gland function during radiotherapy of patients with head and neck cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Jul;98(1):45-52. PubMed PMID: 15243470.

Guchelaar HJ, Vermes A, Meerwaldt JH. Radiation-induced xerostomia: pathophysiology, clinical course and supportive treatment. *Support Care Cancer*. 1997 Jul;5(4):281-8. Review. PubMed PMID: 9257424.

Greer JE, Eltorky M, Robbins KT. A feasibility study of salivary gland autograft transplantation for xerostomia. *Head Neck*. 2000 May;22(3):241-6. PubMed PMID: 10748447.

Hamlar DD, Schuller DE, Gahbauer RA, Buerki RA, Staubus AE, Hall J, Altman JS, Elzinga DJ, Martin MR. Determination of the efficacy of topical oral pilocarpine for postirradiation xerostomia in patients with head and neck carcinoma. *Laryngoscope*. 1996 Aug;106(8):972-6. PubMed PMID: 8699911.

Hamlet S, Faull J, Klein B, Aref A, Fontanesi J, Stachler R, Shamsa F, Jones L, Simpson M. Mastication and swallowing in patients with postirradiation xerostomia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997 Mar 1;37(4):789-96. PubMed PMID:9128953.

Hensley ML, Hagerty KL, Kewalramani T, Green DM, Meropol NJ, Wasserman TH, Cohen GI, Emami B, Gradishar WJ, Mitchell RB, Thigpen JT, Trotti A 3rd, von Hoff D, Schuchter LM. American Society of Clinical Oncology 2008 clinical practice guideline update: use of chemotherapy and radiation therapy protectants. *J Clin Oncol.* 2009 Jan 1;27(1):127-45. Epub 2008 Nov 17. PubMed PMID: 19018081.

Herrera MF, Grant CS, van Heerden JA, Jacobsen D, Weaver A, Fitzpatrick LA. The effect of cryopreservation on cell viability and hormone secretion in human parathyroid tissue. *Surgery.* 1992 Dec;112(6):1096-101; discussion 1101-2. PubMed PMID: 1455311.

Instituto Nacional De Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **Instituto Nacional de Câncer**; 2010. Disponível em [www.inca.gov.br/](http://www.inca.gov.br/)

Jellema AP, Slotman BJ, Muller MJ, Leemans CR, Smeele LE, Hoekman K, Aaronson NK, Langendijk JA. Radiotherapy alone, versus radiotherapy with amifostine 3 times weekly, versus radiotherapy with amifostine 5 times weekly: A prospective randomized study in squamous cell head and neck cancer. *Cancer.* 2006 Aug 1;107(3):544-53. PubMed PMID: 16804929.

Jellema AP, Langendijk H, Bergenhengouwen L, van der Reijden W, Leemans R, Smeele L, Slotman BJ. The efficacy of Xialine in patients with xerostomia resulting from radiotherapy for head and neck cancer: a pilot-study. *Radiother Oncol.* 2001 May;59(2):157-60. PubMed PMID: 11325444.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011 Mar-Apr;61(2):69-90. Epub 2011 Feb 4. Erratum in: *CA Cancer J Clin.* 2011 Mar-Apr;61(2):134. PubMed PMID: 21296855.

Jha N, Seikaly H, Harris J, Williams D, Liu R, McGaw T, Hofmann H, Robinson D, Hanson J, Barnaby P. Prevention of radiation induced xerostomia by surgical transfer of submandibular salivary gland into the submental space. *Radiother Oncol.* 2003 Mar;66(3):283-9. PubMed PMID: 12742268.

Johnson JT, Ferretti GA, Nethery WJ, Valdez IH, Fox PC, Ng D, Muscoplat CC, Gallagher SC. Oral pilocarpine for post-irradiation xerostomia in patients with head and neck cancer. *N Engl J Med.* 1993 Aug 5;329(6):390-5. PubMed PMID: 8326972.

Joyston-Bechal S, Hayes K, Davenport ES, Hardie JM. Caries incidence, mutans streptococci and lactobacilli in irradiated patients during a 12-month preventive programme using chlorhexidine and fluoride. *Caries Res.* 1992;26(5):384-90. PubMed PMID: 1468104.

