

# STUDIO MORFOMETRICO SULLO SVILUPPO DELLA GHIANDOLA SOTTOMANDIBOLARE DI RATTO

## MORPHOMETRIC STUDY ON THE DEVELOPMENT OF THE RAT SUBMANDIBULAR GLAND

ELISABETTA GIANNESI, MARIA PAOLA RICCIARDI, ALESSANDRA COLI,  
PAOLO MARRONI, MARIA RITA STORNELLI

### RIASSUNTO

La ghiandola sottomandibolare del ratto è stata ed è tuttora oggetto di interesse per le sue molteplici peculiarità quali il dimorfismo sessuale morfologico e funzionale della componente secernente e la sua capacità di sintetizzare numerose proteine biologicamente attive (NGF, EGF, renina, callicreina, cromogranina). In questa indagine sono state seguite le modificazioni morfometriche postnatali cui vanno incontro i dotti striati (precursori dei dotti convoluti granulari), ed i dotti intercalati di 1° ordine che collegano i dotti striati ai tubuli terminali. A tale scopo sono state analizzate le ghiandole sottomandibolari di ratti maschi albini di età compresa tra 1 e 6 settimane per quantificare, su sezioni seriate, con un analizzatore di immagini, l'estensione dei dotti striati e dei dotti intercalati; è stato inoltre rilevato il diametro e l'altezza delle cellule di rivestimento di tali dotti. I risultati ottenuti hanno evidenziato che, mentre il diametro e la superficie occupata dai dotti striati tendono progressivamente ad aumentare con l'età, gli stessi parametri relativi ai dotti intercalati si mantengono su valori pressoché costanti. I dati ottenuti sono stati quindi interpretati e discussi anche in relazione a quanto riportato in bibliografia sull'argomento.

Parole chiave: ghiandola sottomandibolare, ratto, morfometria, sviluppo.

### SUMMARY

The submandibular gland of the albino rat has been studied for some its peculiarities like the morphological and functional dimorphism of secretory component and because its granular convolute tubules are able to synthesize several biologically active polypeptides (NGF, EGF, renin, kallicrein, chromogranin).

The aim of the present study was to state more exactly the morphometric changes of postnatal development of some ductal components of the gland. In particular we analysed the striated ducts (which are the precursors of the granular convolute tubules) and the primary intercalated ducts lying between the striated duct and terminal tubules

The histological serial sections of submandibular male albino rat glands from one up to six weeks of age have been examined to determine the area of the striated and intercalated ducts by an image analyser (Leica Q Win, Leica, Cambridge, U.K.). The diameter and the height of the lining cells of these ducts have been also measured. The results point out a progressive increase of the diameter and area of the striate ducts, while the intercalated ducts do not show changes of above-mentioned values during the same period. Therefore the morphometric obtained data are discussed and compared in relation to the results obtained by other authors.

Key words: submandibular gland, rat, morphometry, development.

## INTRODUZIONE

La ghiandola sottomascellare del ratto albino ha suscitato da tempo l'interesse di molti ricercatori che l'hanno analizzata dal punto di vista morfologico, morfometrico, ultrastrutturale, biochimico, istochimico ed immunoistochimico.

Il crescente ed ancora attuale interesse è dovuto alle sue molteplici peculiarità.

La ghiandola raggiunge progressivamente la propria maturità morfologica e funzionale non prima di 3-4 mesi di età (Screebny et al., 1955) o più tardivamente (Jacoby & Leeson, 1959; Sashima, 1986).

Lo sviluppo postnatale porta alla formazione di due tipi di unità secernenti: gli acini, che si originano da strutture transitorie dette tubuli terminali (Jacoby & Leeson, 1959) o acini primari (Müller, 1968) ed i dotti convoluti granulati che si originano dalla trasformazione delle cellule della parte prossimale dei dotti striati (Jacoby & Leeson, 1959, Tamarin & Screebny, 1965, Cutler & Chaudhry, 1973)

Nell'adulto presenta un dimorfismo sessuale consistente nella diversa rappresentatività della componente secernente. In particolare nei maschi, la componente tubulare (tubuli convoluti granulati) è quantitativamente più rappresentata ed i tubuli sono di calibro maggiore con un contenuto in proteine granulati nettamente superiore rispetto a quelli delle femmine; in quest'ultime è invece più rappresentata la componente acinosa.

