

ESTUDO MORFOLÓGICO E HISTOQUÍMICO DAS GLÂNDULAS SALIVARES DE *AMPHISBAENA ALBA* (AMPHISBAENIDAE, AMPHISBAENIA)

Ruberval A. LOPES*
José Renan V. da COSTA*
Sérgio O. PETENUSCI*
Ana Lúcia V. FAVARETTO*
Paulo Henrique F. CHAVES*

RESUMO: Os autores estudaram morfologicamente as glândulas salivares de *Amphisbaena alba* e histoquimicamente as mucossustâncias e proteínas nessas glândulas. Baseados nos resultados, os autores concluíram:

1. que a glândula salivar labial de *Amphisbaena* é formada por células mucoserasas e a glândula sublingual por células muco-serasas e mucosas;
2. que o produto de secreção das células muco-serasas das glândulas labial e sublingual é constituído de mucossustâncias neutra e ácida sulfatada, além de ácido siálico e proteína. As células mucosas evidenciaram mucossustâncias neutra e ácida, além de ácido siálico;
3. que o produto de secreção dos mucócitos é constituído de mucossustâncias neutra e ácida.

UNITERMOS: *Amphisbaena alba*, glândulas salivares, histoquímica e histologia.

INTRODUÇÃO

Os primeiros estudos sobre as glândulas salivares de répteis foram os de Carus (1834), Leydig (1853, 1857, 1872), Guenther (1868), Owen (1868), Ravier (1884), Vogt et al. (1894), Oppel (1900), Bolk (1913), Werdeman (1921), Krause (1922), Phisalix (1922) (todos citados em 4 e 6).

Dornesco et al.⁴ estudaram as glândulas bucais de *Ablepharus kitabelli* e *Eremias arguta deserti*, fazendo comparações com as espécies *Lacerta muralis* e *Anguis fragilis*. Gabe & St. Girons⁶ estudaram as glândulas salivares em *Gekkota*, *Iguania*, *Scincomorpha* e *Anguimorpha*; e Lopes et al.¹² em *Tupinambis teguixin*.

* Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto — USP.
Endereço para correspondência: Ruberval A. LOPES, Departamento de Ciências Patológicas.
Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto — USP. 14100 Ribeirão Preto -- SP.

Nos ofídios, essas glândulas foram estudadas por Bolognani & Bolognani², Rosemberg¹⁸, Gabe & St. Girons⁶, Zago²², Lopes et al.¹⁰ e¹¹ e Barros et al.¹.

Pouco se tem estudado sobre a morfologia e histoquímica das glândulas salivares em *Amphisbaenia*, sendo que somente Gabe & St. Girons⁶ as estudaram em *Blanus cirineus* e em *Trogonophis wiegmanni*.

O objetivo, pois, do presente trabalho é estudar as glândulas salivares de *Amphisbaena alba*, identificando os tipos celulares aí existentes, bem como detectar histoquimicamente, por meio de técnicas adequadas, o produto de secreção dessas células, confrontando-o com os de Gabe & St. Girons⁶ que constataram a presença de uma ou outra mucossubstância nessas células.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se, para este estudo, *Amphisbaena* de ambos os sexos, capturadas no município de Ribeirão Preto. Os animais foram sacrificados por inalação de éter anestésico, sendo logo após dissecadas as glândulas labial e sublingual, as quais foram imediatamente imersas em Bouin, durante 24 horas. Após a fixação, as peças foram incluídas em parafina.

Para a observação morfológica das glândulas salivares e mucócitos da *Amphisbaena* foram utilizados os métodos da hematoxilina e eosina e tricômico de Masson.

Para a pesquisa histoquímica de mucossubstâncias usaram-se as recomendações técnicas de Pearse¹⁴, a menos que citada referência especial. Os métodos foram os seguintes: PAS (ácido periódico + reativo de Schiff), azul de alcian aos pH = 2,5 e 0,5, azul de alcian + PAS. Como controle utilizaram-se os seguintes métodos: amilase salivar, acetilação, ação da tripsina, ação do clorofórmio + metanol, metilação, metilação seguida de saponificação, ação da hialuronidase testicular e o teste de Quintarelli et al.¹⁵.