Keefe DM. Mucositis guidelines: what have they achieved, and where to from here? *Support Care Cancer.* 2006 Jun;14(6):489-91. Epub 2006 Mar 30. Review. PubMed PMID: 16572311.

Kielbassa AM, Hinkelbein W, Hellwig E, Meyer-Lückel H. Radiation-related damage to dentition. *Lancet Oncol.* 2006 Apr;7(4):326-35. Review. PubMed PMID:16574548.

Knapp AC, Renteop M, Schweizer J, Winter H. Three cDNA sequences of mouse type I keratins. Cellular localization of the mRNAs in normal and hyperproliferative tissues. *J. Biol. Chem.* 1987. 262,938-946.

Konings AW, Coppes RP, Vissink A. On the mechanism of salivary gland radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005 Jul 15;62(4):1187-94. Review. Erratum in: *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006 Jan 1;64(1):330. PubMed PMID: 15990024

Kolahi J, Mansourian M. Autotransplantation of cryopreserved minor salivary glands: a new approach for management of radiation-induced xerostomia. *Med Hypotheses.* 2010 Jan;74(1):29-30. Epub 2009 Sep 2. PubMed PMID: 19729251.

Kumar PA, Macleod AM, O'Brien BM, Hickey MJ, Knight KR. Microvascular submandibular gland transfer for the management of xerophthalmia; an experimental study. *Br J Plast Surg.* 1990 Jul;43(4):431-6. PubMed PMID: 1697488.

Lane EB, Babtek J, Purkis PE, Leigh IM. Keratin antigens in differentiating skin. *Intermediate Filaments. Ann. NY Acad Sci.* 1986; 455: 241-268.

LeVeque FG, Montgomery M, Potter D, Zimmer MB, Rieke JW, Steiger BW, Gallagher SC, Muscoplat CC. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-titration study of oral pilocarpine for treatment of radiation-induced xerostomia in head and neck cancer patients. *J Clin Oncol.* 1993 Jun;11(6):1124-31. PubMed PMID: 8501499.

Leibo SP. Cryobiology: preservation of mammalian embryos. *Basic Life Sci.* 1986;37:251-72. PubMed PMID: 3707493.

Logemann JA, Pauloski BR, Rademaker AW, Lazarus CL, Mittal B, Gaziano J, Stachowiak L, MacCracken E, Newman LA. Xerostomia: 12-month changes in saliva

production and its relationship to perception and performance of swallow function, oral intake, and diet after chemoradiation. *Head Neck*. 2003 Jun;25(6):432-7. PubMed PMID: 12784234.

Lombaert IM, Wierenga PK, Kok T, Kampinga HH, deHaan G, Coppes RP. Mobilization of bone marrow stem cells by granulocyte colony-stimulating factor ameliorates radiation-induced damage to salivary glands. *Clin Cancer Res*. 2006 Mar 15;12(6):1804-12. PubMed PMID: 16551865.

Losi-Guembarovski R, Menezes RP, Polisel F, Chaves VN, Kuasne H, Leichsenring A, Maciel ME, Guembarovski AL, Oliveira BW, Ramos G, Mizuno LT, Cavalli IJ, Ribeiro EM, Cólus IM. Oral carcinoma epidemiology in Paraná State, Southern Brazil. *Cad Saude Publica*. 2009 Feb;25(2):393-400. PubMed PMID: 19219247.

MacLeod AM, Robbins SP. Submandibular gland transfer in the correction of dry eye. *Aust N Z J Ophthalmol*. 1992 May;20(2):99-103. PubMed PMID: 1389142.

Makis W, Ciarallo A, Abikhzer G, Rush C, Laufer J, Stern J. Submandibular salivary gland transfer: a pitfall in head and neck imaging with F-18 FDG PET/CT. *Clin Nucl Med*. 2011 Aug;36(8):712-6. PubMed PMID: 21716030.

Maes A, Huygh I, Weltens C, Vandeveld G, Delaere P, Evers G, Van den Bogaert W. De Gustibus: time scale of loss and recovery of tastes caused by radiotherapy. *Radiother Oncol*. 2002 May;63(2):195-201. PubMed PMID: 12063009.

Martinez-Madrigal F, Micheau C. Histology of the major salivary glands. *Am J Surg Pathol*. 1989 Oct;13(10):879-99. Review. PubMed PMID: 2675654.