La ghiandola pertanto è androgeno-dipendente, ma risulta essere anche target di corticosteroidi ed ormoni tiroidei (Raynaud, 1960; Chretien, 1977) per i quali presenta specifici recettori. Con l'avanzare dell'età il dimorfismo sessuale non risulta più nettamente evidente.

Altra caratteristica dei dotti granulati è quella di produrre nume-

rose proteine regolatrici di notevole interesse biologico quali il fattore di crescita nervoso (NGF) (Levi-Montalcini, 1964; Gresik et al., 1979) ed epiteliale (EGF) (Cohen, 1962), la renina, la callicreina, la cromogranina, l'endotelina (Gresik, 1980; Mori et al., 1992; Gresik et al., 1996).

Risulta quindi evidente la ragione per cui la componente tubulare rappresenti, anche dal punto di vista funzionale, l'elemento più caratteristico della ghiandola sottomandibolare del ratto e che ne giustifica il sempre attuale interesse (Gresik, 1994).

Numerose sono le indagini di tipo morfometrico che evidenziano variazioni quantitative delle diverse componenti ghiandolari in relazione all'età (Scott et al., 1986; Slavin et al., 1989; Komesu et al., 1987; Sashima, 1986; Sashima et al., 1988; Srinivasan & Chang, 1975) e al sesso (Rins De David, 1991; Garcia et al., 2002; Komesu et al., 1987 e 1989), ma risultano scarsi e spesso discordanti i dati quantitativi relativi ai primi stadi di sviluppo postnatale.

Scopo della ricerca è stato pertanto quello di meglio precisare, con l'ausilio di un analizzatore di immagini, le variazioni morfometriche cui vanno incontro nelle prime settimane di vita i dotti striati, da cui derivano i dotti convoluti granulari, ed i dotti intercalati.

## MATERIALI E METODI

Sono stati utilizzati 36 ratti maschi Sprague-Dawley divisi in 6 gruppi di età (1, 2, 3, 4, 5, 6 settimane). Gli animali, stabulati secondo la normativa vigente, sono stati sacrificati con una overdose di anestetico. Le ghiandole sottomandibolari sono state prelevate, fissate in formalina tamponata al 10% e quindi incluse in paraffina. Ciascuna ghiandola è stata poi sezionata in serie con tagli paralleli alle facce e le sezioni di 5 $\mu$  ottenute, sono state colorate con E/E e Blu di Toluidina.

Per i rilievi morfometrici è stata utilizzata una sezione ogni 50 $\mu$  e per ogni sezione sono state considerate cinque aree di riferimento di 0,31 mm<sup>2</sup> ciascuna, scelte a caso all'interno dei lobuli ghiandolari. Per ogni area è stata misurata la superficie ed il diametro dei dotti striati e dei dotti intercalati e l'altezza delle loro cellule di rivestimento, utilizzando un sistema di analisi di immagine (Leica QWin, Leica,

Cambridge, U.K.) ad un ingrandimento di 100x. Dai valori ottenuti per ciascun gruppo di età è stata poi calcolata la superficie percentuale occupata dai dotti striati e intercalati rispetto all'area di riferimento.