Para a pesquisa histoquímica de proteínas foram utilizadas as técnicas do azul de bromofenol e da ninhidrina-Schiff.

Para a caracterização das células secretoras adotou-se o critério de Gabe & St. Girons⁶. Por esse método, classificam-se quatro tipos celulares: mucoso, muco-seroso, sero-mucoso e seroso. Os critérios para essa classificação são fornecidos pela alcianofilia, positividade ao PAS e presença de proteína, histoquimicamente detectável.

RESULTADOS

Resultados morfológicos

Glândula salivar labial — a glândula salivar labial inferior de *Amphisbaena alba* localiza-se na face externa do osso dentário, estendendo-se por todo o seu comprimento.

Essa glândula é circundada por uma cápsula muito espessa de tecido conjuntivo fibroso denso e pouco celular, vascularizado, o qual emite sep-

tos, dividindo a glândula em diversas outras menores, monostomáticas, dispostas a intervalos regulares, acompanhando o longo eixo da glândula. Fibras colágenas delicadas envolvem cada ácino.

Os ácinos são formados por um epitélio prismático, de altura variável, cujo citoplasma celular contém grânulos basófilos e acidófilos, sendo o núcleo, por sua vez, arredondado, localizado na porção basal da célula e com pouca cromatina (Fig. 1).

As glândulas monostomáticas são do tipo túbulo-acinoso composto. Os ácinos desembocam em ductos excretores revestidos por epitélio pavimentoso estratificado, que se abrem na cavidade oral.

Glândula sublingual — a glândula sublingual da *Amphisbaena* localiza-se no assoalho da cavidade oral, entre as faces internas do maxilar inferior. Apresenta forma ovóide e está separada do seu par por tecido conjuntivo fibroso e músculo.

Histologicamente podem ser distinguidas duas porções glandulares distintas. A porção anterior é constituída de ácinos pequenos, de células prismáticas baixas e núcleos grandes e ovóides. O citoplasma é acidófilo e os grânulos de secreção são bem evidentes. A porção posterior, separada da anterior por uma grande quantidade de tecido conjuntivo fibroso, é constituída por dois tipos de ácinos: um grande, mucoso, de células altas e núcleos pequenos, com citoplasma claro e grânulos de secreção pequenos; o outro tipo de ácino é pequeno, de células baixas e núcleos ovóides, o citoplasma, também mucoso, apresenta grânulos mais grosseiros (Fig. 2 e 3).