Mazur P. Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophys.* 1990 Aug;17(1):53-92. Review. PubMed PMID: 1704816.

McHenry CR, Stenger DB, Calandro NK. The effect of cryopreservation on parathyroid cell viability and function. *Am J Surg.* 1997 Nov;174(5):481-4. PubMed PMID: 9374219.

Mekhail TM, Adelstein DJ, Rybicki LA, Larto MA, Saxton JP, Lavertu P. Enteral nutrition during the treatment of head and neck carcinoma: is a percutaneous endoscopic gastrostomy tube preferable to a nasogastric tube? *Cancer.* 2001 May 1;91(9):1785-90. PubMed PMID: 11335904.

Meyer TK, Kuhn JC, Campbell BH, Marbella AM, Myers KB, Layde PM. Speech intelligibility and quality of life in head and neck cancer survivors. *Laryngoscope.* 2004 Nov;114(11):1977-81. PubMed PMID: 15510026.\

Moffett JM, Suliburk J. Parathyroid autotransplantation. *Endocr Pract.* 2011 Mar-Apr;17 Suppl 1:83-9. Review. PubMed PMID: 21324813.

Moll R, Franke WW, Schiller D L. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells.1982. *Cell* 31, 11-24.

Montenegro FLM, Bento GN, Mello ES, Arap SS, Reis LM, Giorgeti F, Silva Filho GB E, Brandão LG, Martin RC, Jorgetti V, Ferraz AR, Cordeiro AC. Normal histology on optical microscopy does not predict cryopreserved parathyroid tissue function. *Rev. bras. cir. cabeça pescoço.* 2008 Oct-Dec;37(4):187-90.

Nagler R, Marmary Y, Fox PC, Baum BJ, Har-El R, Chevion M. Irradiation-induced damage to the salivary glands: the role of redox-active iron and copper. *Radiat Res.* 1997 Apr;147(4):468-76. PubMed PMID: 9092927.

Nelson WG, Sun TT. The 50- and 58-kdalton keratin classes as molecular markers for stratified squamous epithelia: cell culture studies. *J. Cell Biol.* 1983. 97, 244-251.

Nery LR, Moreira CR, Cestari TM, Taga R, Damante JH. Postmortem acinar autolysis in rat sublingual gland: a morphometric study. *J Appl Oral Sci.* 2010 Sep-Oct;18(5):509-14. PubMed PMID: 21085809.

Ow TJ, Myers JN. Current management of advanced resectable oral cavity squamous cell carcinoma. *Clin Exp Otorhinolaryngol.* 2011 Mar;4(1):1-10. Epub 2011 Mar 17. PubMed PMID: 21461056; PubMed Central PMCID: PMC3062220.

Paardekooper GM, Cammelli S, Zeilstra LJ, Coppes RP, Konings AW. Radiation-induced apoptosis in relation to acute impairment of rat salivary gland function. *Int J Radiat Biol.* 1998 Jun;73(6):641-8. PubMed PMID: 9690682

Patel M, Ndlovu NN, Owen CP, Veale R. Properties of a new mouthrinse for patients receiving radiation therapy. *SADJ.* 2010 Oct;65(9):410, 412-4. PubMed PMID: 21180287.

Pegg DE. The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med.* 2002 Feb;20(1):5-13. Review. PubMed PMID: 11941530.

Potten CS. Stem cells and tissue homeostasis. In *Stem Cells.* 1979.317-334.

Purkis PE, Steel JB, Mackenzie IC, Nathrath WB, Leigh IM, Lane EB. Antibody markers of basal cells in complex epithelia. *J Cell Sci.* 1990 Sep;97:39-50. PubMed PMID: 1701769.

Rhodus NL, Moller K, Colby S, Bereuter J. Articulatory speech performance in patients with salivary gland dysfunction: a pilot study. *Quintessence Int.* 1995 Nov;26(11):805-10. PubMed PMID: 8628840.

Rieke JW, Hafermann MD, Johnson JT, LeVeque FG, Iwamoto R, Steiger BW, Muscoplat C, Gallagher SC. Oral pilocarpine for radiation-induced xerostomia: integrated efficacy and safety results from two prospective randomized clinical trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995 Feb 1;31(3):661-9. PubMed PMID: 7852133.