## RISULTATI

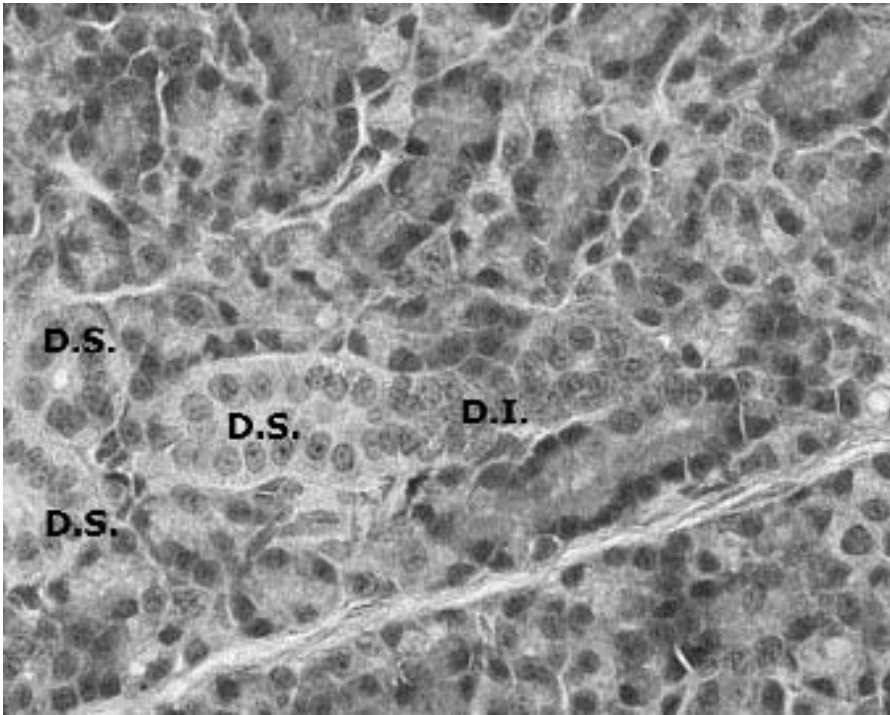
L'osservazione istologica ha permesso di apprezzare differenze strutturali tra i dotti striati ed intercalati. In particolare infatti i dotti striati risultano rivestiti da un epitelio costituito da cellule cubiche o cilindriche, con nucleo centrale voluminoso, rotondo od ovoidale, in cui sono presenti zolle di cromatina addossate alla membrana nucleare e spesso un grosso nucleolo (Figg. 1 e 2). Il citoplasma è nettamente eosinofilo soprattutto nella parte basale della cellula, dove è possibile osservare una caratteristica striatura longitudinale legata alla presenza di abbondanti mitocondri. Nel periodo esaminato non sono state rilevate modificazioni otticamente rilevabili, riferibili ad una loro trasformazione in dotti convoluti granulari.

I dotti intercalati, oggetto delle nostre osservazioni, corrispondono ai dotti intercalati di 1° ordine in quanto quelli di 2° ordine sono evidenziabili solo in periodi successivi alle 6 settimane quando si originano per modificazione della parte distale del tubulo terminale. I dotti intercalati sono ben individuabili in quanto il loro calibro è minore rispetto a quello dei dotti striati con i quali si continuano distalmente (Figg. 1 e 2). Le cellule di rivestimento sono cubiche, con scarso citoplasma e con un voluminoso nucleo che occupa i 3/4 della cellula; la cromatina è uniformemente distribuita e sono evidenti uno o due nucleoli.

I risultati dei nostri rilievi morfometrici sono riassunti nelle Tabelle 1 e 2.

Come risulta dai dati riportati nelle Tabelle, la superficie percentuale occupata dai dotti striati tende ad aumentare con l'età, ed in particolare dalla 4° settimana; anche il loro diametro aumenta, sia pure se in maniera meno marcata, oltrepassando i 40 $\mu$  a 6 settimane. L'incremento in altezza delle cellule risulta invece evidenziabile solo a partire dalla 4° settimana.

La superficie percentuale dei dotti intercalati non subisce invece



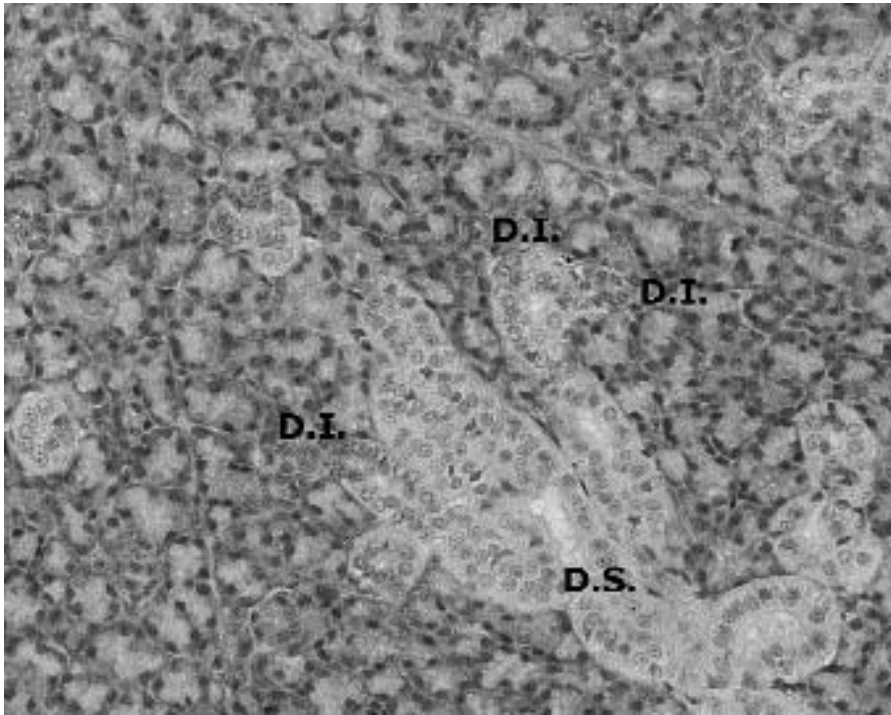
**Fig. 1.** Ghiandola sottomandibolare di ratto maschio di 2 settimane di età. Sono evidenti i dotti striati (D.S.) ed i dotti intercalati (D.I.). E/E 400X. *Submandibular gland of 2 week old male rat. Striated ducts (S.D.) and intercalated ducts (I.D.). E/E 400X.*

