



**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NA GLÂNDULA PARÓTIDA
PROVOCADAS PELO RUÍDO DE BAIXA FREQUÊNCIA**

PEDRO MIGUEL ANTUNES OLIVEIRA

Dissertação de doutoramento em Ciências Biomédicas

2008

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NA GLÂNDULA PARÓTIDA
PROVOCADAS PELO RUÍDO DE BAIXA FREQUÊNCIA**

PEDRO MIGUEL ANTUNES OLIVEIRA

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NA GLÂNDULA PARÓTIDA
PROVOCADAS PELO RUÍDO DE BAIXA FREQUÊNCIA**

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Ciências Biomédicas, submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientação científica pelo Doutor Martins dos Santos, professor associado do Instituto de Ciências da Saúde Egas Moniz e co-orientação pelo Professor Doutor Artur Águas, professor catedrático do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar.

À Sofia

Ao Henrique

“Naquela mesma noite Deus apareceu a Salomão, e disse-lhe: Pede o que queres que eu te dê (...)” (2 Crônicas 1,7)

“Dá-me, pois, agora, sabedoria e conhecimento (...)” (2 Crônicas 1,10)

“Assim excedeu o rei Salomão a todos os reis da terra (...)” (2 Crônicas 9,22)

ÍNDICE

Agradecimentos	8
Preâmbulo	15
Introdução	17
Som e Ruído de Baixa Frequência – Propriedades Físicas	19
<i>Som e Ruído</i>	19
<i>Física do Ruído</i>	19
<i>Ruído de Baixa Frequência; Fenómeno Acústico e Vibração</i>	20
<i>Nível Sonoro</i>	21
Avaliação do Ruído Ambiental e Ruído de Baixa Frequência	23
<i>Avaliação do Ruído</i>	23
<i>Ruído Ambiental e Ruído de Baixa Frequência</i>	24
<i>Fontes de Ruído de Baixa Frequência</i>	26
Ruído de Baixa Frequência, Tecidos Biológicos e Doença Vibro-acústica	28
<i>Ruído de Baixa Frequência, Vibração e Tecidos Biológicos</i>	28
<i>Ruído de Baixa Frequência e Doença Vibro-acústica – Epistemologia</i>	34
Glândula Parótida e Ruído de Baixa Frequência	37
<i>Morfologia Normal da Glândula Parótida – Anatomia do Rato Albino (Wistar)</i>	37
<i>Efeitos do Ruído de Baixa Frequência na Glândula Parótida</i>	40
Objetivos	42
Material e Métodos	43
Modelo Animal	45
Protocolo Experimental	45
<i>Exposição ao Ruído de Baixa Frequência</i>	45
Morfologia – Microscopia Óptica	47
Morfometria – Análise Estatística	47
<i>Recolha de Dados e Análise Estatística de Resultados</i>	48
Morfologia – Imunohistoquímica	49
Morfologia – Microscopia Electrónica de Transmissão	50
Morfologia – Estudo Vascular Macroscópico	50
Resultados	51
Morfologia – Microscopia Óptica	53
Morfometria – Análise Estatística	71
Morfologia – Imunohistoquímica	77
Morfologia – Microscopia Electrónica de Transmissão	91
Morfologia – Estudo Vascular Macroscópico	104
Discussão	107
Conclusões	132
Resumos	136
Referências Bibliográficas	157

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Martins dos Santos

Tenho o privilégio, raro, de ter em si um verdadeiro mestre. O que ensina com o exemplo.

Tenho também o enorme privilégio de poder contar com o dom da sua amizade, com o benefício dos seus conselhos, com a fortuna das pequenas lições, que só uma sincera dedicação, de que não me considero merecedor, permite.

Mais fica por dizer nesta necessariamente imperfeita, por curta, elocução, um forte abraço do seu amigo, com quem pode sempre contar,

muito obrigado.

Gostaríamos de deixar o nosso sentido agradecimento a todos os que nos ajudaram a levar por diante a concretização deste trabalho e muito especialmente,

Ao Professor Doutor Nuno Grande, referência incontornável das Ciências Médicas em Portugal, de quem pudémos ter o privilégio do acompanhamento inicial deste trabalho com a sua orientação e conselhos que são verdadeira sabedoria.

Ao Professor Doutor Artur Águas, que com a sua postura como Cientista e Académico tem sido incentivo e fonte de inspiração para os nossos trabalhos, pela constante disponibilidade e pela confiança que em nós depositou.

À Professora Doutora Maria João Oliveira que acompanhou e enriqueceu este trabalho na apresentação de final de primeiro ano.

Ao Dr. Castelo Branco a quem muito devemos e a quem deve ser atribuída a “paternidade” da doença vibroacústica que nos motivou para este estudo.

À Dr.^a Eduarda Monteiro da Silva pelo entusiasmo e empenho que colocou no nosso trabalho. Sem a sua inexcédível ajuda, como anátomo-patologista, este trabalho não teria, certamente, sido possível.

Ao Professor Doutor Jorge Fonseca, que nos precede com o seu estudo sobre os efeitos do Ruído de Baixa Frequência no estômago e duodeno do rato Wistar pelos constantes incentivos, conselhos e ajudas para o nosso trabalho.

Ao meu colega Dr. José João Mendes pela amizade e companheirismo que demonstrou ao longo das muitas horas de trabalho conjunto no desenvolvimento do protocolo experimental.

Ao Sr. Emanuel Monteiro do Serviço de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar pelo extraordinário profissionalismo com que preparou toda a microscopia electrónica de transmissão.

À Dr.^a Rita Certã e ao Dr. José Ferreira do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz pelo zeloso trabalho das preparações histológicas e imunohistoquímicas para microscopia óptica.

À Eng.^a Mariana Alves-Pereira que tem um absoluto entusiasmo pelo estudo dos efeitos do Ruído de Baixa Frequência sobre os tecidos biológicos e que trouxe novas perspectivas e ideias, algumas das quais ousámos utilizar.

Ao Professor Doutor José Brito pela análise estatística dos resultados morfométricos.

Ao Professor Doutor João Oliveira, do Instituto Superior Técnico, pela magnífica forma como nos ajudou a compreender os conceitos físicos relacionados com as baixas frequências e os fenómenos físicos ligados ao som e ao ruído.

À Sr.^a D. Teresa Nesbitt Gonçalves pela cuidadosa tradução do resumo para Francês.

Ao Arq.^o Duarte Azevedo Pinto pela amizade e pelas ajudas na revisão do texto.

Ao Professor Doutor António Mata e ao grupo da Biologia Oral do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz pela empenhada colaboração na realização dos estudos funcionais.

Ao Sr. Jorge Proença do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz pela aplicada colaboração na manutenção dos animais que utilizámos para este estudo.

Ao Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz e ao seu director Professor Doutor Queiróz de Medeiros e ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar e ao seu director Professor Doutor António de Sousa Pereira pelos apoios concedidos para a realização deste projecto.

Aos meus colegas do Serviço de Anatomia, Professor Doutor Carlos Zagalo, Professor Doutor José Grillo, Professor Doutor Vítor Tavares, Dr.^a Alzira Cavacas e Dr. António José de Sousa pelo ambiente e pelo espírito de equipa e de entre-ajuda.

A todos os que de alguma maneira puderam contribuir para a realização deste trabalho.

PREÂMBULO

O ruído é, desde há muito, um importante problema ambiental para o homem (*Berglund et al., 1999*) e, por norma, indesejado.

Sob o ponto de vista dos efeitos nocivos, o ruído é um agente que, além de perturbador – *Júlio César, 100 a 44 a.C., proíbe a circulação das bigas (carros de rodas), em certas zonas de Roma, durante certas horas do dia, especialmente à noite* – pode provocar lesões no aparelho auditivo (*Davis et al., 1950*). Este último facto é há muito conhecido pela comunidade científica – *Plínio o Velho, 23-79 d.C., relatou na sua Naturalis Historia o ensurdecimento das pessoas que viviam próximo das cataratas do Nilo, relacionando exposição ao ruído e surdez* – para além de ser algo intuitivo na generalidade da população.

Os trabalhos publicados até finais do séc. XIX baseavam-se fundamentalmente em descrições e observações clínicas de perda total ou parcial, mais ou menos reversível, da audição. Os primeiros trabalhos com descrições anátomo-patológicas pertencem a Habermann que, em 1890, verificou alterações degenerativas, em caldeireiros, em células situadas na porção basal da cóclea. Já Wittmack, em 1907, foi o precursor de estudos experimentais em animais de laboratório, com descrição dos resultados histopatológicos provocados pelo ruído na cóclea.

Numerosos estudos, clínicos e experimentais, que se seguiram, já no início do séc. XX, levaram a que, entre os anos 30 e 50, alguma - tímida - preocupação com a protecção auditiva dos trabalhadores fosse implementada e traduzida sob o ponto de vista legal. Contudo, só nos anos 70 se generalizou nos Estados Unidos e na Europa a regulamentação da protecção auditiva, nos locais de trabalho ou outros próximos de fontes de ruído.

Em Portugal, foi também no final dos anos 70 que vários sintomas, em indivíduos expostos a ruídos intensos, despertaram a atenção de um grupo de médicos e investigadores das Oficinas Gerais de Material Aeronáutico. Com a realização de numerosos estudos, fundamentalmente clínicos, foi crescendo a convicção de que os efeitos extra-auditivos do ruído poderiam constituir uma parte não negligenciável dos efeitos nocivos dos fenómenos acústicos.

A caracterização dos ambientes sonoros em que estas alterações ocorriam permitiu a percepção de que o espectro de frequências desses ambientes se concentrava nas baixas frequências, portanto os indivíduos estariam expostos a ruído de baixa frequência (RBF) de alta intensidade.