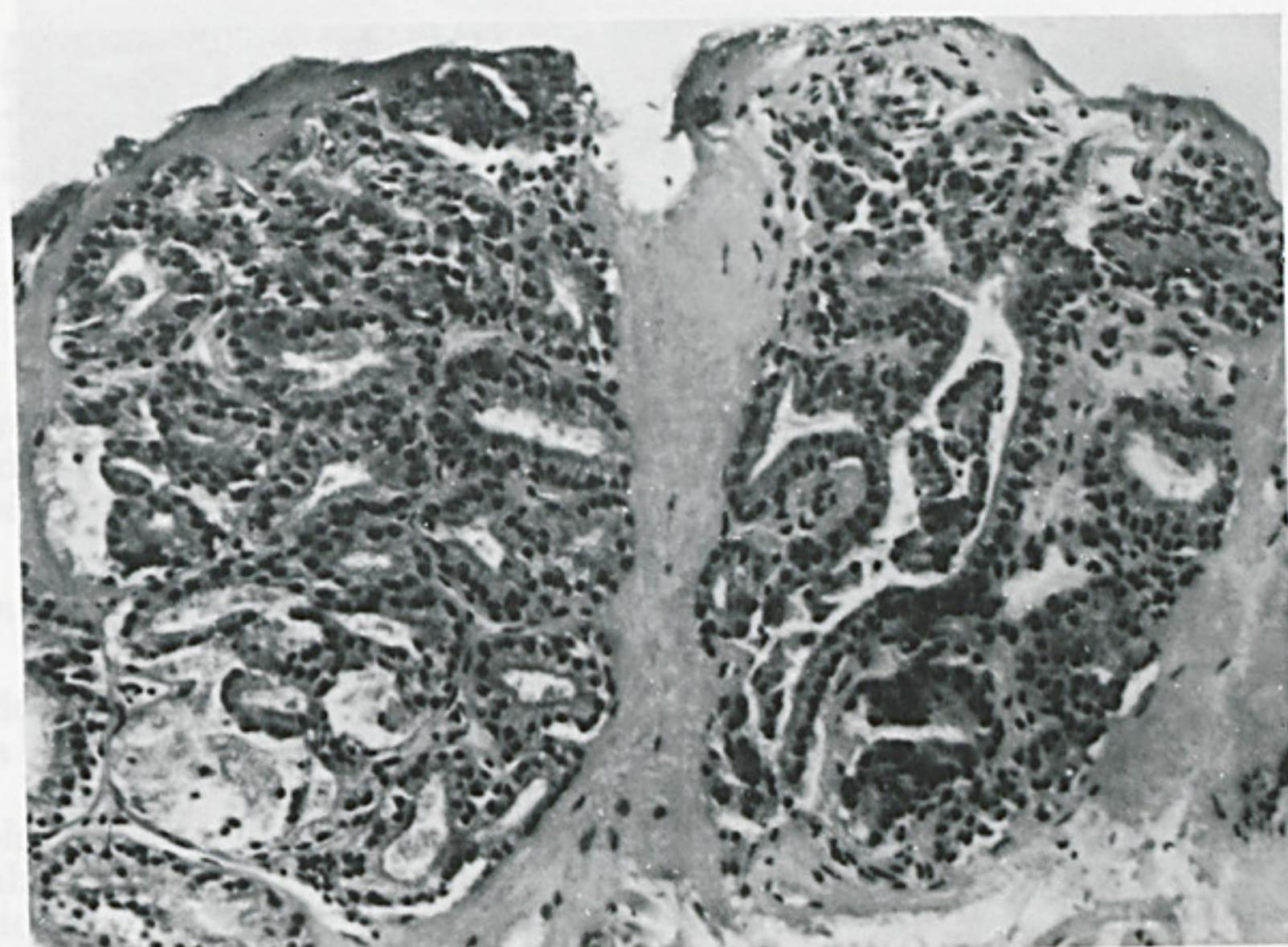


Fig. 1 — Aspecto histológico da glândula labial de *Amphisbaena alba*. Hematoxilina e eosina (250 X).