variazioni significative, mantenendosi su valori pressoché costanti. Il loro diametro medio tende invece a ridursi come conseguenza della riduzione in altezza delle cellule di rivestimento.

## DISCUSSIONE

L'arco temporale delle nostre osservazioni (1-6 settimane) corrisponde al 1° periodo così definito da Jacoby & Leeson (1959) od al 2° periodo da Mencacci (1968) dello sviluppo della ghiandola sottomandibolare del ratto. È anche definito "fase acinosa" (Srinivasan & Chang, 1975) in quanto caratterizzato dalla comparsa degli acini che derivano dai tubuli terminali.

L'incremento della superficie percentuale (ma anche della superfi-



**Fig. 2.** Ghiandola sottomandibolare di ratto maschio di 5 settimane di età. Ramificazione dei dotti striati (D.S.) che si continuano nei dotti intercalati (D.I.). E/E 200X. *Submandibular gland of 5 week old male rat. Striate ducts (S.D.) ramifications in continuous with intercalated ducts (I.D.). E/E 200X.*

cie assoluta perché riferita ad una stessa area di riferimento) relativa ai dotti striati, da noi rilevata durante lo sviluppo, è diretta conseguenza della fisiologica attività mitotica che ne comporta anche un aumento in lunghezza e diametro. Tali risultati concordano con quanto riportato, anche se non supportato da dati quantitativi, da Jacoby & Leeson (1959).

Srinivasan & Chang (1975) riferiscono che da 4 a 6 settimane di età la percentuale dei dotti striati si riduce dal 16,5% al 9,2%. La discordanza con i nostri dati è in realtà solo apparente in quanto i suddetti autori, evidenziando già dalla 4<sup>o</sup> settimana l'inizio della trasformazione delle cellule dei dotti striati in quelle dei tubuli convoluti granulati, ne separano i dati percentuali da noi invece compresi in quelli relativi ai dotti striati. Le nostre osservazioni non hanno infatti evi-

**Tab. I.** Superficie percentuale media ( $\% \pm DS$ ) dei dotti striati e dei dotti intercalati della ghiandola sottomandibolare di ratto maschio da 1 a 6 settimane di età. *Mean percent surface ( $\% \pm SD$ ) of the striated and intercalated ducts of the male rat submandibular gland from 1 to 6 weeks aged.*

Età (settimane)	Dotti striati %	Dotti intercalati %
1	6,05 $\pm$ 0,9	0,15 $\pm$ 0,02
2	6,90 $\pm$ 0,8	0,19 $\pm$ 0,02
3	7,95 $\pm$ 0,9	0,14 $\pm$ 0,03
4	8,65 $\pm$ 1,2	0,19 $\pm$ 0,03
5	12,80 $\pm$ 1,2	0,15 $\pm$ 0,04
6	13,80 $\pm$ 1,6	0,15 $\pm$ 0,03

**Tab. II.** Media del diametro e dell'altezza ( $\mu \pm DS$ ) delle cellule epiteliali dei dotti striati e dei dotti intercalati della ghiandola sottomandibolare di ratto maschio da 1 a 6 settimane di età. *Mean diameter and height ( $\mu\text{m} \pm SD$ ) of the striated and intercalated epithelial cells of the ducts of the male rat submandibular gland from 1 to 6 weeks aged.*

