



# Brazilian Journal of OTORHINOLARYNGOLOGY

[www.bjorl.org](http://www.bjorl.org)



## ARTIGO ORIGINAL

### Histopathological changes in parotid gland following submandibular gland failure: an experimental animal study<sup>☆</sup>



Yavuz Sultan Selim Yıldırım<sup>a</sup>, Irfan Kaygusuz<sup>b</sup>, Ibrahim Hanifi Ozercan<sup>b</sup>,  
Hasan Cetiner<sup>id a,\*</sup>, Oner Sakallioğlu<sup>a</sup>, Abdulvahap Akyigit<sup>a</sup> e Sertac Duzer<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Elazığ Education and Research Hospital, Department of Otorhinolaryngology, Elazığ, Turquia

<sup>b</sup> University of Firat, School of Medicine, Department of Otorhinolaryngology, Elazığ, Turquia

Recebido em 21 de janeiro de 2018; aceito em 19 de março de 2018

Disponível na Internet em 13 de junho de 2019

#### KEYWORDS

Submandibular;  
Parotid;  
Submandibular gland  
failure;  
Histopathology

#### Abstract

**Introduction:** Submandibular glands are exposed to many effects due to diseases and therapeutic interventions. A study evaluating the effect of submandibular gland dysfunction on the parotid gland has not been presented in the literature.

**Objective:** The aim of this study was to evaluate the histopathological changes in the parotid gland following submandibular gland failure.

**Methods:** Three groups of seven randomly selected female New Zealand rabbits weighing 2500–3000 g were studied. Unilateral and bilateral submandibular glands were removed in Groups 1 and 2, respectively. No procedure was performed in Group III, the control group. The parotid glands were removed 30 days later. Histological parameters were evaluated and graded between 0 (none) and 3 (severe). Differences between groups were compared using the Mann–Whitney *U* test.

**Results:** Mean mucus accumulation in acinar cells was  $2.57 \pm 0.53$  and  $1.71 \pm 0.75$  in Groups 1 and 2, respectively ( $p < 0.05$ ). This value was  $0.57 \pm 0.53$  in Group 3, which was significantly lower than in Groups 1 and 2 ( $p < 0.05$ ). Mean dilatation of the intercalated ducts' lumen was  $1.28 \pm 0.48$  and  $1.57 \pm 0.53$  in Groups 1 and 2, respectively ( $p > 0.05$ ). This value was  $0.28 \pm 0.48$  in Group 3, which was significantly lower than in Groups 1 and 2 ( $p < 0.05$ ). Mean mucus accumulation in the intercalated ducts' lumen was  $2.00 \pm 0.81$  and  $1.00 \pm 0.57$  in Groups 2 and 3, respectively ( $p < 0.05$ ).

DOI se refere ao artigo: <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2018.03.013>

<sup>☆</sup> Como citar este artigo: Yıldırım YS, Kaygusuz I, Ozercan IH, Cetiner H, Sakallioğlu O, Akyigit A, et al. Histopathological changes in parotid gland following submandibular gland failure: an experimental animal study. Braz J Otorhinolaryngol. 2019;85:422–6.

\* Autor para correspondência.

E-mail: [cetinerhasan@yahoo.com](mailto:cetinerhasan@yahoo.com) (H. Cetiner).

A revisão por pares é da responsabilidade da Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial.

**PALAVRAS-CHAVE**

Submandibular;  
Parótida;  
Insuficiência  
da glândula  
submandibular;  
Histopatologia

**Conclusion:** The findings of this study indicate that only 1 month after submandibular gland failure, the parotid glands exhibit significant changes.

© 2018 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Alterações histopatológicas na glândula parótida após insuficiência da glândula submandibular: estudo experimental em animais****Resumo**

**Introdução:** As glândulas submandibulares estão expostas a muitos efeitos causados por doenças e intervenções terapêuticas. Estudos que avaliam o efeito da disfunção da glândula submandibular na glândula parótida ainda não foram reportados na literatura.

**Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações histopatológicas na glândula parótida após insuficiência da glândula submandibular.

**Método:** Três grupos de sete coelhas fêmeas da raça Nova Zelândia, selecionadas aleatoriamente, pesando entre 2.500 e 3.000 gramas foram estudadas. As glândulas submandibulares unilaterais e bilaterais foram removidas nos Grupos 1 e 2, respectivamente. Nenhum procedimento foi realizado no Grupo III, o grupo controle. As glândulas parótidas foram removidas 30 dias depois. Os parâmetros histológicos foram avaliados e classificados entre 0 (nenhum) e 3 (grave). As diferenças entre os grupos foram comparadas usando o teste U de Mann-Whitney.