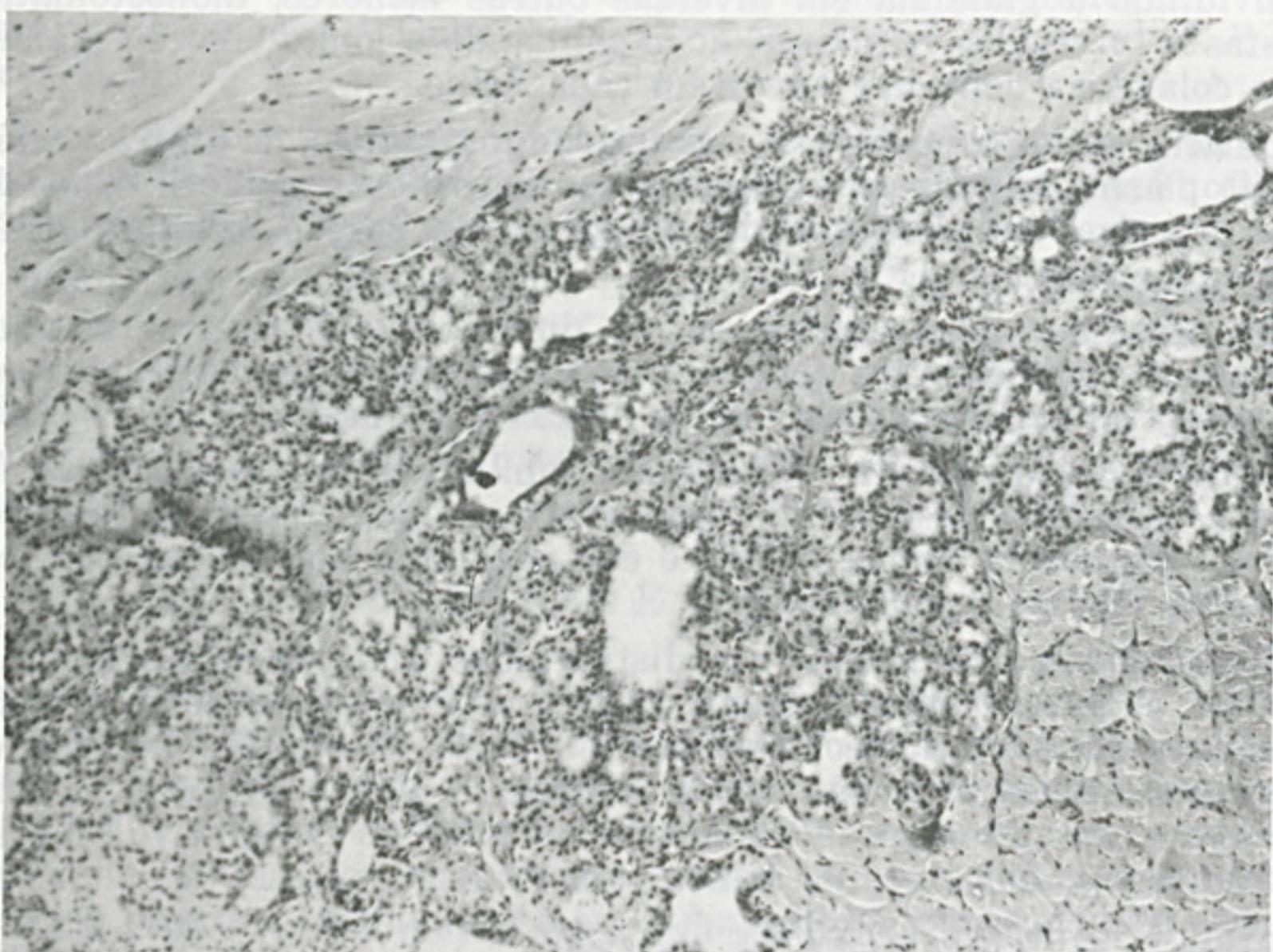


Fig. 2 — Aspecto histológico da porção anterior da glândula sublingual de *Amphisbaena alba*. Hematoxilina e eosina (180 X).