O aprofundamento do estudo das várias alterações encontradas levou à definição da doença vibroacústica, como resultado da exposição crónica a ambientes acústicos ricos em RBF (*Castelo Branco et al., 1999e*) e à criação do Centro para a Performance Humana. Em Portugal, entre estudos clínicos e experimentais, outros grupos de investigadores conjugaram esforços no sentido de tentar estudar o fenómeno, inicialmente, do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar e mais recentemente do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz. Estes investigadores descreveram lesões no sistema respiratório - na traqueia (*Sousa Pereira et al., 1999a; Oliveira et al., 2002a, 2002b*), nos pulmões (*Grande et al, 1999*), nos brônquios (*Oliveira et al., 2005*) e na pleura (*Sousa Pereira et al., 1999b; Oliveira et al., 1999, 2003*); alterações imunológicas (*Águas et al., 1999a, 1999b*); no sistema urinário (*Martins dos Santos et al., 2005*); lesões no sistema vascular - em artérias (*Martins dos Santos et al., 2002*) e linfáticos (*Martins dos Santos et al., 2004*); no sistema digestivo - no estômago (*da Fonseca et al., 2006b*) e no duodeno (*da Fonseca et al., 2006a*) e também no periodonto (*Mendes et al, 2007*) e na glândula parótida (*Oliveira et al., 2007*).

Nos últimos anos, investigadores de vários grupos têm contribuído para o estudo e compreensão das alterações induzidas pela exposição ao RBF, não havendo no entanto referências a estudos morfológicos prévios sobre a glândula parótida aos que foram iniciados pelo nosso grupo.

Este trabalho tem por objectivo principal esse estudo, pretendendo também, ser mais um contributo para a compreensão do problema do RBF e sua acção sobre os tecidos biológicos.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Som e Ruído de Baixa Frequência – Propriedades Físicas

Som e Ruído

O som e o ruído são, sob ponto de vista físico, a mesma entidade. A diferença entre eles advém da percepção das suas qualidades acústicas pelo ouvinte. O ruído é normalmente encarado como um som indesejado, não deixando no entanto de ser, tal como o segundo, não mais do que um conjunto de partículas transportado em ondas acústicas pelo ar, mas com características diferentes.

As ondas acústicas, a que corresponde uma pressão sonora, são detectadas no ouvido por um processo mecânico que as converte em vibrações. Estas são posteriormente convertidas em sinais eléctricos que, no cérebro, condicionam a percepção do som, ou de ruído. Este fenómeno também pode ocorrer extra-auditivamente por transmissão das flutuações dinâmicas de pressão aos tecidos (*Montalvão Silva et al., 1988*). A percepção é função do indivíduo, do ambiente cognitivo e de experiências anteriores.

Física do Ruído

O ruído corresponde a uma onda acústica. Essa onda resulta da existência de zonas de compressão do ar, alternadas com zonas onde o ar está menos comprimido. Partindo do pressuposto que uma onda acústica se propaga com valor constante podemos definir num som zonas de compressão com um determinado comprimento de onda – λ – em metros.

Sabendo que, à temperatura ambiente, a velocidade do som – C – é aproximadamente de 340ms^{-1} , poderemos calcular a frequência – f – de oscilações de uma onda por segundo (Hz):

$$f = \frac{C}{\lambda}$$

Por exemplo, a um comprimento de onda de 340m corresponde uma frequência de 1Hz , ou seja uma única oscilação na onda acústica para aquela distância.

Ruído de Baixa Frequência (RBF); Fenómeno Acústico e Vibração

O ouvido humano detecta frequências no intervalo entre 20Hz e 20000Hz . Referimo-nos por isso a esse intervalo de frequências como sendo audíveis e a frequências menores que 20Hz como infrasons. Podemos, no entanto, ter infrasons perceptíveis como som, se de intensidade suficiente. Podemos ainda detectar frequências mais baixas, até alguns Hz. Num trabalho de um investigador russo, de que pudemos apenas aceder ao resumo (Svidovyi, 1987) sugere-se que o mecanismo de percepção destas baixas frequências a nível extra-auditivo, se encontra relacionado com alterações hemodinâmicas nos tecidos e nas células, provocadas pelas ondas de pressão sonora.

O ruído de baixa frequência (RBF) corresponde a um espectro de frequências que se estende, para alguns autores, dos 10Hz aos 200Hz e para outros, com um limite superior até aos 500Hz , sendo este último o critério usado em Portugal, pelo que inclui ruído audível e infrasons.

O ambiente circundante interfere mais com as altas frequências do que com as baixas frequências. Elementos físicos, como existência de paredes, chão, vento ou variação da temperatura não afectam a propagação das baixas frequências da mesma maneira do que as altas frequências. A atenuação do som, fenómeno como é conhecida a interferência do ambiente na propagação da onda acústica, é assim, mais baixa nas baixas frequências. Este facto torna mais difícil criar barreiras que absorvam frequências inferiores a 500Hz .

Outra das características dos sons de baixa frequência é a dos fenómenos de ressonância que ocorrem quando o comprimento de onda tem pelo menos o dobro da dimensão entre duas superfícies. Para frequências entre 10Hz e 200Hz, os comprimentos de onda situam-se entre 1,7m e 34m. Tendo em conta a dimensão média das divisões e o facto de múltiplas frequências estarem presentes numa fonte sonora rica em baixas frequências será fácil imaginar que ocorrerão frequentemente fenómenos de ressonância nos espaços onde nos encontramos. Esse fenómeno também poderá ocorrer em espaços mais pequenos, como cabines ou *cockpits*, para frequências até 500Hz.

A ressonância tem influência na distribuição da intensidade sonora num espaço fechado, aumentando-a em determinadas localizações e diminuindo-a noutras. O comportamento físico das baixas frequências faz com que estas, frequentemente, se associem a vibrações através de fenómenos de ressonância. Para o corpo humano estas vibrações são diferentes das transmitidas directamente através do contacto com uma fonte vibrátil, por exemplo, através dos membros. No caso das vibrações originadas por ruído de baixa frequência através de fenómenos de ressonância a estimulação é aplicada sobre toda a superfície corporal ("*whole body exposure*") e frequentemente referida pelos sujeitos como sendo mais intensa no tórax e na cabeça (*Mohr et al., 1965; Slarve et al., 1975*).

Nível Sonoro

O ouvido humano detecta variações de pressão sonora. A um determinado som corresponde uma pressão sonora, definida como a quantidade de variação de pressão no ar provocada por uma onda sonora relativamente à pressão atmosférica (Newton/m²).

O nível sonoro que é expresso em decibéis (dB), corresponde à tradução logarítmica da resposta do ouvido humano às mudanças da pressão sonora.

No que diz respeito à pressão sonora, é matematicamente definida como o produto de dez pelo logaritmo de base dez entre o quadrado de uma determinada pressão sonora – P^2 – e o quadrado da variação de pressão mínima audível pelo ouvido humano (*hearing threshold*) – P_0^2 – em que a pressão sonora $P_0 = 2 \times 10^{-5}$ Newtons/m². Logo:

$$I(\text{dB}) = 10 \log_{10} \left[\frac{P^2}{P_0^2} \right]$$

A conversão logarítmica destas características sonoras permite a compressão de uma enorme variedade de quantidades para uma escala menor, por exemplo: se um som for 2 vezes mais forte que outro, então $10 \log 2 = 3 \text{dB}$; se um som for 1000000 vezes mais forte que o outro então $10 \log 1000000 = 60 \text{dB}$.

Quando efectuamos medições para os valores de dB usamos como referência de comparação $P_0 = 2 \times 10^{-5} \text{Newtons/m}^2$ sendo que se não houver variação obtemos $10 \log 1 = 0 \text{dB}$, o valor mínimo perceptível ao ouvido humano ("*hearing threshold*"). Quer isto dizer que 0dB não corresponde a ausência de som, mas sim a uma variação da pressão sonora igual à do nível de referência.

Avaliação do Ruído Ambiental e RBF

Avaliação do Ruído

O ouvido humano é, como referido acima, um detector da variação da pressão sonora. O som é, em geral, captado por microfones que respondem de maneira aproximadamente proporcional à pressão sonora. Estas medições permitem-nos avaliar a variação no nível sonoro em dB.

Já referimos que o ouvido humano não responde de igual modo a todas as frequências. A nossa capacidade discriminativa encontra-se entre os 20Hz e os 20000Hz, sendo mais sensível para frequências entre os 1000Hz e os 4000Hz.

A maioria dos equipamentos utilizados para avaliação do ruído ambiental incorporam filtros de ponderação, que procuram imitar a resposta do ouvido humano, o qual não possui uma resposta espectral linear. Deste modo o nível sonoro medido corresponde ao nível de som ouvido, ou seja com mais sensibilidade para sons cujas frequências se encontrem entre os 1000Hz e os 4000Hz.

Um dos filtros mais utilizados nas avaliações de ruído é o “*A weighting filter*”, que apresenta os resultados em dB (A) ou dBA. Estas medições destinam-se a avaliar se determinado ruído ultrapassa o limiar de irreversibilidade de efeitos para o órgão de Corti, ou seja, baseiam-se no facto de níveis elevados de ruído poderem levar a perdas auditivas.

O uso do medidor com o filtro dBA é, como podemos perceber, muito menos sensível para frequências muito altas ou muito baixas, para além de partir do pressuposto errado de que as lesões do aparelho auditivo são um exclusivo das altas intensidades, numa determinada análise de distribuição de frequências. Este facto levanta um problema na avaliação real do ruído presente num espaço, ou ambiente, na medida em que avalia as intensidades das energias acústicas presentes, mas num espectro reduzido de frequências.