Ringash J, Warde P, Lockwood G, O'Sullivan B, Waldron J, Cummings B. Postradiotherapy quality of life for head-and-neck cancer patients is independent of xerostomia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005 Apr 1;61(5):1403-7. PubMed PMID: 15817343.

Roesink JM, Moerland MA, Battermann JJ, Hordijk GJ, Terhaard CH. Quantitative dose-volume response analysis of changes in parotid gland function after radiotherapy in the head-and-neck region. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001 Nov 15;51(4):938-46. PubMed PMID: 11704314.

Roh JL, Kim AY, Cho MJ. Xerostomia following radiotherapy of the head and neck affects vocal function. *J Clin Oncol.* 2005 May 1;23(13):3016-23. PubMed PMID: 15860858.

Rubin's Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine 6th Edition. Hagerstwon, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2011

Sá JCR. Comparação microscópica de glândulas sublinguais de cadáveres humanos e de pacientes desdentados portadores de tumefações do soalho da boca relacionadas às glândulas sublinguais: estudo morfológico e morfométrico. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Bauru, 2009.

Seikaly H, Jha N, McGaw T, Coulter L, Liu R, Oldring D. Submandibular gland transfer: a new method of preventing radiation-induced xerostomia. *Laryngoscope*. 2001 Feb;111(2):347-52. PubMed PMID: 11210886.

Seikaly H, Jha N, Harris JR, Barnaby P, Liu R, Williams D, McGaw T, Rieger J, Wolfaardt J, Hanson J. Long-term outcomes of submandibular gland transfer for prevention of postradiation xerostomia. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004 Aug;130(8):956-61. PubMed PMID: 15313866.

Shaw JM, Jones GM. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum Reprod Update*. 2003 Nov-Dec;9(6):583-605. Review. PubMed PMID: 14714593.

Geerling G, Sieg P. Transplantation of the major salivary glands. *Dev Ophthalmol*. 2008;41:255-68. Review. PubMed PMID: 18453774.

Smeds S, Trulsson L, Garovoy M, Gumbert M, Clark OH. Survival of human parathyroid tissue xenotransplanted in nude mice after 9 to 55 months' cryopreservation. *APMIS*. 1999 Apr;107(4):445-50. PubMed PMID: 10230701.

Spak CJ, Johnson G, Ekstrand J. Caries incidence, salivary flow rate and efficacy of fluoride gel treatment in irradiated patients. *Caries Res*. 1994;28(5):388-93. PubMed PMID: 8001064.

Spiegel JH, Zhang F, Levin DE, Singer MI, Buncke HJ. Microvascular transplantation of the rat submandibular gland. *Plast Reconstr Surg.* 2000 Nov;106(6):1326-35. PubMed PMID: 11083564.

Spiegel JH, Deschler DG, Cheney ML. Microvascular transplantation and replantation of the rabbit submandibular gland. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001 Aug;127(8):991-6. PubMed PMID: 11493212.

Stewart FA, Van Der Kogel AJ. Volume effects in normal tissues. *Basic clinical radiobiology.* 2002. 3; 42–51.

Sun TT, Eichner R , Scheemer A, Cooper D, Nelson WG, Weiss RA (). Classification, expression and possible mechanisms of evolution of mammalian epithelial keratins: A unifying model. *Cancer Cells.*1984. 169-176.

Tanaka Y, Funahashi H, Imai T, Wada M, Tominaga Y, Mishra SK, Takagi H. Functional and morphometric study of cryopreserved human parathyroid tissue transplanted into nude mice. *World J Surg.* 1996 Jul-Aug;20(6):692-9; discussion 698-9. PubMed PMID: 8662154.

Teymoortash A, Sommer F, Mandic R, Schulz S, Bette M, Aumüller G, Werner JA. Intraglandular application of botulinum toxin leads to structural and functional changes in rat acinar cells. *Br J Pharmacol.* 2007 Sep;152(1):161-7. Epub 2007 Jul 9. PubMed PMID: 17618309; PubMed Central PMCID: PMC1978275.

Trotti A. Toxicity in head and neck cancer: a review of trends and issues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000 Apr 1;47(1):1-12. Review. PubMed PMID: 10758302.