Età (sett.)	Diametro d. striati	Diametro d. intercalati.	Altezza cellule d. striati	Altezza cellule d. intercalati
1	34,45 $\pm$ 6,2	22,30 $\pm$ 2,5	13,20 $\pm$ 2,1	10,20 $\pm$ 1,8
2	35,50 $\pm$ 3,1	22,30 $\pm$ 1,7	14,80 $\pm$ 1,6	10,41 $\pm$ 1,9
3	35,70 $\pm$ 5,3	21,90 $\pm$ 1,9	13,20 $\pm$ 2,0	10,15 $\pm$ 2,1
4	38,10 $\pm$ 4,8	24,90 $\pm$ 1,7	13,50 $\pm$ 1,9	9,24 $\pm$ 1,7
5	38,90 $\pm$ 5,4	19,60 $\pm$ 2,1	16,20 $\pm$ 1,9	9,01 $\pm$ 1,8
6	40,80 $\pm$ 3,5	19,50 $\pm$ 2,3	15,90 $\pm$ 3,1	9,20 $\pm$ 1,8

denziato, a parità di età, la loro trasformazione in tubuli convoluti granulari.

Anche relativamente all'estensione dei dotti intercalati i dati da noi ottenuti non concordano con quelli degli stessi autori che ne riportano una rappresentatività del 20% circa, probabilmente perché ricavati con una metodica sperimentale poco attendibile data la scarsità di cellule conteggiate per ghiandola. I loro dati contrastano anche con quelli ottenuti da Sashima (1986) che riporta come a 9 settimane il volume percentuale occupato da quelli indicati come "altri dotti" e



cioè i dotti intercalati ed interlobulari (il cui calibro è in assoluto il maggiore) rappresenti solo il 6%.

Una possibile spiegazione dell'aumento in estensione dei dotti striati e la contemporanea costanza di quelli intercalati da noi rilevato, potrebbe dipendere dal fatto che i dotti striati, pur aumentando la loro lunghezza divenendo convoluti, non si ramificano ulteriormente e quindi non originano ulteriori dotti intercalati. Un'altra ipotesi a giustificazione del non incremento dell'estensione dei dotti intercalati potrebbe essere la trasformazione delle cellule dei dotti intercalati in quelle dei dotti striati, così come riportato da Chang (1974), da Alvares & Sesso (1975) e confermate da Yohoro, (1970) e Gresik & Mac Rae, (1975) nel topo.

Possiamo quindi concludere che nella fase "acinosa" di sviluppo della ghiandola sottomandibolare di ratto, oltre alla formazione degli acini a partire dalle cellule dei tubuli terminali, con conseguente scomparsa di questi ultimi, i dotti intralobulari striati aumentano la propria estensione prevalentemente per un loro aumento in lunghezza che porterà successivamente al loro caratteristico andamento convoluto.

## BIBLIOGRAFIA

- ALVARES E.P., SESSO A. (1975). Cell proliferation, differentiation and transformation in the rat submandibular gland during early postnatal growth. A quantitative and morphological study. *Arc. Histol. Jpn.*, 38 (3): 177-208.
- CHANG W.W. (1974). Cell population during acinus formation in the postnatal rat submandibular gland. *Anat Rec.*, 178: 187-202.
- CHRETIEN M. (1977). Action of testosterone on the differentiation and secretory activity of a target organ: the submaxillary gland of the mouse. *Int. Rev. Cytol.*, 50: 333-396.
- COHEN S. (1962). Isolation of mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J. Biol. Chem.*, 237: 1555-1562.
- CUTLER L., CHAUDRY A.P. (1973). Release and restoration of the secretory granules in convoluted granular tubules of the rat submandibular gland. *Anat. Rec.*, 176: 405-420.
- CUTLER L., CHAUDRY A.P. (1975). Cytodifferentiation of striated duct cells of the convoluted granular tubules of the rat submandibular gland. *Am. J. Anat.*, 143: 201-217.
- GARCIA FERNANDEZ H., GARCIA-POBLETE E., MORO-RODRIGUEZ E. (2002). Histomorphometrical study of the submandibular gland ductal system in the rat. *Histol. Histopathol.*, 17: 813-816.