Se para o estudo dos efeitos auditivos do ruído, a avaliação com o filtro dBA está adequada e é aceite pela comunidade científica, para as baixas frequências uma medição em dBA torna-se, para além de inexacta, insuficiente. No entanto, a existência de um ambiente rico em baixas frequências não exclui a possibilidade de existirem também altas frequências.

A medição desejável, para avaliação das baixas frequências, seria então uma medição não ponderada que reflectisse a variação real da pressão sonora (*dB.SPL – Sound Pressure Level*), ao longo do tempo, independentemente de a mesma ser audível ou não, ou seja, RBF incluindo infrasons.

Ruído Ambiental e RBF

Não existem ambientes puros no que diz respeito a ruído (*Castelo Branco et al., 1999a*). Assim, muitos dos ambientes acústicos correspondem a mais do que uma fonte de ruído (*Berglund et al., 1999*). Para estes ambientes, os efeitos sobre a saúde estarão associados à exposição total ao ruído, mais do que com a relação com uma só fonte do mesmo (*WHO, 1980*). Assim, podemos compreender a afirmação de Guski:

“Annoyance is regarded by experts from 7 nations as the most important adverse effect of environmental noise (Guski et al. 1999).”

“Annoyance” – incómodo em tradução literal – tem sido sistematicamente associado ao ruído ambiental (*Berglund et al., 1997; Paulsen et al., 1995; Bradley, 1994; Fidell et al., 1991; Hall et al., 1985; Schulz, 1978*). O *incómodo*, provocado por um ruído ambiental, está definido como uma sensação desagradável, associada a um agente ou condição, que um indivíduo ou grupo sabem estar a afectá-los negativamente (*Lindvall et al., 1973; Koelega, 1987*). Outros autores referem, para além do *incómodo*, uma série de emoções negativas entre as quais se incluem raiva, desapontamento, insatisfação, depressão, ansiedade, distracção, agitação ou exaustão (*Karpova et al., 1970; Brown et al., 1975; Job, 1993; Fields et al. 1997; Pawlaczyk-Luszczyńska et al., 2003*).

O ruído ambiental mencionado por Guski não está caracterizado sob o ponto de vista de frequência. Assim, a conveniência da existência de um termo abrangente, mas

subjectivo, para a definição de um conjunto de consequências provocadas pelo ruído ambiental parece colidir com a necessidade de definir objectivamente as alterações por ele causadas e com a caracterização objectiva, sob ponto de vista físico, desse mesmo ruído ambiental. Se assim não for, poderá ser difícil compreender na sua totalidade, os mecanismos efectivos pelos quais ocorrem lesões tão diferentes como as reconhecidas, por exemplo, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), e atribuídas ao ruído ambiental, como: doenças cardiovasculares (*Passchier-Vermeer et al., 1993; Berglund et al., 1995*); perturbações do sono (*Griefahn et al., 1998*) ou alterações cognitivas e deterioração do estado mental (*Stansfeld et al., 1996*).

Para este mesmo conceito – *incómodo* – que é usado para qualificar mas também para quantificar os efeitos do ruído ambiental sob o ponto de vista do sujeito (*Broner et al., 1978; Moller, 1987; Poulsen et al., 2002*), transformando uma definição psico-somática numa escala semântica (*Leventhall, 2004*), *Persson et al. (1985; 1990)* relatam que há uma larga variabilidade no *incómodo* referido pelos sujeitos, que o *incómodo* é superior nas baixas frequências, e que a escala em dBA – usada por norma para avaliações do ruído ambiental – subavalia o *incómodo* sentido para frequências inferiores a 200Hz.

Outros autores elaboraram escalas de resposta em função do *incómodo*, para estudar especificamente o ruído de baixa frequência e puderam concluir que entre a resposta auditiva e o *incómodo*, sentido como vibração no tórax, a percepção auditiva seria o factor limitante (*Inukai et al., 2000; Nakamura et al., 1998*). Esta poderá ser uma das razões pelas quais os trabalhadores que usam protecção auditiva ficam mais expostos ao RBF. Expõem-se mais pois não é tão forte a sensação de *incómodo*. Este fenómeno já tinha aliás sido descrito por Cohen (1976) num estudo realizado em trabalhadores, que exerciam a sua actividade em ambientes ruidosos, e que após a introdução de protecção auditiva manifestavam agravamento de sintomatologia digestiva previamente identificada e atribuída ao ruído.

Apesar de limitados, sob ponto de vista clínico, estes conceitos tiveram uma importância vital, como veremos, na mudança de mentalidades relativamente ao ruído ambiental e às suas consequências para o Homem. Nos anos 70, em países como a Dinamarca ou a Suécia, a avaliação do ruído ambiental era feita em dBA, em função da possibilidade de causar lesões auditivas, e não considerava as baixas frequências e os infrasons. Foi após a definição do conceito de *incómodo*, que alguns autores associaram especificamente ao RBF (*Persson-Waye et al., 2001*), ou ao RBF quando comparado com o ruído de banda larga (*Pawłaczyk-Luszczynska et al., 2003*), e que outros referiram

como sendo o efeito primário do RBF (*Broner, 1978*) e, da melhoria dos conhecimentos sobre a audição nas baixas frequências, que surgiu a percepção de que a não avaliação do RBF poderia subvalorizar a avaliação da sensação de *incómodo* (*Piorr et al., 1989; Vercammen, 1989*).

Mais recentemente, a associação de ruído ambiental com forte componente de RBF, como o provocado por tráfego intenso ou por voos de aviões de combate a baixa altitude, a doenças cardiovasculares (*Babisch, 2000; Passchier-Vermees et al., 2000*), a perturbações do sono (*Ising et al. 2002*), ou a alterações cognitivas (*Miedema et al., 1998*) levou a que as recomendações para exposição ao ruído não se apresentassem só em função dos efeitos auditivos, dBA, mas com outros filtros mais sensíveis às baixas frequências, que existem em muitos destes ambientes (*Ising et al., 2004*).

Assim, se parece inequívoca a relação do ruído ambiental com várias alterações patológicas, percebe-se que o estudo aprofundado dos efeitos específicos do RBF, componente importante do ruído ambiental sobre o corpo humano, justifica uma avaliação mais rigorosa e específica para esse mesmo RBF.

Fontes de RBF

Desde a Revolução Industrial, no séc. XIX, com o aparecimento de motores rotativos ou de função cíclica, com o desenvolvimento dos transportes e de indústrias (*Larsen, 1946*), o RBF está presente, de forma mais ou menos constante, numa grande diversidade de ambientes de âmbito profissional, residencial ou de lazer.

Na aeronáutica, nos têxteis, na indústria da madeira, nos transportes ferroviários, rodoviários (*Janhunen, 1984*), aéreos, marítimos, na construção civil ou outras (*Winiarski, 1983*), existem fontes de RBF a que os trabalhadores estão expostos continuamente, por vezes durante anos.

Também nos ambientes urbanos, existem numerosas fontes de RBF. Em algumas zonas residenciais, por proximidade a aeroportos, a certos tipos de indústrias, ou áreas de tráfego intenso, ou mesmo pela presença de máquinas ou sistemas de ventilação nas habitações, pode haver contaminação do ambiente acústico. Burt (1996) demonstrou que

a componente de baixas frequências num ruído com origem num sistema de ventilação pode sofrer ampliações numa sala fechada e com bom isolamento.

Também nas zonas de lazer, a existência de amplificadores de alta potência tem aumentado a componente de baixas frequências. A percepção cognitiva tem nestes ambientes implicações na exposição dos sujeitos, porque a conjugação de uma sensação agradável proporcionada por um som musical – ou aproximadamente musical (!) – rico em RBF, com uma intensidade de ruído não suficientemente alta, pode permitir um aumento do tempo de exposição ao agente, uma vez que não se instala a sensação de incómodo.

RBF, Tecidos Biológicos e Doença Vibro-Acústica (DVA)

RBF, Vibração e Tecidos Biológicos

“It should be noted that a large proportion of low frequency components in a noise may increase considerably the adverse effects on health” (Berglund et al., 2000).

A citação transcrita, do relatório “Community Noise” da Organização Mundial de Saúde (OMS), permite inferir que a componente de baixas frequências num ruído e a exposição ao RBF é já hoje encarada pelos especialistas como algo de preocupante, pela possibilidade de efeitos nocivos em vários sistemas do organismo. O mesmo relatório conclui, entre outros, que a evidência dos efeitos das baixas frequências no Homem é, hoje em dia, suficientemente grande para justificar preocupações imediatas (*Berglund et al., 2000*).

Os efeitos clínicos do RBF, no Homem, estão descritos, desde os anos 50, por investigadores de países como a Rússia, China, Checoslováquia, entre outros. Por razões de ordem geopolítica grande parte dessa bibliografia é, ainda hoje, quase inacessível aos investigadores do “ocidente”. Ainda assim, do que se conhece dos trabalhos dos investigadores destes países, têm sido associadas ao RBF alterações comportamentais e psíquicas, de hipertensão ou gástricas. Mais recentemente muitos trabalhos e descrições clínicas, de proveniências variadas, têm sido apresentados.

Já sob o ponto de vista anátomo-patológico, talvez seja em Portugal que melhor se conhecem os efeitos do RBF sobre os tecidos biológicos. A fibrose dos tecidos e a proliferação das matrizes extracelulares, bem como as alterações dos epitélios na ausência de processos inflamatórios, e as alterações celulares de tipo degenerativo, são os elementos mais frequentemente descritos (*Alves-Pereira et al., 2007*). Estas alterações têm um papel fundamental na compreensão do espectro de alterações induzidas pelo RBF.