Valdez IH. Radiation-induced salivary dysfunction: clinical course and significance. *Spec Care Dentist*. 1991 Nov-Dec;11(6):252-5. PubMed PMID: 1813995.

Vergeer MR, Doornaert PA, Rietveld DH, Leemans CR, Slotman BJ, Langendijk JA. Intensity-modulated radiotherapy reduces radiation-induced morbidity and improves health-related quality of life: results of a nonrandomized prospective study using a standardized follow-up program. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009 May 1;74(1):1-8. Epub 2008 Dec 26. PubMed PMID: 19111400.

Vissink A, 's-Gravenmade EJ, Ligeon EE, Konings WT. A functional and chemical study of radiation effects on rat parotid and submandibular/sublingual glands. *Radiat Res*. 1990 Dec;124(3):259-65. PubMed PMID: 1702228.

Vissink A, Mitchell JB, Baum BJ, Limesand KH, Jensen SB, Fox PC, Elting LS, Langendijk JA, Coppes RP, Reyland ME. Clinical management of salivary gland hypofunction and xerostomia in head-and-neck cancer patients: successes and barriers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010 Nov 15;78(4):983-91. Review. PubMed PMID: 20970030; PubMed Central PMCID: PMC2964345.

Wagner PK, Rumpelt HJ, Krause U, Rothmund M. The effect of cryopreservation on hormone secretion in vitro and morphology of human parathyroid tissue. *Surgery*. 1986 Mar;99(3):257-64. PubMed PMID: 3952651.

Wasserman TH, Brizel DM, Henke M, Monnier A, Eschwege F, Sauer R, Strnad V. Influence of intravenous amifostine on xerostomia, tumor control, and survival after radiotherapy for head-and-neck cancer: 2-year follow-up of a prospective, randomized, phase III trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005 Nov 15;63(4):985-90. PubMed PMID: 16253773.

Wells SA Jr, Christiansen C. The transplanted parathyroid gland: evaluation of cryopreservation and other environmental factors which affect its function. *Surgery*. 1974 Jan;75(1):49-55. PubMed PMID: 4808722.

## 8.Lista de Tabelas

Variável	Grupo	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Área de ácinos	Controle / Glândula Normal	180	131.442,46	22.832,85	1.701,86	128.084,17	134.800,75	66.834,00	178.225,00
	Teste / Glândula Congelada	180	127.283,07	16.527,42	1.231,88	124.852,19	129.713,94	83.113,00	169.533,00
	Total	360	129.362,76	20.011,94	1.054,72	127.288,55	131.436,97	66.834,00	178.225,00
Área de ductos	Controle / Glândula Normal	180	34.870,86	18.102,64	1.349,29	32.208,29	37.533,42	4.831,00	87.069,00
	Teste / Glândula Congelada	180	23.039,02	14.032,78	1.045,94	20.975,06	25.102,98	937,00	78.836,00
	Total	360	28.954,94	17.224,32	907,80	27.169,66	30.740,22	937,00	87.069,00
Número de núcleos	Controle / Glândula Normal	180	81,80	13,35	1,00	79,84	83,76	53,00	120,00
	Teste / Glândula Congelada	180	82,73	12,63	0,94	80,88	84,59	51,00	122,00
	Total	360	82,27	12,99	0,68	80,92	83,61	51,00	122,00

## 9. Anexos



### PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

NÚCLEO DE BIOÉTICA  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Registro do projeto no CEUA: 100 – 2ª versão

Data do parecer: 15/10/2009

**Título do Projeto:**

Congelamento de glândulas salivares: estudo microscópico em coelhos

**Pesquisador responsável:**

Wilson Denis Martins

**Equipe da Pesquisa:**

Diogo Lenzi Capella

**Instituição:**

PUCPR

**Categoria do Experimento - Categoria C**

Espécie de Animal	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Indet.	90 dias, 2,2 a 3kg	20

O colegiado do CEUA em reunião realizada no dia 29/08/2005, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, o pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder



pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

Lembramos ao senhor pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Curitiba, 15 de outubro de 2009.

Atenciosamente,

Prof. Gracinda Maria D. Almeida e Oliveira  
Coordenadora do CEUA  
PUC PR



## Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética para estudos com animais



Anexo 2. Fragmentos de glândulas submandibulares medindo 10x 10x 10 mm



Anexo 3. Criotubos com as glândulas