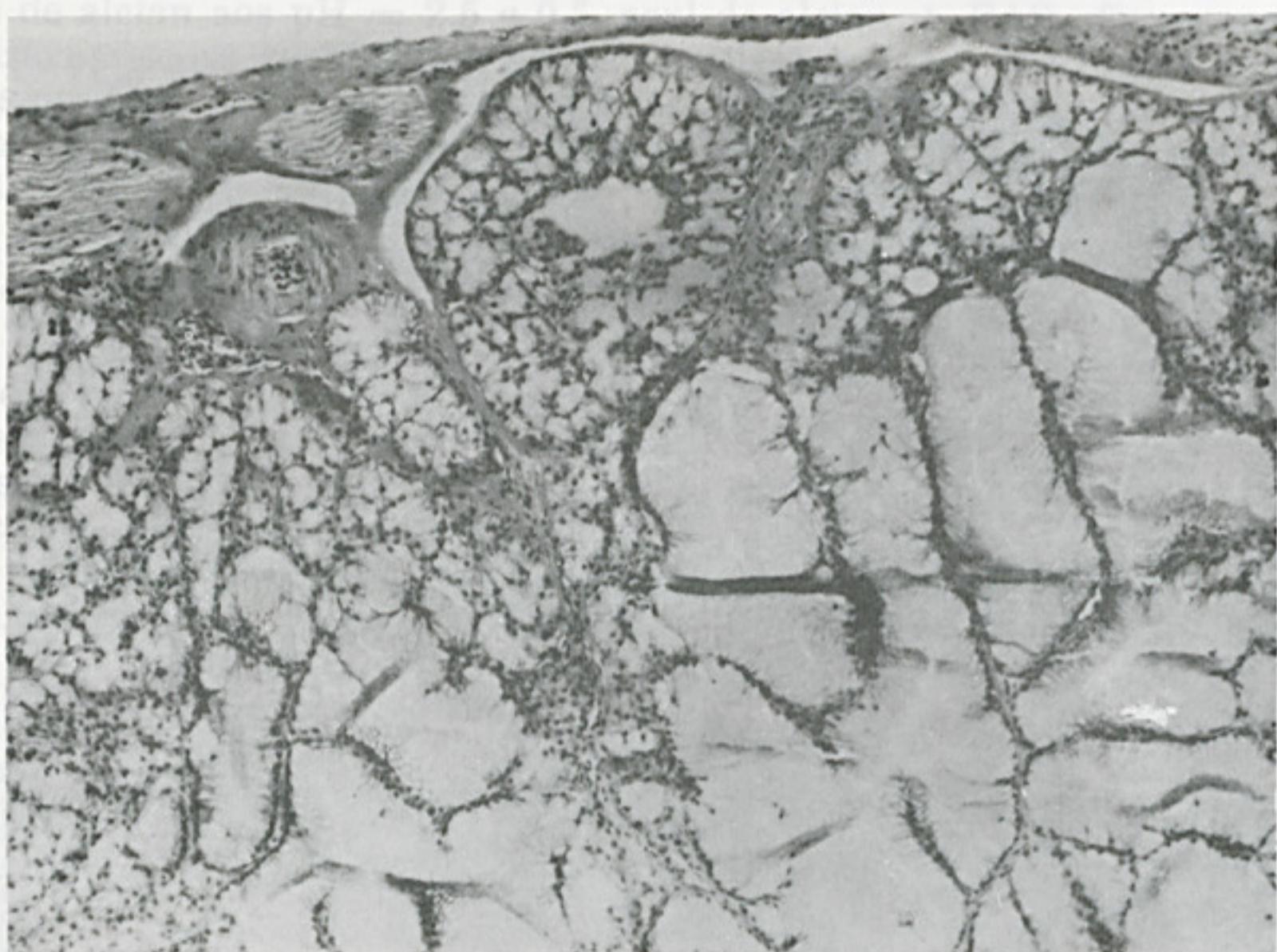


Fig. 3 — Aspecto histológico da porção posterior da glândula sublingual de *Amphisbaena alba*. Hematoxilina e eosina (180 X).

Mucócitos — as glândulas mucosas unicelulares estão situadas na porção mais profunda da cavidade oral, dispostas isoladas ou aos grupos, bem próximas às vias respiratórias.

Resultados histoquímicos

Os resultados da detecção histoquímica das mucossubstâncias e proteínas acham-se expressos na Tabela I.

TABELA I

Amphisbaena alba. Resultados da detecção histoquímica de mucosubstâncias e proteínas das glândulas sublingual e labial e mucócitos.

Reações	Sublingual		Labial Mucócitos	
	Porção ant. MS	Porção post. M	MS	M
PAS	+	+++	+	+++
PAS após amilase	+	+++	+	+++
PAS após tripsina	±	+++	±	+++
PAS após clorofórmio + metanol	+	+++	+	+++
PAS após acetilação	—	—	—	—
Azul de alcian (AB) a pH = 2,5	+	+++	++	+++
AB após metilação	—	—	—	—
AB após metilação + saponificação	±	+	±	+
AB após hidrólise ácida	±	++	+	+++
AB após hialuronidase	+	++	++	+++
AB a pH = 0,5	±	++	+	++
AB + PAS	violeta azul	violeta	azul	violeta
Azul de bromofenol	+	—	+	—
Ninhidrina-Schiff	±	—	±	—

+++ = reação forte, + = reação fraca, — = reação negativa.
M = mucosa, MS = muco-serosa.

DISCUSSÃO

Glândula labial — o aspecto polistomático da glândula labial de *Amphisbaena alba*, também foi observado em *Anguis fragilis* por Raynaud¹⁷ e Dornesco et al.⁴; em *Eunectes murinus* por Barros et al.¹; em *Tupinambis teguixin* por Lopes et al.¹².

Em *Amphisbaenia* tal aspecto histológico foi observado em *Blanus cirineus* e em *Trogonophis wiegmanni* por Gabe & St. Girons⁶.