Também há muito que se conhecem, clinicamente e sob o ponto de vista anátomo-patológico, os efeitos nocivos da vibração transmitida directamente. Das propriedades físicas do som sabe-se que o ruído nos ambientes ricos em baixas frequências está

associado a vibração, por fenómenos de ressonância, que é transmitida através de superfícies, como o solo ou uma parede, ou através do ar, pela pressão da onda acústica (*Alves Pereira, 1999*). Assim, seria expectável, que algumas das alterações patológicas causadas pela exposição a vibração por contacto também pudessem ocorrer na exposição a ambientes ricos em RBF (*Castelo Branco et al., 1999a*).

As lesões vasculares são um exemplo que parece inscrever-se no acima referido sob o ponto de vista anátomo-patológico.

Em 1984 *Takeuchi et al.* relataram o aparecimento de espessamento da íntima, em biópsias de pele, nos dedos de trabalhadores que usavam instrumentos vibratórios. Os mesmos autores descreveram ainda, com protocolo semelhante, abundante espessamento das camadas musculares das artérias e fibrose periarterial (*Takeuchi et al., 1986*). *Inaba et al. (1988)* descreveram a ruptura da limitante elástica interna seguida de proliferação celular focal com formação regenerativa de fibras elásticas e de colagénio na parede de artérias periféricas de ratos expostos a vibração local de baixa frequência. Também em modelo animal, exposto a vibração directa, identificaram-se lesões arteriais por espessamento fibrocelular da íntima com proliferação de células musculares lisas e de fibras colagénicas e elásticas acompanhadas de ruptura da membrana elástica interna (*Okada et al., 1987; Okada et al., 1987a*).

Em modelo animal exposto a RBF de alta intensidade, *Martins dos Santos et al. (2002)* confirmaram o espessamento focal da camada íntima das artérias, com ruptura da lâmina elástica interna e proliferação celular. Os mesmos autores descrevem ainda fibrose e espessamento anormal na parede de vasos linfáticos, com ruptura valvular, em animais expostos a RBF (*Grande et al., 2001; Martins dos Santos et al., 2004*). *Castelo Branco et al. (2004b)* descreveram espessamento da íntima arterial com ruptura da lâmina elástica interna e externa, também em modelo animal exposto a RBF de alta intensidade.

O denominador comum das lesões vasculares, descritas por estes investigadores, provocadas tanto pela vibração directa como pelo RBF e infrasons, corresponde a proliferação anormal e excessiva de matrizes extracelulares em vasos de vários calibres, portanto a fibrose. No entanto, o espessamento vascular descrito nos vasos expostos a RBF não está relacionado com a formação de placas ateroscleróticas, em vez disso parece abranger o vaso na sua extensão (*Martins dos Santos et al., 2005*). Já nos vasos lesados pela vibração directa, apesar do processo de fibrose ser transversal à parede do

vaso, aparecem descrições de aterosclerose ocasional nos vasos, com deposição lipídica na parede dos mesmos (*Takeuchi et al., 1986*).

Ainda que as lesões causadas pela vibração ou pela exposição ao RBF possam ter semelhanças, não deixam também de apresentar diferenças, pelo que o interesse, de observar as alterações provocadas pela vibração de contacto, reside na possível recolha de informação relevante para a compreensão do fenómeno de lesões atribuíveis ao RBF. Não obstante, a proliferação anormal de matrizes extracelulares e de colagénio é, como já vimos, apontada de modo unânime como uma das marcas do RBF sobre os tecidos biológicos (*Alves-Pereira et al., 2004*).

A fibrose também foi comprovada noutros órgãos, em modelo animal, por exposição a um ambiente rico em RBF de alta intensidade em condições controladas: fibrose focal intersticial no parênquima pulmonar de ratos expostos a RBF (*Grande et al., 1999*); lesões idênticas, nomeadamente o espessamento por fibrose da parede alveolar nos pulmões de ratos expostos a RBF (*Castelo Branco et al., 2004a*); espessamento dos septos interalveolares em pulmões de ratos expostos a infrasons (*Svidovyi et al., 1987*); fibrose subepitelial intensa na traqueia de ratos expostos a RBF (*Sousa Pereira et al., 1999a*); espessamento da submucosa gástrica com proliferação fibrótica em ratos expostos a RBF (*da Fonseca et al., 2006b*); fibrose intensa, perilobular e intraparenquimatosa, na glândula parótida de ratos expostos a RBF (*Oliveira et al., 2007*).

Também em humanos foram descritas alterações semelhantes: proliferação anormal de colagénio no pericárdio e válvulas cardíacas, em vasos sanguíneos, de grande e pequeno calibre, e linfáticos (*Castelo Branco et al., 1999c; Reis Ferreira et al., 2003a*). A fibrose, no pericárdio e válvulas cardíacas, de um indivíduo exposto cronicamente a RBF, foi das alterações mais exuberantes encontradas *post mortem* (*Castelo Branco, 1999c*) e que mais despertou a curiosidade dos investigadores no início do estudo dos efeitos do RBF sobre os tecidos biológicos. No pericárdio - referência citada anteriormente - foi descrito um espessamento, com desenvolvimento de uma camada significativa de tecido conjuntivo laxo, na ausência de sinais inflamatórios. Este último ponto, também sistematicamente descrito, e que torna a situação atípica sob o ponto de vista de conceitos médicos convencionais (*Alves-Pereira et al., 2007*), poderá estar relacionado com fenómenos que acontecem a nível ultra-estrutural, bem como com o mecanismo da acção acústica do RBF sobre os tecidos biológicos.

Foram ainda descritas, em humanos, lesões fibróticas dispersas ao longo da árvore brônquica, identificadas por broncoscopia (*Reis Ferreira et al., 2003a; Monteiro et al., 2005*) e fibrose no parênquima pulmonar e pleura, observadas através de tomografia computadorizada de alta resolução (*Reis Ferreira et al., 2003b*).

Assim, se a fibrose na ausência de sinais inflamatórios aparece referida sistematicamente como consequência da exposição ao RBF, existem também referências a alterações celulares, que poderão, aliás, ser a chave para a melhor compreensão do fenómeno de lesão dos tecidos biológicos. Estão descritas alterações celulares em inúmeros órgãos e sistemas:

Respiratório - diminuição da densidade de células ciliadas e aumento do número de células serosas no epitélio traqueal de ratos expostos a RBF em simulação de horário laboral (*Oliveira et al., 2002a*); redução do número de células ciliadas e cílios no epitélio bronquiolar; aumento de pneumocitos tipo II mostrando, alguns deles, vacúolos e corpos lamelares no seu interior (*Grande et al., 1999*); aumento do número de células em escova e pneumocitos tipo II com redução de microvilosidades na sua superfície e diminuição do número de pneumocitos tipo I (*Castelo Branco et al., 2004a*); hipertrofia das células tipo II nos alvéolos de ratos expostos a infrasons (*Svidovyi et al., 1987*); microvilosidades das células em escova fundidas e desorganizadas contendo vacúolos no seu interior e corpos multivesiculares e ainda vesículas secretórias desorganizadas (*Castelo Branco, 2004a*); redução das microvilosidades no mesotélio pleural (*Oliveira et al., 2003*); lesão das células ciliadas da traqueia do rato, inclusive, no período intra-uterino e pós-natal (*Oliveira et al., 2002a*); aumento do número de células em escova e diminuição do número de células ciliadas, com cílios necróticos ou fundidos e irregularmente distribuídos no epitélio traqueal do rato (*Sousa Pereira et al., 1999a*);

Digestivo - distribuição irregular das células epiteliais, com coalescência e fusão das vilosidades no duodeno de ratos (*da Fonseca et al., 2006a*); alterações degenerativas, picnose e morte celular, no epitélio glandular gástrico do rato (*da Fonseca et al., 2005*); desorganização fibroblástica do ligamento periodontal e necrose do osso alveolar do rato (*Mendes et al., 2007*); deformação marcada do núcleo com redistribuição cromatínica à membrana nuclear, lesões mitocondriais e aumento do conteúdo citoplasmático de ARN, aparecimento de grânulos lipídicos com inclusões osmofílicas, e zonas de lise do retículo seguidas de formação de vacúolos no citoplasma de hepatócitos de ratos expostos a infrasons (*Alekseev et al., 1987*);

Urinário - desorganização celular ao nível da membrana basal e tumefacção dos podócitos renais em ratos (Martins dos Santos et al., 2005);

Cardiovascular – tumefacção e ruptura das células mesoteliais do pericárdio (Castelo Branco et al., 1999c) e morte celular no pericárdio (Castelo Branco et al., 2004b); destruição mitocondrial em capilares sanguíneos e patologia das células do miocárdio em ratos expostos a infrasons de alta intensidade (Gordelaze et al., 1986); deformação nuclear e alterações mitocondriais em células do miocárdio, em condições semelhantes (Alekseev et al., 1986); citólise intracelular nos cardiomiócitos de ratos expostos a infrasons (Nekhoroshev et al., 1991); edema do citoplasma e do núcleo dos endoteliócitos de pequenos vasos da conjuntiva de ratos expostos a infrasons (Svidovyi et al., 1985);

As lesões celulares descritas nos vários estudos parecem ser de carácter degenerativo, independentemente do sistema onde ocorrem. Apesar dos mecanismos de lesão celular ainda não estarem esclarecidos - como referido acima - a associação da exposição a RBF de alta intensidade e infrasons a alterações genotóxicas (Silva et al., 1996; 1999a; 1999b; 2002) e teratogénicas (Castelo Branco et al., 2003a) e a alterações imunológicas (Batanov, 1995; Águas et al., 1999a; 1999b; Oliveira et al., 1999), em humanos e animais, poderá ajudar a compreender o processo.