**Resultados:** O acúmulo médio de muco nas células acinares foi de  $2,57 \pm 0,53$  e  $1,71 \pm 0,75$  nos Grupos 1 e 2, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Esse valor foi de  $0,57 \pm 0,53$  no Grupo 3, significativamente menor do que nos Grupos 1 e 2 ( $p < 0,05$ ). A dilatação média do lúmen dos dutos intercalados foi de  $1,28 \pm 0,48$  e  $1,57 \pm 0,53$  nos Grupos 1 e 2, respectivamente ( $p > 0,05$ ). Esse valor foi de  $0,28 \pm 0,48$  no Grupo 3, significativamente menor do que nos Grupos 1 e 2 ( $p < 0,05$ ). O acúmulo médio de muco no lúmen dos dutos intercalados foi  $2,00 \pm 0,81$  e  $1,00 \pm 0,57$  nos Grupos 2 e 3, respectivamente ( $p < 0,05$ ).

**Conclusão:** Os achados deste estudo indicam que apenas um mês após a insuficiência da glândula submandibular as glândulas parótidas apresentam alterações significativas.

© 2018 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Introdução**

Três pares de glândulas salivares maiores estão localizados na cavidade oral: as glândulas sublinguais, sob a língua, as glândulas submandibulares, sob o assoalho da boca, e as glândulas parótidas no aspecto posterior da boca no espaço retromandibular.<sup>1</sup>

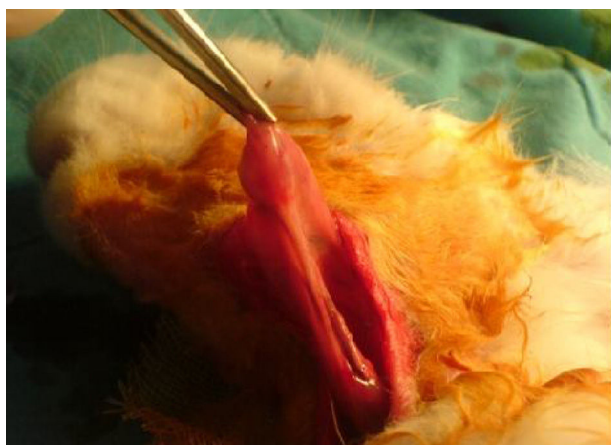
As grandes glândulas salivares estão expostas a vários fatores que levam à perda de função. Alguns desses fatores, como injeção de toxina botulínica, excisão da glândula e transferência de glândulas, têm propósitos terapêuticos.<sup>2-4</sup> Cálculos de glândulas salivares, radioterapia aplicada na região da cabeça e pescoço e trauma na glândula salivar causam disfunções significativas.<sup>5-7</sup> Na falta de um estudo que avalie o efeito da disfunção de qualquer glândula salivar (ou glândulas salivares) nas outras glândulas salivares, nosso objetivo foi avaliar as alterações histopatológicas na glândula parótida em um modelo animal de função comprometida da glândula submandibular em coelhos.

**Método****Desenho e animais do estudo**

Este estudo foi feito em 21 coelhas fêmeas da raça Nova Zelândia (2.500-3.000 g) no Centro de Pesquisa Experimental da Universidade de Firat, após aprovação do Conselho de Ética da Faculdade de Medicina (Número do Documento: 142563/14).

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos, com sete coelhas em cada grupo:

- Grupo I: As glândulas submandibulares unilaterais foram ressecadas e as glândulas parótidas bilaterais foram removidas 30 dias depois para exame histopatológico.
- Grupo II: As glândulas submandibulares bilaterais foram ressecadas e as glândulas parótidas bilaterais foram removidas 30 dias depois para exame histopatológico.



**Figura 1** Excisão da glândula submandibular.

- Grupo III (grupo controle): Nenhuma intervenção cirúrgica foi feita nas glândulas submandibulares e as glândulas parótidas bilaterais foram removidas para exame histopatológico.

### Procedimento cirúrgico

O mesmo procedimento cirúrgico foi feito em todos os coelhos dos Grupos I e II. Os animais foram anestesiados com 10 mg/kg de cloridrato de xilazina (Rompun®; Bayer AG, Alemanha) e 50 mg/kg de cloridrato de quetamina (Ketalar®; Eczacıbaşı Ilac, Turquia). Uma incisão horizontal de 3 cm de comprimento foi criada 1 cm abaixo do corpo da mandíbula. As glândulas submandibulares foram alcançadas após a pele e os retalhos subcutâneos serem elevados (fig. 1). As glândulas submandibulares unilaterais e bilaterais foram excisadas dos animais nos Grupos I e II, respectivamente. Tratamento profilático com 20-40 mg/kg de cefazolina sódica (Sefazol Flk®; Mustafa Nevzat, Turquia) foi administrado um hora antes e uma hora após a cirurgia. Todos os animais foram acompanhados por 30 dias após o procedimento cirúrgico.