Pela análise dos resultados histoquímicos constantes na Tabela I e tendo em vista o critério de Gabe & St. Girons⁶, verificou-se que a glândula labial de *Amphisbaena alba* é constituída de células muco-serosas. Em *Blanus* e *Trogonophis* foram observadas, nesta glândula, somente células mucosas⁶. Observou-se também que o produto de secreção das células muco-serosas é constituído de mucossubstâncias neutra e ácido siálico, os quais são responsáveis pela positividade aos métodos do PAS após amilase e acetilação^{9, 13}, além da ação da tripsina e do clorofórmio + metanol; e ao método do azul de alcian após o teste de Quinta-

relli et al.¹⁵. Foi detectada, também, mucossubstância ácida sulfatada, isto porque a alcianofilia apresentou positividade ao pH = 0,5, bem como diminuição na coloração pelo azul de alcian a pH = 2,5 após metilação seguida de saponificação. Estes resultados indicam a presença de mucossubstâncias sulfatadas no produto de secreção dessas células^{3, 8, 16, 19, 20, 21}). A não alteração da coloração pelo azul de alcian após prévio tratamento pela hialuronidase testicular indicou a presença de condroitin-sulfato B⁷. A positividade ao azul de bromofenol e ao método da ninhidrina-Schiff indicou proteína nesse produto de secreção.

Pelo método combinado azul de alcian + PAS, constatou-se predominância das mucossubstâncias ácidas em algumas células acinares.

Gabe & St. Girons⁶ não se preocuparam, na sua metodologia histoquímica, em determinar qualitativamente as mucossubstâncias que constituem o produto de secreção dessa glândula. Determinaram somente o caráter neutro ou ácido desse produto.

Glândula sublingual — a porção posterior da glândula sublingual de *Amphisbaena alba* é constituída de dois tipos de ácinos, sendo que um, localizado mais anteriormente, é constituído de células baixas; e o outro tipo, localizado mais profundamente na glândula, é constituído de células altas e o ducto excretor é forrado por epitélio estratificado.

Da análise dos resultados constantes na Tabela I e de acordo com o critério de Gabe & St. Girons⁶, constatou-se serem ambos os ácinos da porção posterior da glândula sublingual de *Amphisbaena* constituídos de células mucosas. Já em *Blanus* e *Trogonophis* foram constatadas nas porções profunda e média desta glândula, células muco-serosas e mucosas⁶. O produto de secreção é constituído de mucossubstâncias neutra e ácida sulfatada, além de ácido siálico.

A porção anterior da glândula sublingual de *Amphisbaena* é constituída de células muco-serosas, semelhantes às observadas em *Blanus* e *Trogonophis*. O produto de secreção é constituído de um composto glicoprotéico de mucossubstâncias neutra e ácida sulfatada, além de ácido siálico.

Mucócitos — Fahrenholz⁵ já havia observado mucócitos na cavidade bucal de répteis e, mais recentemente, Gabe & St. Girons⁶ verificaram mucócitos em numerosos lagartos. Analisando-se a Tabela I verifica-se que os mucócitos de *Amphisbaena alba* são secretores de muco, constituído de mucossubstâncias neutra e ácida sulfatada.

SUMMARY. The authors studied morphologically the salivary glands of *Amphisbaena alba*, and histochemically the muco-substances and some protein in these glands. Based on the results, the authors concluded:

1. the labial salivary gland is formed by muco-serous cells, the sublingual gland by muco-serous and mucous cells;
2. mucous cells of sublingual gland shows both neutral and sulfated acid muco-substances, and sialic acid. Muco-serous cells of labial and sublingual glands shows neutral and acid muco-substances, sialic acid and protein;
3. mucocytes have neutral and acid muco-substances.