Por outro lado, como veremos, as inúmeras descrições encontradas na literatura para alterações morfológicas - mas não histopatológicas e funcionais, em vários sistemas, na sequência da exposição a ruído ambiental e a RBF, incluindo infrasons, em humanos e em animais - poderão ser o reflexo das muitas referências histológicas de fibrose e de alterações celulares (Alves-Pereira et al., 2005).

Haskell (1975) demonstrou a diminuição da massa do osso alveolar em pilotos e tripulações de aviões. Outros autores puderam comprovar este facto, por avaliação radiográfica do osso alveolar, neste e noutros grupos profissionais expostos a RBF de alta intensidade (Carlson et al., 1977; Cortez Pimentel et al., 1988).

Albuquerque e Sousa et al. (1991) encontraram espessamento da carótida, por avaliação angiodinográfica, em indivíduos expostos a RBF. Também ecocardiograficamente foram documentados espessamentos das válvulas cardíacas, do pericárdio e do endocárdio (Marciniak et al., 1999; Araújo et al., 2005), atribuíveis a fibrose, em indivíduos expostos a RBF. Davies et al. (2005) e Babisch et al. (2005) reconheceram a relação entre o ruído

ambiental e o risco de enfarte do miocárdio. Nekhoroshev *et al.* (1991) demonstraram a existência de lesões morfológicas e fisiológicas no miocárdio do rato exposto a infrasons.

São também inúmeras as referências a alterações hemodinâmicas em humanos e animais expostos a RBF e infrasons. Foram referidas alterações de hipertensão arterial, sistólica e diastólica, por exposição ao ruído (*Ising et al., 1981; Altura et al., 1992*). Alterações idênticas foram encontradas por Lidstrom (1978) em pilotos de avião com longos tempos de exposição a infrasons. Também Danielsson *et al.* (1985) referiram, noutro estudo, aumento da pressão diastólica mas com diminuição da pressão sistólica e diminuição da frequência cardíaca em humanos expostos a infrasons. Também Borredon *et al.* (1973) referiram uma subida ligeira, contudo significativa, da pressão arterial em indivíduos expostos a infrasons. Crespo *et al.* (1988) descreveram um aumento da agregação plaquetária e uma diminuição nos valores do factor de von Willebrand em trabalhadores expostos a infrasons. Alterações semelhantes foram encontradas por Ribeiro *et al.* (2005) em trabalhadores da aviação civil e militar, e também nos tempos de protrombina, de trombroplastina parcial e fibrinólise. Van Zeller *et al.* (1988; 1991) descreveram alterações da circulação coroideia e da circulação retiniana em estudos com preenchimento fluorangiográfico também em indivíduos expostos a RBF. Svidovyi *et al.* (1985) descreveram constrição em toda a vascularização conjuntival de ratos por exposição a infrasons. Krivolesova *et al.* (2001) verificaram a inibição da contractilidade de linfáticos em modelo experimental em animais expostos ao infrason. Nishimura (1988) descreveu uma diminuição do fluxo na mucosa gástrica por acção adrenocortical em ratos expostos a infrasons.

Com base nas referências acima descritas podemos afirmar que o RBF de alta intensidade, incluindo infrasons, é “órgão não específico”.

Castelo Branco *et al.* (1999b) referem que determinados tipos de frequências, dentro das baixas frequências, podem estar associadas a um tipo particular de patologia. Esta afirmação poderá constituir um desafio para os futuros estudos, no que diz respeito aos efeitos biológicos do RBF, visto não se ter ainda associado uma dada frequência – λ – a uma determinada patologia, sendo no entanto certo que não existem ambientes puros e que será mais provável que as lesões encontradas não se cinjam a um órgão ou sistema (ex: ambiente rico em altas e baixas frequências que cause lesões auditivas e extra-auditivas) (*Castelo Branco et al., 1999d*).

A Doença Vibro-acústica (DVA) é uma patologia sistémica, causada por exposição prolongada ao RBF, caracterizada pela proliferação anormal de colagénio e elastina, na ausência de um processo inflamatório (*Alves-Pereira et al., 2007*). A citação é a mais recente definição encontrada na literatura para a DVA.

Apesar de ser, sob o ponto de vista anátomo-patológico, uma definição bastante específica, a sua correspondência clínica nem sempre tem sido fácil de documentar. É hoje certo e cada vez mais unânime, na generalidade da comunidade científica, que a exposição prolongada ao RBF provoca numerosas lesões, com o denominador comum anátomo-patológico de fibrose na ausência de processo inflamatório. A descrição clínica do “doente vibroacústico” ainda não parece ser tão clara que permita a mesma unanimidade colegial.

No final dos anos 70, Castelo Branco observou uma prevalência anormal de epilepsia desenvolvida tardiamente, em trabalhadores das Oficinas Gerais de Material Aeronáutico (OGMA), que exerciam as suas funções em testes a motores de jactos, em ambiente muito ruidoso – de 0,2% na população geral para 10% nestes trabalhadores das OGMA (*Castelo Branco et al., 1984a*). Este dado clínico esteve na origem do interesse de Castelo Branco e de uma equipa de investigadores, que se reuniram sob o nome de Grupo de Investigação Médica – OGMA (GIMOGMA), pela análise das alterações ocorridas em trabalhadores em ambientes ruidosos.

Da ideia inicial de que as alterações encontradas poderiam corresponder a uma entidade de carácter exclusivamente neurológico à evidência científica de lesões multi-sistémicas (*Castelo Branco et al., 1999d*) decorreu o tempo suficiente para efectuar vários estudos clínicos aprofundados aos trabalhadores das OGMA. Os trabalhadores expostos ao ruído apresentavam manifestações comportamentais anormais, história de ansiedade e depressão (*Martinho Pimenta et al., 1988*) e alterações psicológicas (*Gomes et al., 1999*).

Os estudos neurofisiológicos, realizados para avaliação das alterações encontradas puderam comprovar défices neurológicos do tipo acidente isquémico (*Pimenta et al., 1999*) acompanhados de lesões do sistema nervoso central, em imagens de ressonância magnética (*Cruz Maurício et al., 1988*), e ainda degeneração dos potenciais cognitivos (P300) (*Moniz Botelho et al., 1988*). Outros distúrbios neurológicos de carácter

degenerativo puderam ser comprovados em indivíduos expostos ao ruído, como a existência do reflexo palmo-mental (*Martinho Pimenta et al., 1999a*), discinésia facial induzida por estímulos auditivos (*Martinho Pimenta et al., 1999d*), perturbações do equilíbrio (*Martinho Pimenta et al., 1999b*) e epilepsia (*Martinho Pimenta et al., 1999c*). Mais alterações neurológicas foram identificadas como a incapacidade para hiperventilar na presença excessiva de CO₂ (*Reis Ferreira et al., 2003b*).

Para além destas, foram descritas alterações em estudos clínicos, nomeadamente, alterações auditivas (*Castelo Branco et al., 1984b*). Estudos de carácter não neurológico puderam comprovar a presença de alterações das estruturas dento-alveolares (*Cortez-Pimentel et al., 1988*), alterações da hemostase e da coagulação (*Crespo et al., 1988*) e alterações angiográficas da retina (*Van Zeller et al., 1988*).

A caracterização criteriosa dos ambientes acústicos, e a eliminação de outros agentes como causadores das alterações encontradas, permitiu identificar o RBF de alta intensidade como agente responsável pelas alterações encontradas (*Bento Coelho et al., 1994; 1999*).

As observações anátomo-patológicas descritas por Castelo Branco, na sequência da autópsia a um doente exposto ao RBF (*Castelo Branco, 1999b*), permitiram direccionar os estudos para a investigação de alterações por espessamento do pericárdio ou das válvulas cardíacas através de avaliação ecocardiográfica. As avaliações ecocardiográficas revelaram que todos os indivíduos apresentavam alterações (*Araújo et al., 1989*). Foi também efectuada a avaliação de lesões do tipo fibrótico nos vasos arteriais, tendo o resultado sido positivo (*Albuquerque et al., 1991*). A fibrose, no pericárdio, pôde ser novamente confirmada histologicamente por Castelo Branco *et al.* (*1999a*) na sequência de um “bypass” cirúrgico a um doente exposto a RBF de alta intensidade.

O resultado das observações anátomo-patológicas das lesões encontradas nestes últimos estudos indicou a fibrose na ausência de sinais inflamatórios como uma constante das alterações descritas nos vários órgãos (*Castelo Branco, 1999b*). Outra característica comum aos doentes incluídos no critério de DVA é a presença de lesões broncoscópicas com quantidade anormal de colagénio e neo-formação de leitos vasculares (*Castelo Branco et al., 2004b*).

No III International Meeting on Biodynamic em 1992, foi proposto por J. C. Guignard a adoção do termo “vibroacústico”, que viria a originar “doença vibroacústica” (DVA) para agrupar o conjunto de alterações que ocorriam em sujeitos expostos ao RBF por longos períodos de tempo. A DVA viria então a ser, à data, a manifestação clínica de uma doença sistêmica, que se desenvolveria após exposição contínua (> 10 anos) ao RBF (\leq 500Hz, incluindo infrassom), caracterizada pela proliferação de matrizes extracelulares e fibrose, bem como alterações dos epitélios, na ausência de sinais inflamatórios.

Paralelamente aos estudos clínicos do GIMOGMA que mais tarde originou o Centro para a Performance Humana, outros estudos, fundamentalmente experimentais e com o propósito de avaliar os efeitos do RBF sobre os tecidos biológicos, foram realizados pelo grupo de Nuno Grande, do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, tendo observado fibrose na traqueia, pulmões e pleura, alterações dos cílios da traqueia e brônquios (*Sousa Pereira et al., 1999a; 1999b; Grande et al., 1999*). Nesses estudos, conseguiram-se induzir derrames pleurais por incompetência morfofuncional das microvilosidades pleurais (*Sousa Pereira et al., 1999b*) e por incapacidade fagocítica ao nível da pleura (*Oliveira et al., 1999*). Os investigadores deste grupo puderam ainda comprovar a diminuição significativa de linfócitos CD4+ e CD8+ no baço de animais expostos a RBF de alta intensidade (*Águas et al., 1999a*), e a aceleração de manifestações de doenças autoimunes “lúpus-like”, nas mesmas condições experimentais (*Águas et al., 1999b*).