Os coelhos foram novamente anestesiados com 10 mg/kg de cloridrato de xilazina e 50 mg/kg de cloridrato de quetamina no 30º dia do pós-operatório. Uma incisão de aproximadamente 3 cm de comprimento foi feita na região da glândula parótida. A glândula parótida foi exposta descolando-se a pele e o tecido subcutâneo e, em seguida, excisada. O mesmo procedimento cirúrgico foi feito na glândula parótida contralateral.

### Preparação das amostras

As glândulas parótidas foram fixadas em glutaraldeído a 10% por quatro a seis horas. Os espécimes fixos foram desidratados gradualmente em etanol após ser mantidos em tetróxido de ósmio a 1% por 30 minutos e então colocados em resina Epon. Usaram-se micrótomos com lâmina de vidro Ultratome III (Shandon Finesse, Inglaterra) para obter secções de 1,5 µm de espessura. As secções foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas com magnificação de 40x, 100x, 200x e 1000x, com um microscópio óptico (Olympus, BX51, Japão).

### Avaliação das amostras

O acúmulo de muco nas células acinares, a dilatação do lúmen nos dutos intercalados, o acúmulo de muco no lúmen dos dutos intercalados, o acúmulo de grânulos citoplasmáticos e a contagem de células mioepiteliais foram avaliados com uma lente graticulada (um micrômetro ocular com 100 quadrados iguais que mediam 1 × 1 mm cada) montado em um microscópio óptico Olympus.

Quatro secções foram coletadas de cada coelho. Dentro de cada secção, quatro áreas distintas foram examinadas com quatro ampliações (40x, 100x, 200x e 1000x) e classificadas da seguinte forma: nenhum = 0, leve = 1, intermediário = 2 e grave = 3. O escore médio foi calculado com o uso das quatro áreas examinadas de todas as quatro secções de cada coelho.

### Análise estatística

Um banco de dados foi criado com os dados histopatológicos, que foram analisados estatisticamente pelo programa SPSS 11.5 (SPSS Inc, ABD). Valores de  $p < 0,05$  foram estabelecidos como estatisticamente significantes. As variáveis apresentaram distribuição não normal, pois cada grupo foi composto por sete coelhas e o número total de coelhas foi de 21; assim, testes não paramétricos foram usados nas análises estatísticas. O teste U de Mann-Whitney foi usado para comparar os grupos.

### Resultados

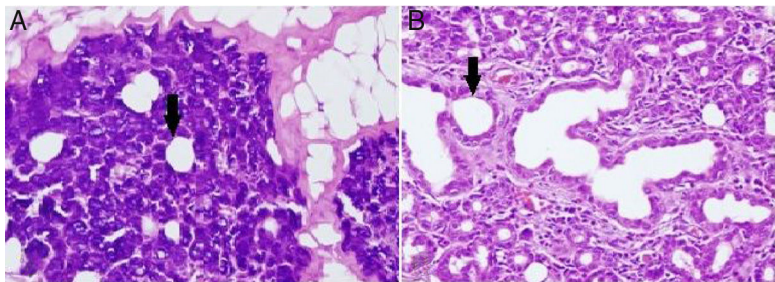
O acúmulo médio de muco nas células acinares foi de  $2,57 \pm 0,53$  no Grupo 1 e de  $1,71 \pm 0,75$  no Grupo 2 ( $p < 0,05$ ). Esse valor foi de  $0,57 \pm 0,53$  no Grupo 3, significativamente menor do que nos Grupos 1 e 2 ( $p < 0,05$ ). A dilatação média do lúmen dos dutos intercalados foi de  $1,28 \pm 0,48$  no Grupo 1 e de  $1,57 \pm 0,53$  no Grupo 2 ( $p > 0,05$ ). Esse valor foi de  $0,28 \pm 0,48$  no Grupo 3, significativamente menor do que nos Grupos 1 e 2 ( $p < 0,05$ ). O acúmulo médio de muco no lúmen dos dutos intercalados foi  $2,00 \pm 0,81$  no Grupo 2 e  $1,00 \pm 0,57$  no Grupo 3 ( $p < 0,05$ ). Esse valor foi de  $1,42 \pm 0,53$  no Grupo 1, o qual não foi significativamente diferente do acúmulo de muco nos dutos intercalados em nenhum dos outros dois grupos. Não houve diferenças significantes entre os grupos em termos de acúmulo de grânulos citoplasmáticos ou número de células mioepiteliais (tabela 1).