- GRESIK E.W., MAC RAE E.K. (1975). The postnatal development of the sexually dimorphic duct segment and of amylase activity in the submandibular glands of mice. *Cell. Tissue Res.*, 157: 411-422.
- GRESIK E.W., VAN DER NOEN H., BARKA T. (1979). Epidermal growth factor-like material in rat submandibular gland. *Am. J. Anat.*, 156: 83-89.
- GRESIK E.W. (1980). Postnatal developmental changes in submandibular glands of rats and mice. *J. Histochem. Cytochem.*, 28 (8): 860-870.
- GRESIK E.W. (1994). The granular convolute tubule (GCT) cell of rodent submandibular glands. *Micr. Res. Techn.*, 27: 1-24.
- GRESIK E.W., HOSOJ K., KURIHARA K., MARUYAMA S., UEHA T. (1996). The rodent granular convoluted tubule cell-an update. *Eur. J. Morphol.*, 34 (3): 221-224.
- JACOBY F., LEESON C. (1959). The postnatal development of the rat submaxillary gland. *J. Anat.*, 93: 201-216.
- KOMESU M.C., LOPES R.A., PETENUSCI S.O., SILVA-NETTO C.R., CAMPOS G.M., PAULA-LOPES O.V. (1987). Morphometric study of changes in the submandibular gland of aging rats. 1. Acini. *Arq. Cent. Estud. Curso Odontol.*, 24 (1-2): 9-26.
- KOMESU M.C., LOPES R.A., PETENUSCI S.O., SILVA-NETTO C.R., CAMPOS G.M., PAULA-LOPES O.V. (1989). Morphometric study of changes in the submandibular gland of aging rats. 2. Ducts. *Rev. Faculdade Odontol. Lins.*, 2 (1): 11-20.
- LEVI-MONTALCINI R. (1964). The nerve growth factor. *Ann. New York Acad. Sci.*, 118: 149-170.
- MENCACCI P. (1968). La morfologia della ghiandola sottomandibolare di ratto durante lo sviluppo post-natale. *Boll. malattie orecchi, naso e gola*, 1-20. MANCA NUMERO DI RIVISTA
- MORI M., TAKAI Y., KUNICATA M. (1992) Review: Biologically active peptides in the submandibular gland- role of the granular convoluted tubule. *Acta Histochem. Cytochem.*, 25: 325-341.
- MÜLLER H.B. (1968) Die Speicheldrüsen junger ratten nach parasymphatektomie. *Z. Zellforsch.*, 88: 80-104.
- RINS DE DAVID M.L., FINKELBERG DE STERIN A., GOLDRAIJ A. (1991). Influence of gonadic hormones on the rat submaxillary gland. *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, 99: 107-109.
- RAYNAUD J. (1960). Control hormonal de la glande sous-maxillaire de la Sourie. *Bull. Biol.*, 94: 400-525.
- SASHIMA M. (1986). Age-related changes of rat submandibular gland: a morphometric and ultrastructural study. *Oral Pathol.*, 15: 507-512.
- SASHIMA M., HATAKEYAMA S., SATOH M., SUZUKI A. (1988). Age-related changes of the granular intercalated duct cells of male rat submandibular gland. *Archs. Oral Biol.*, 33 (1): 71-73.
- SCOTT J., BODNER L., BAUM B.J. (1986). Assessment of age-related changes in the submandibular and sublingual salivary glands of the rat using stereological analysis. *Archs. Oral. Biol.*, 31 (1): 69-71.
- SCREEBNY L.M., MEYER J., BACHEM E., WEINMAN J.P. (1955). Postnatal changes in proteolytic activity and in the morphology of the submaxillary gland in male and female albino rats. *Growth*, 19: 57-74.

- SLAVIN B.G., PAULE W.J., BERNICK S. (1989). Morphological changes in the submandibular gland of aging rats. *Gerontology*, 8 (2): 53-58.
- SRINIVASAN R., CHANG W.W. (1975). The development of the granular convoluted duct in the rat submandibular gland. *Anat. Rec.*, 182: 29-40.
- TAMARINE A., SREEBNY L. (1965). The rat submaxillary salivary gland. A correlative study by light and electron microscopy. *J. Morphol.*, 117: 295-352.
- YOHORO T. (1970). Development of secretory units of mouse submandibular gland. *Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat.*, 110: 173.