Mais recentemente, investigadores do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, também com estudos fundamentalmente experimentais, e com o propósito de avaliar os efeitos do RBF sobre os tecidos biológicos, puderam comprovar lesões no sistema vascular, em artérias (*Martins dos Santos et al., 2002*) e linfáticos (*Martins dos Santos et al., 2004*); e no sistema digestivo, no estômago (*da Fonseca et al., 2006b*) e no duodeno (*da Fonseca et al., 2006a*). Investigadores deste grupo também estudaram o periodonto. *Mendes et al. (2007)* conseguiram identificar desaparecimento do cimento radicular, sinais de necrose do osso alveolar e deficiente ancoragem das fibras do ligamento periodontal.

Glândula Parótida e RBF

Morfologia Normal da Glândula Parótida – Anatomia do Rato Albino (Wistar)

Existem numerosas glândulas no rato Albino (*Mus norvegicus albinus*), linhagem Wistar – frequentemente usado como modelo experimental (Thompson, 1933) – que excretam saliva para a cavidade oral, a que chamamos glândulas salivares (Thompson, 1933). Estudos comparativos entre as glândulas salivares do homem e do rato indicaram semelhanças sob ponto de vista histológico, fisiológico, sobre o tipo de acção e secreção enzimática (Cheyne, 1939).

Existem três pares de glândulas salivares, ditas *major* – parótida, submandibular e sublingual – no rato (Suckow et al., 2006), à semelhança do que acontece no humano (Gray et al., 2004; Testut, 1976).

No Homem, as glândulas parótidas correspondem a uma massa amarelada, irregular, lobulada, que se situa, na sua maior parte, abaixo e adiante do ouvido externo. A maior parte da glândula é superficial, limitada adiante pela mandíbula e atrás pelo músculo esternocleidomastoideu e pela apófise mastóide; em cima é mais larga e termina na vizinhança do arco zigomático; o seu limite inferior projecta-se numa linha que une a apófise mastóide com o ângulo da mandíbula; possui, por regra, um prolongamento anterior, que se projecta sobre a superfície do músculo masseter, limitado em cima pelo arco zigomático e em baixo pelo canal parotidiano, a parte acessória da glândula parótida (Gray et al., 2004; Testut, 1976).

No rato Wistar as glândulas parótidas consistem num agrupamento de 3 a 4 lobos serosos, alongados no sentido crânio-caudal (Cheyne, 1939), normalmente difusos e difíceis de dissecar (Wescott et al., 1974). A glândula estende-se latero-medialmente a partir da região retro-auricular no sentido ventro-craneal, acompanhando a veia facial, para terminar na porção ventro-lateral do pescoço (Wescott et al., 1974). No sentido crânio-caudal estende-se da região massetéica à clavícula (Cheyne, 1939; Wescott et al., 1974). A margem caudal da glândula relaciona-se com o bordo cefálico do músculo grande peitoral (Cheyne, 1939). No rato, a glândula parótida possui uma dimensão semelhante à glândula submandibular, situando-se por fora desta e, mais adiante, por

fora da glândula sublingual, sendo separável destas pelos planos fasciais (*Wescott et al., 1974*). Os gânglios linfáticos desta região podem por vezes ser confundidos com as glândulas, particularmente um que se encontra incorporado na massa glandular parotidiana (*Suckow et al., 2006*). Situada no local onde esperaríamos encontrar a parótida encontra-se a porção extra-orbital da glândula lacrimal, cujo canal excretor cruza o músculo temporal para terminar no canto lateral do olho (*Thompson, 1933*).

Sob o ponto de vista anatómico, descrevem-se na glândula parótida do rato dois lobos, um principal, dividido em três lobos menores; superior, médio e inferior e um acessório. A presença do lobo acessório e o padrão de ramificação sialográfico da árvore ductal varia em função da estirpe (*Omon et al., 1986*). Na dissecação da glândula parótida, o lobo acessório, uma extensão com forma de dedo, encontra-se intimamente associado com a glândula sublingual e com a glândula submandibular, estando no entanto separado destas por uma cápsula própria facilmente identificável nesta zona de relação (*Wescott et al., 1974*).

Este último facto, a identidade unitária, de cada uma das glândulas salivares, é facilmente comprovável histologicamente, apesar da natureza mista de uma das glândulas, a submandibular. A parótida no rato é, então, uma glândula de secreção exócrina composta por células serosas (*Wescott et al., 1974*), à semelhança do que acontece no humano (*Berkovitz et al., 2004; Katchburian et al., 2004*).

Histologicamente, no humano, a parótida, à semelhança das outras glândulas salivares, é constituída por elementos parenquimatosos suportados por tecido conjuntivo, o estroma (*Berkovitz et al., 2004; Katchburian et al., 2004*).

O parênquima, derivado da ectoderme, consiste num conjunto de unidades secretoras e num sistema de canais. As unidades secretoras serosas dispõem-se de forma esférica, formando ácinos, que se abrem em curtos canais intercalares, que têm continuidade com canais estriados, que por sua vez se reúnem em canais de maior calibre, excretores, dos quais o último termina na cavidade oral (*Katchburian et al., 2004*). No rato, o canal parotidiano, que resulta da união de três ramos principais sobre a superfície ventral, próximo do hilo da glândula, alguns milímetros abaixo do bordo cranial (*Cheyne, 1939*), cruza a superfície lateral do músculo masseter, associado a um ramo bucal e a um ramo mandibular do nervo facial, para se abrir no vestíbulo bucal, ao nível dos dentes molares (*Cheyne, 1939; Suckow et al., 2006*). O canal parotidiano encontra-se numa fase inicial do seu trajecto por baixo da porção extra-orbital da glândula lacrimal (*Cheyne, 1939*). No

humano o canal parotidiano – *de Stenon* – que resulta da confluência de dois ramos tributários na parte anterior da glândula, cruza o músculo masseter, e o seu bordo anterior, curvando-se medialmente para terminar, na mucosa vestibular, ao nível do segundo molar superior, depois de atravessar o corpo adiposo e o músculo bucinador. Ao cruzar o músculo masseter o canal parotidiano principal recebe o canal parotidiano acessório, situando-se nesta zona entre os ramos bucais, superior e inferior, do nervo facial (*Gray et al., 2004*).

O tecido conjuntivo é composto por uma cápsula e septos conjuntivos, que dividem grupos de unidades secretoras e canais em lobos e lóbulos, contendo no seu interior vasos sanguíneos, linfáticos e nervos para a glândula e canais excretores interlobulares (*Katchburian et al., 2004*). Os vasos sanguíneos são particularmente desenvolvidos em redor dos canais estriados onde se processam modificações na composição da secreção (*Berkovitz et al., 2004; Petersen et al., 1998*). O tecido conjuntivo da glândula parótida, apresenta fibroblastos, adipócitos e outras células, incluídas numa matriz extracelular, principalmente constituída por fibras de colagénio tipo I e substância fundamental, formada por glicoproteínas e proteoglicanos (*Berkovitz et al., 2004; Katchburian et al., 2004*).

Apesar de nos referirmos à glândula parótida como serosa, as células não são serosas puras, como acontece no pâncreas, excretando, para além de iões, de água e de proteínas, um componente glicoproteico (*Katchburian et al., 2004*). As células possuem uma forma piramidal, com o ápice voltado para o lume da unidade secretora (*Berkovitz et al., 2004*), o ácino. O núcleo encontra-se em posição basal e o citoplasma, basófilo, cora intensamente com hematoxilina. Sendo células especializadas na síntese de proteínas, possuem um retículo endoplasmático rugoso desenvolvido, situado em posição basal ao núcleo e também lateralmente. O complexo de Golgi está em posição apical ou lateral ao núcleo e a restante porção do citoplasma, a porção apical, está normalmente preenchida por grânulos de secreção (*Berkovitz et al., 2004; Katchburian et al., 2004*). Outros organitos celulares como ribossomas livres, mitocôndrias, lisosomas, peroxisomas, vacúolos ou vesículas encontram-se dispersos no citoplasma, por norma nas regiões lateral e basal da membrana plasmática. Na região basal a união à lâmina basal, que separa a célula do estroma, ou de células mioepiteliais, faz-se através de hemidesmosomas; na região lateral das células serosas a relação com as adjacentes faz-se através de interdigitações e na extremidade apical através de complexos juncionais constituídos por desmosomas e junções oclusivas (*Berkovitz et al., 2004; Gray et al.,*

2004; Katchburian et al., 2004). Ao nível da superfície apical estão descritas microvilosidades, que se projectam no lume, irregulares em número e em tamanho. O lume que ocupa o centro do ácino prolonga-se por vezes até à membrana basal (Katchburian et al., 2004).

Efeitos do RBF na Glândula Parótida

O tecido glandular possui, como acima descrito, um importante componente de tecido conjuntivo. Sabe-se da relação entre a exposição crónica a RBF e proliferação excessiva deste componente na ausência de sinais inflamatórios (Alves-Pereira et al., 2007). Todo o tecido glandular, como todo o organismo, é para além disso formado por células, onde uma importante rede de fibras cruza o espaço celular, com diversas funções mecânicas e bioquímicas. Esta rede forma o citoesqueleto, que possui, entre outros constituintes, fibras de actina e tubulina (Small et al., 1999). Existe evidência de que estruturas com estes componentes são profundamente afectadas, como no caso de microvilosidades presentes no parênquima pulmonar e nas vias aéreas (Grande et al., 1999; Sousa Pereira et al., 1999a; Oliveira et al., 2003), ou nos cílios cocleares (Castelo Branco et al., 2003b) pelo RBF.