### Discussão

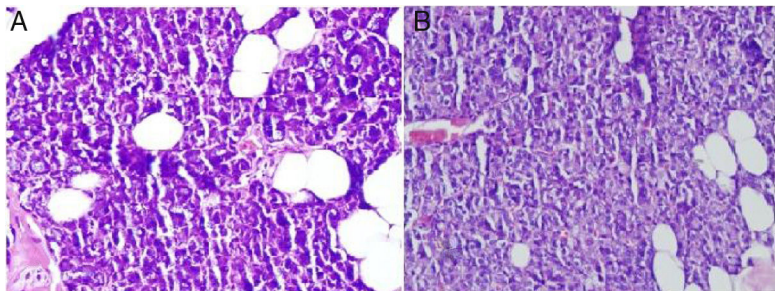
As secreções são produzidas nas glândulas salivares por estruturas compostas de células mucosas e serosas chamadas ácinos. Cada ácino abre-se em um duto intercalado, que por sua vez drena em um duto estriado. Células mioepiteliais são encontradas nas lâminas basais do epitélio próximo ao ácino e na lâmina basal do epitélio do canal. Os ácinos e os dutos intercalados são circundados por células mioepiteliais.<sup>8,9</sup> A glândula parótida é composta de células acinares serosas que contêm grânulos translúcidos

**Tabela 1** Médias e desvios-padrão dos dados dos grupos experimentais (Grupos I-II) e do grupo controle (Grupo III)

|                                                 | Grupo I     | Grupo II    | Grupo III   |
|-------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Acúmulo de muco nas células acinares            | 2,57 ± 0,53 | 1,71 ± 0,75 | 0,57 ± 0,53 |
| Acúmulo de muco no lúmen dos dutos intercalados | 1,42 ± 0,53 | 2,00 ± 0,81 | 1,00 ± 0,57 |
| Acúmulo de grânulos citoplasmáticos             | 1,71 ± 0,48 | 1,28 ± 0,75 | 1,28 ± 0,95 |
| Dilatação no lúmen dos dutos intercalados       | 1,28 ± 0,48 | 1,57 ± 0,53 | 0,28 ± 0,48 |
| Contagem das células mioepiteliais              | 1,71 ± 0,75 | 1,71 ± 0,75 | 1,85 ± 0,69 |



**Figura 2** (A) Dilatação no lúmen dos dutos intercalados nas células acinares da glândula parótida do grupo de excisão unilateral da glândula submandibular (200 × , microscópio óptico; H&E). (B) Dilatação no lúmen dos dutos intercalados nas células acinares da glândula parótida do grupo de excisão bilateral da glândula submandibular (200 × , microscópio óptico; H&E). ↓, Lúmen do duto intercalado.



**Figura 3** (A) Acúmulo de muco nas células acinares da glândula parótida no grupo de excisão unilateral da glândula submandibular (400 × , microscópio óptico, H&E). (B) Acúmulo de muco nas células acinares da glândula parótida do grupo de excisão bilateral da glândula submandibular (400 × , microscópio óptico, H&E).

intensos intracitoplasmáticos que produzem uma secreção puramente serosa.<sup>10</sup>

Alterações na estrutura histológica da glândula parótida são observadas em tumores, condições inflamatórias, doenças sistêmicas e após tratamento com radiação; portanto, a função secretora da glândula se deteriora.<sup>11</sup> No presente estudo, a perda da função da glândula submandibular mostrou causar uma dilatação proporcional do lúmen dos dutos intercalados (fig. 2). Semelhantemente ao nosso estudo, a dilatação da luz dos dutos intercalados também é observada na sialolitíase e no consumo excessivo de álcool.<sup>12,13</sup> Metaplasia escamosa no epitélio, inflamação crônica intermediária a grave e graus variados de destruição acinar foram relatados em material de biópsia obtido de uma glândula com sialolitíase.<sup>12</sup> Esses achados extras na sialolitíase não são apresentados em nosso próprio trabalho, o que provavelmente se deve ao fato de o tempo de estudo

ter sido limitado a apenas um mês. Contrariamente ao nosso estudo, o acúmulo de grânulos intracitoplasmáticos é um achado importante do consumo excessivo de álcool.<sup>13</sup>

A principal ectasia ductal da glândula salivar é um dos achados histopatológicos da síndrome de Sjögren e doenças infecciosas.<sup>14,15</sup> Além disso, fibrose intersticial e alterações metaplásicas são a base dos danos às glândulas causados por radioterapia.<sup>16</sup> Embora esses achados não sejam observados em nosso estudo, o acúmulo de muco é outro resultado importante do exame histopatológico. O acúmulo de muco nas células acinares foi maior nos animais com excisão unilateral e bilateral da glândula submandibular em comparação com o grupo controle e houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos unilateral e bilateral (fig. 3). O acúmulo de muco no lúmen dos dutos intercalados também foi maior nos animais com excisão bilateral da glândula submandibular em comparação com o grupo controle.