UNITERMS: *Amphisbaena alba*, salivary glands, histochemistry and histology.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARROS, J. M., LOPES, R.A., MAIA CAMPOS, G. & DARUGE, A.D. Estudo morfológico e histoquímico de polissacarídeos em glândulas cefálicas de *Eunectes murinus* (Ophidea, Boidae). *Ciênc. Cult.*, 25: 151-156, 1973.
2. BOLOGNANI, F.A.M. & BOLOGNANI, L. Osservazioni biochimiche e istochimiche sulle ghiandole buccali di *Tropidonotus natrix*. *Riv. Istoch. Norm. Pat.*, 10: 166-167, 1964.
3. DORFMAN, A. Polysaccharides of connective tissue. *J. Histochem. Cytochem.*, 11:2-13, 1963.
4. DORNESCO, G.T. & DAN ANDREI. Les glandes buccales (salivaires) des Sauriens. *Anat. Anz.*, 118: 7-26, 1966.
5. FAHRENHOLTZ, C. Drüsen der Mundhöhle Reptilian. In: Bo'k, Göppert, Kallius, Lubosh *Handbuch der vergleichenden Anatomie der Wirbeltiere*, III Bd. Urban und Schwarzenberg. Berlin und Wien, 1937.
6. GABE, M. & St. GIRONS, H. Données histologiques sur les glandes salivaires des lépidosauriens. *Mém. Mus. nat. Hist. nat.*, Paris, Sér. A, Zool., 58: 1-112, 1969.
7. LEPPİ, T.J. & STOWARD, P.J. On the use of testicular hyaluronidase for identifying acid mucins in tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.*, 13: 406-407, 1965.
8. LEV, R. & SPICER, S.S. Specific staining of sulphate groups with Alcian blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem.*, 12: 309, 1964.
9. LISON, L. *Histo chimie et cytochimie animales*, 3 ed., Gauthier-Villars, Paris, 1960.
10. LOPES, R.A., OLIVEIRA, C., MAIA CAMPOS, M.N., MAIA CAMPOS, S. & BIRMAN, E.G. Morphological and histochemical study of cephalic glands of *Bothrops jararaca* (Ophidia, Viperidae). *Acta Zool.*, 55: 17-24, 1974.
11. LOPES, R.A., VALERI, V., MAIA CAMPOS, G., LOPES, O.V.P. & FARIA, R.M. Étude histochimique des mucopolisaccharides des glandes céphaliques de *Micrurus c. corallinus* (Wied) (Ophidea, Elapidae). *Ann. d'Histo chimie*, 18: 129-137, 1973.
12. LOPES, R.A., VALERI, V., OLIVEIRA, C., MAIA CAMPOS, G. & IUCIF, S. Aspectos morfológicos e histoquímicos das glândulas salivares de *Tupinambis teguixin* (Teiidae, Lacertilia). *Ciênc. Cult.*, 26: 1035-1040, 1974.
13. McMANUS, J.F.A. & CASON, J.E. Carbohydrate histochemistry studied by acetylation techniques. I. Periodic acid methods. *J. Exp. Med.*, 91: 651-654, 1950.
14. PEARSE, A.G.E. *Histochemistry: theoretical and applied*, 3rd ed., Churchill, London, 1968.
15. QUINTARELLI, G., TSUIKI, S., HASHIMOTO, Y. & PIGMAN, W. Studies of sialic acid-containing mucins in bovine submaxillary and rat sublingual glands. *J. Histochem. Cytochem.*, 9: 176-183, 1961.
16. RAVETTO, C. Alcian blue-alcian yellow: a new method for the identification of different acidic groups. *J. Histochem. Cytochem.*, 12: 44-45, 1964.
17. RAYNAUD, J. Sur la structure des glandes salivaires de l'orvet (*Anguis fragilis*). *Bull. Soc. Zool. de France*, 86:710-713, 1961.
18. ROSENBERG, H.I. Histology, histochemistry and emptying mechanism of the venom gland of some elapid snakes. *J. Morph.*, 123: 133-136, 1967.
19. SPICER, S.S. & LILLIE, R.D. Saponification as a mean of selectively reversing the methylation blockade of tissue basophilia. *J. Histochem. Cytochem.*, 7: 123-125, 1959.
20. SZIRMAI, J.A. Quantitative approaches in the histochemistry of mucopolysaccharides. *J. Histochem. Cytochem.*, 11:24-34-, 1963.
21. TERNER, J.Y. & LEV, A. Lactone formation in the histochemical evaluation of acid mucopolysaccharides: mucins. *J. Histochem. Cytochem.*, 11: 804-811, 1963.
22. ZAGO, D.A. *Estudo morfológico e histoquímico de glândulas salivares relacionadas com a evolução da função venenosa nos ofídios*. Tese. Instituto de Ciências Biomédicas da USP. 1971.