Existem, portanto, evidências de alterações morfológicas na matriz extracelular e nas células.

Os resultados iniciais do nosso estudo na glândula parótida do rato Wistar, exposta ao RBF, permitiram-nos observar alterações morfológicas no estroma e nas células (Oliveira et al., 2007). Existe, na literatura, inúmeras referências a alterações morfológicas nas glândulas salivares. Condições tão diferentes como as que ocorrem na sequência da irradiação por Rx, na diabetes ou na Síndrome de Sjögren provocam lesões com tradução morfológica e repercussões funcionais (Dodds et al., 2005), ou seja com alteração da saliva total ou qualitativa da mesma.

No Homem, a saliva é uma secreção complexa (Llena-Puy, 2006; Edgar, 1992), que desempenha um importante papel na manutenção da homeostase oral (Mandel, 1989). Uma diminuição do seu volume, ou uma alteração qualitativa, pode resultar num aumento de susceptibilidade das estruturas orais a doenças (Humphrey et al., 2001). As doenças

orais como a cárie dentária, a doença periodontal, a ausência de dentes, as lesões da mucosa oral e o cancro oro-faríngeo, as lesões orais relacionadas com o vírus da imunodeficiência adquirida (VIH) e o trauma oro-dentário são considerado pela OMS problemas de saúde pública da maior importância (*Petersen et al., 2005*).

A cárie dentária e a doença periodontal são das diferentes doenças orais, as de maior prevalência. A cárie é historicamente considerada pela OMS como um importante problema de saúde nos países industrializados, com uma prevalência de 60 a 90% em crianças em idade escolar e com uma prevalência de quase 100% na população adulta pelo índice DMFT (*“Decayed, Missing and Filled Teeth Index”*), já a perda dentária por periodontite aguda atinge entre 5 a 20% da maioria das populações adultas (*Petersen et al., 2005*).

A influência da saliva no processo de cárie dentária é fundamental (*Dodds et al., 2005*) e *Steinberg et al. (1992)* demonstraram a relação entre as alterações na saliva e a inflamação gengival. Já *Slomiany et al. (1996)* relacionaram a presença da cistatina na saliva, produzida pela glândula parótida, apesar de em menor quantidade que noutras glândulas salivares, com uma diminuição da actividade da cisteína proteínase envolvida na patogénese da doença periodontal. A doença periodontal e perdas de osso significativas tinham, já no passado, sido associadas a elevados níveis de ruído, em pilotos de jactos (*Carlson et al., 1977; Haskell, 1975*). Já *Santiago et al. (2004)* referem um maior número de obturações, endodontias e dentes substituídos por próteses fixas em pessoal de vôo, exposto profissionalmente a ambientes ricos em baixas frequências.

Pensamos, à luz do que se conhece, e dos nossos primeiros resultados – no rato, os resultados iniciais do nosso estudo puderam comprovar alterações morfológicas e correspondência funcional, com diminuição muito significativa da quantidade de saliva e alteração qualitativa da mesma (*Oliveira et al., 2007*) – que se justifica um estudo aprofundado dos efeitos do RBF na glândula parótida.

Objectivos

Este trabalho tem por objectivo a caracterização morfológica dos efeitos do RBF sobre a glândula parótida ao longo do tempo, nomeadamente:

- O estudo microscópico e ultraestrutural das alterações no parênquima glandular e nas células secretoras resultantes da exposição ao RBF;
- A avaliação morfométrica das lesões no tecido conjuntivo;
- A avaliação de lesões vasculares sob ponto de vista macroscópico.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Modelo Animal

Utilizámos 80 ratos albinos (*Mus norvegicus albinus*), linhagem Wistar, adultos, em semelhante número de género, com idades entre oito meses e um ano, e peso médio de 364g (DP \pm 91g). Os animais foram adquiridos ao laboratório Charles River, Barcelona, Espanha.

Os animais foram colocados em gaiolas, onde podiam movimentar-se livremente, em grupos de dois ou três, de um só género. Foram alimentados com ração “*standard*” para roedores e tiveram livre acesso a água. Mantiveram ciclos de luz/escuro de 12h.

Na realização deste estudo foram tidas em conta a directiva da União Europeia que regulamenta a utilização de animais para fins científicos e experimentais (86/609/EEC) e também a legislação Portuguesa para os mesmos efeitos (Decreto-Lei nº 197/96).

Protocolo Experimental

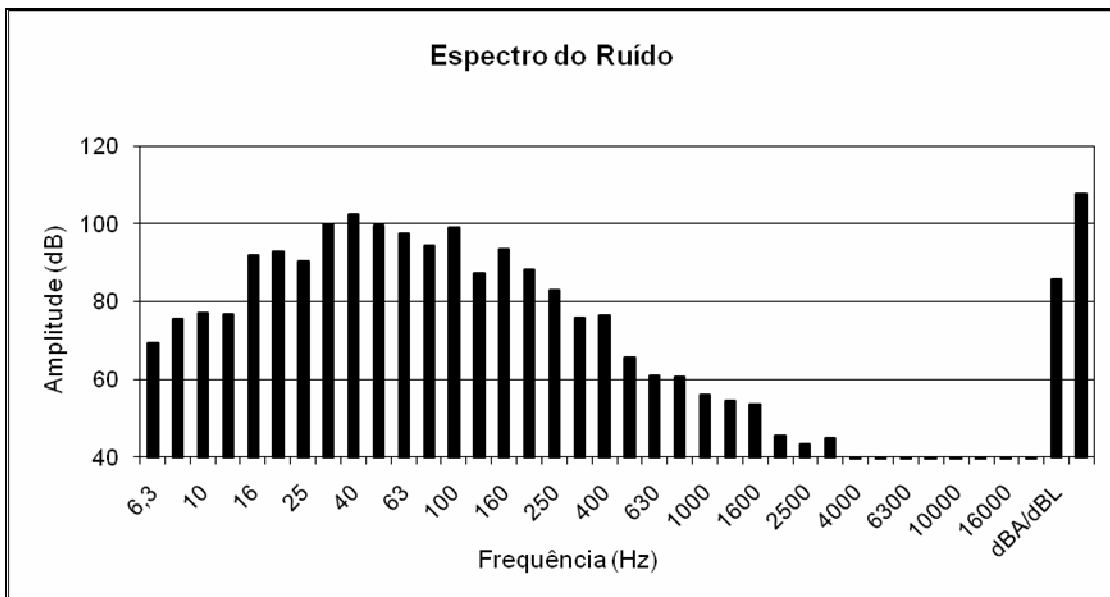
Exposição ao RBF

As gaiolas, com os animais, foram colocadas, em prateleiras, num compartimento, isolado, construído para o efeito, medindo 217×211×195 cm.

Um computador (Compaq) reproduziu, em contínuo, um “ruído branco”, previamente gravado, amplificado num amplificador (QSC) de 200W, filtrado e emitido por um sub-woofer (Magnat XTC 1200), colocado em posição frontal às gaiolas, criando um ambiente rico em baixas frequências de alta intensidade, incluindo infrasons.

O ruído foi avaliado com um analisador espectral digital (B&K 2144), que fornece informações em tempo real, nos vários pontos onde os animais estavam expostos ao RBF.

A análise espectral revelou frequências concentradas nas bandas inferiores a 500Hz, correspondendo a uma pressão sonora superior a 85dB nas bandas de frequência entre os 20Hz e os 400Hz. A média dos níveis de pressão sonora revelou-se superior a 109dB - pressão sonora real - ou 98 dBA. A análise espectral foi sobreponível em todas as zonas de exposição dos animais.



Os animais foram divididos em 6 grupos:

gC	grupo de controlo, 15 animais, que se mantiveram em condições semelhantes aos restantes mas à parte, em silêncio, para efeitos de controlo;
-----------	---

os restantes grupos de animais estiveram expostos ao RBF continuamente, por períodos crescentes:

g1	grupo 1, 10 animais, 168h de exposição ao RBF (1 semana RBF);
g2	grupo 2, 10 animais, 504h de exposição ao RBF (3 semanas RBF);
g3	grupo 3, 10 animais, 840h de exposição ao RBF (5 semanas RBF);
g4	grupo 4, 10 animais, 1512h de exposição ao RBF (9 semanas RBF);
g5	grupo 5, 15 animais, 2184h de exposição ao RBF (13 semanas RBF).

Após os tempos de exposição, os animais foram sacrificados com uma injeção intraperitoneal de ketamina (Ketalar, Parke-Davis Co., Barcelona, Spain; 4,0-8,0 mg/Kg peso). A remoção cirúrgica das glândulas parótidas foi efectuada de acordo com o protocolo cirúrgico para dissecação de estruturas cervicais (*Krinke, 2000*). Foi utilizado procedimento semelhante para o grupo de controlo.

Morfologia – Microscopia Óptica

Após remoção cirúrgica, as parótidas de animais de todos os grupos foram fixadas em formol tamponado a 10%.

Efectuámos, colorações com hematoxilina-eosina (HE), ácido periódico de Schiff (PAS) e tricómico de Masson.

Morfometria – Análise Estatística

Procedemos a uma análise de variância com um factor ordinal para averiguar se o tempo de exposição ao RBF (horas de exposição) tem um efeito significativo sobre a variável dependente por nós definida – área de tecido conjuntivo.

Efectuámos, para esse efeito, medições, para um valor ordinal absoluto, ao perímetro de tecido conjuntivo perivásculo-ductal (TCPVD), para quantificação da fibrose.