## Conclusão

A excisão unilateral ou bilateral da glândula submandibular resulta em alterações histopatológicas na glândula parótida após um curto período. Quando as alterações histopatológicas causadas por outras doenças que afetam a glândula salivar são consideradas, a dilatação do lúmen dos dutos intercalados em nosso estudo foi consistente com os achados nas doenças das glândulas salivares relacionadas a processos infecciosos e uso excessivo de álcool. A causa das alterações histopatológicas nas glândulas parótidas após um curto período (um mês) pode ser explicada pelo excesso de funcionamento das glândulas parótidas, pois elas devem compensar a grande carga de trabalho previamente feita pela glândula submandibular.

O presente estudo pode ser considerado um bom modelo para avaliar os efeitos em curto prazo da diminuição da função da glândula submandibular na glândula parótida. No entanto, estudos adicionais são necessários para avaliar os efeitos em longo prazo, como metaplasia e outros.

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## Referências

1. Tucker AS. Salivary gland development. *Semin Cell Dev Biol.* 2007;18:237–44.
2. Jongerius PH, Joosten F, Hoogen FJA, Gabreels FJ, Rotteveel JJ. The treatment of drooling by ultra-sound guided intra-glandular injections of botulinum toxin-A into the salivary glands. *Laryngoscope.* 2003;113:107–11.
3. Stern Y, Feinmesser R, Collins M, Shott SR, Cotton RT. Bilateral submandibular gland excision with parotid duct ligation for treatment of sialorrhea in children: long-term results. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002;128:801–3.
4. Naresh JHA, Seikaly H, McGaw T, Coulter L. Submandibular salivary gland transfer prevents radiation-induced xerostomia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000;46:7–11.
5. Carta F, Farneti P, Cantore S, Macri G, Chuchueva N, Cuffaro L, et al. Sialendoscopy for salivary stones: principles, technical skills and therapeutic experience. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2017;37:102–12.
6. Lovelace TL, Fox NF, Sood AJ, Nguyen SA, Day TA. Management of radiotherapy-induced salivary hypofunction and consequent xerostomia in patients with oral or head and neck cancer: meta-analysis and literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2014;117:595–607.
7. Haller JR. Trauma to the salivary glands. *Otolaryngol Clin North Am.* 1999;32:907–18.
8. Eisbruch A, Rhodus N, Rosenthal D, Murphy B, Rasch C, Sonis S, et al. How should we measure and report radiotherapy-induced xerostomia? *Semin Radiat Oncol.* 2003;13:226–34.
9. Radfar L, Sirois DA. Structural and functional injury in minipig salivary glands following fractionated exposure to 70 Gy of ionizing radiation: an animal model for human radiation-induced salivary gland injury. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;96:267–74.
10. Henriksson R, Frojd O, Gustafsson H, Johansson S, Yi-Qing C, Franzén L, et al. Increase in mast cells and hyaluronic acid correlates to radiation-induced damage and loss of serous acinar cells in salivary glands: the parotid and submandibular glands differ in radiation sensitivity. *Br J Cancer.* 1994;69:320–6.
11. Croce A, D'agostino L, Moretti A, Augurio A. Parotid surgery in patients over seventy-five years old. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2008;28:231–8.
12. Andretta M, Tregnaghi A, Prosenikliev, Staffieri A. Current opinions in sialolithiasis diagnosis and treatment. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2005;25:145–9.
13. Carranza M, Gallizi M. Structural and morphometrical study in glandular parenchyma from alcoholic sialosis. *J Oral Pathol Med.* 2005;34:1–6.
14. Eroschenko VP, Mariano SH. Di Fiore's atlas of histology with functional correlations. Philadelphia, US: Lippincott & Wilkins, Ltd; 2008.
15. Bone RC. Sjogren syndrome, a persistent clinical problem. *Laryngoscope.* 1985;95:295–9.
16. Radfar L, Cheng SC. Assessment of post-radiotherapy salivary glands. *Br J Radiol.* 2011;84:393–402.