Recolha de dados e Análise Estatística de Resultados

As medições foram efectuadas com um software de análise de imagem (OPTIMAS), em imagens captadas com um microscópio óptico, com uma ampliação $\times 100$, em lâminas coradas com HE.

As áreas foram escolhidas independentemente da forma e tendo como outros critérios os seguintes: a presença de vasos e túbulos no interior do seu perímetro; e estarem rodeadas por parênquima glandular.

As medições foram efectuadas em lâminas de todos os grupos. Efectuámos, em cada lâmina, tantas medições quanto possível, de acordo com os critérios previamente estabelecidos.

Grupo	gC	g1	g2	g3	g4	g5
Nº de medições	46	46	39	33	41	42

Para efeito de comparações múltiplas entre grupos utilizámos uma análise estatística ANOVA. A análise dos dados foi efectuada com o programa SPSS 13.0.

Da análise estatística consta: a verificação da normalidade da distribuição dos dados com o teste de Shapiro-Wilk após correcção da significância de Lilliefors; a verificação da homogeneidade das variâncias entre grupos com o teste de Levene; aplicação da ANOVA de Welch para as comparações múltiplas entre os grupos com variâncias heterogéneas; a realização de comparações múltiplas entre grupos 2 a 2, e aplicação do teste “post-hoc” de Tamhane, tendo em conta a heterogeneidade de variâncias; finalmente, a verificação da relação entre o valor médio da área e o nível do factor, a duração da exposição ao RBF, através da análise dos contrastes, usando um polinómio de 1º grau para a partição da soma dos quadrados entre grupos.

Morfologia – Imunohistoquímica

Efectuámos, ainda, em glândulas de animais dos grupos gC e g5, imunomarcção para os colagénios I, IV e V. A recuperação antigénica realizou-se por digestão enzimática com pepsina, com pH entre 1,5 e 2 e temperatura de 37,5°C.

Para efeitos de quantificação da imunomarcção para o colagénio I utilizámos imagens de microscopia óptica, captadas em ampliação $\times 200$, e analisadas no programa – Image J – desenvolvido pelo National Institute of Health – NIH, que possui um código fonte de domínio público, que permite ao utilizador criar *plugins* para processamento e análise de imagens. Utilizámos o *plugin colour deconvolution*, desenvolvido por Ruifrok & Johnston's, especificamente para avaliação da quantidade de coloração numa determinada preparação histológica. No nosso estudo utilizámos vectores pré-definidos, pelos autores do *plugin – haematoxylin, eosin and DAB –*, que permitem a separação dos tons castanhos numa determinada imagem e a tradução gráfica dessas mesmas intensidades através de um histograma com uma escala de 1 a 255.

Para a análise estatística da imunomarcção para o colagénio I, a quantificação numérica das intensidades de cor foi separada em três intervalos: de 1 a 113, maior densidade de castanhos; de 1 a 226, castanhos totais; 227 a 255, considerámos ausência de coloração. Efectuámos o quociente das somas dos valores do primeiro intervalo pelo segundo intervalo, castanho total, permitindo, para cada imagem, determinar a quantidade relativa de coloração. Os valores foram analisados sob o ponto de vista

estatístico pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, aplicado ao nível de 5%. A análise estatística foi efectuada com o programa SPSS 13.0.

Morfologia – Microscopia Electrónica de Transmissão

Fragmentos de glândulas, de todos os grupos, foram fixados de acordo com a técnica descrita por Águas *et al.* (1991), à temperatura ambiente, numa solução composta por 4% formaldeído, 1,25% de gluteraldeído e 10nmol/L em 0,05 mol/L de cacodilato tamponado, pH 7,2. Os fragmentos foram posteriormente lavados com uma solução tamponada e *post-fixados* numa solução composta por 1% de ferrocianato de potássio e 1% de tetróxido de ósmio em água destilada. As amostras foram em seguida desidratadas em etanol de concentrações crescentes, incluídas em Epon e cortadas com um ultramicrótopo LKB. Os cortes foram montados em grelhas de cobre, corados com acetato de uranilo e citrato de chumbo, e observados num microscópio electrónico JEOL 100C.

Morfologia – Estudo vascular macroscópico

Estudo efectuado em 4 animais nos grupos gC e g5.

Observação com lupa esterioscópica após injeção de contraste seguida de diafanização pela técnica de Spalteholz.

A injeção do Micropaque foi precedida de uma cuidadosa lavagem do sistema vascular com soro fisiológico aquecido a 37°C, tendo o cateter para injeção sido introduzido na aorta abdominal. Para a diafanização foi utilizada a técnica de Spalteholz que pode ser aplicada a peças de todas as dimensões. Depois de dissecada, a glândula parótida foi fixada em formol tamponado a 10%. Após lavagem a glândula foi colocada em água oxigenada a 10V para branqueamento. Foi novamente lavada e desidratada em álcool de concentrações crescentes 50, 70, 90, 95, 99% e álcool absoluto. Após um banho em

benzol puro as glândulas foram colocadas numa mistura de salicilato de metilo com benzoato de benzilo.

RESULTADOS

RESULTADOS

Morfologia – Microscopia Óptica

A observação em microscopia óptica das glândulas parótidas de ratos expostos ao RBF permitiu identificar alterações no parênquima glandular e alterações no estroma, nomeadamente no tecido conjuntivo e nos vasos. As alterações parecem aumentar com o tempo de exposição ao RBF.

As lâminas do grupo de controlo não apresentam alterações.

gC - controlo

As observações em microscopia óptica demonstram um parênquima glandular composto por células serosas, organizadas em ácinos (Fig. 1), que marcam positivamente para conteúdo glicoproteico na coloração ácido periódico de Schiff (PAS) (Fig. 2 e 17). O parênquima, organizado em lóbulos, está separados por finos septos de tecido conjuntivo, com algum conteúdo em fibras de colagénio na coloração pelo tricómico de Masson (Fig. 23). Na Fig. 3, interpostas no parênquima, encontramos estruturas tubulares, que compõem o sistema excretor da glândula, para além de vasos sanguíneos e nervos rodeados de tecido conjuntivo que constitui o tecido conjuntivo perivásculo-ductal (TCPVD). As células, piramidais, possuem um núcleo basal esférico e as porções apicais definem o lume acinar, central (Fig. 3 e 4).

g1 – 1 semana RBF

Na Fig. 5 são visíveis vacúolos de tamanho variado e aspecto claro, dentro de algumas células. Aparente hialinização de tecido conjuntivo e ligeira proliferação endotelial.

g2 – 3 semanas RBF

Mantém-se a vacuolização, sendo mais notória na periferia dos lóbulos. Há zonas em que os vacúolos são confluentes (“aspecto de degenerescência gorda”). Há hialinização do tecido conjuntivo, visível na Fig. 6. Observam-se ainda alterações degenerativas celulares e aspectos de tumefacção e proliferação endotelial.

g3 – 5 semanas RBF

Observa-se marcada vacuolização, que abrange grande parte do parênquima. São também abundantes as imagens de degenerescência vacuolar das células acinosas, com vacúolos coalescentes e manutenção das células tubulares. Mantém-se hialinização do tecido conjuntivo interlobular e principalmente perilobular (Fig. 7). Os vasos que rodeiam o parênquima estão tumefactos, principalmente os de menor calibre e é visível proliferação endotelial.

g4 – 9 semanas RBF

Mantêm-se as mesmas alterações que parecem intensificar-se. Na Fig. 8 observa-se a degenerescência vacuolar das células acinosas, muito marcada. Os vasos apresentam proliferação do endotélio e vacuolização.

g5 – 13 semanas RBF

O aspecto geral do parênquima glandular, mostra em todas as lâminas estudadas, marcadas alterações, com distorsão da sua arquitectura e anarquia acinar, visíveis nas Figuras 10 e 11. O parênquima da glândula apresenta sinais de necrose isolada das células (Fig. 13 e 14) e presença de alterações degenerativas vacuolares generalizadas, de forma e tamanho irregular (Fig. 12 e 16). Os vacúolos reagiram negativamente para a coloração PAS (Fig. 18). Não existem células inflamatórias no parênquima. Nas Figuras 14 e 15 observamos corpos acidófilos de contorno arredondado e imagens de fragmentação nuclear sugestivas de fenómenos apoptóticos ou de degeneração oncocítica. Aparecem ocasionalmente áreas em que o parênquima está, em grande parte, substituído por tecido conjuntivo hialinizado (Fig. 9 e 10), com manutenção do aspecto vacuolizado das células, parecendo afectar também as células tubulares do sistema excretor.

Quanto ao tecido conjuntivo, observa-se intensa fibrose no TCPVD (Fig. 9 e 13). O tecido conjuntivo interlobular (Fig. 20 e 21) e principalmente o perilobular também apresenta marcada fibrose com hialinização (Fig. 19) e coloração intensa para fibras de colagénio na coloração pelo tricómico de Masson (Fig. 22 e 24).

Os vasos sanguíneos apresentam marcadas alterações que consistem em espessamento focal das paredes, marcadamente hialino, que, em alguns casos, invade o lume do vaso com formações do tipo trombótico (Fig. 25). As lesões nos vasos de médio calibre aparentam ter origem na camada média do vaso e protruem para o lume do vaso (Fig. 27). Nas Figuras 28 e 29 observamos que a camada média do vaso apresenta vacuolização e que em redor do vaso há intensa fibrose de aspecto concêntrico e fortemente hialinizada, rica em fibras de colagénio. Observa-se nestes mesmos vasos ruptura da íntima (Fig. 28). Nos pequenos vasos da glândula o lume do vaso está por vezes obstruído com uma massa fibrótica eosinofílica e hialinizada (Fig. 26 e 30).

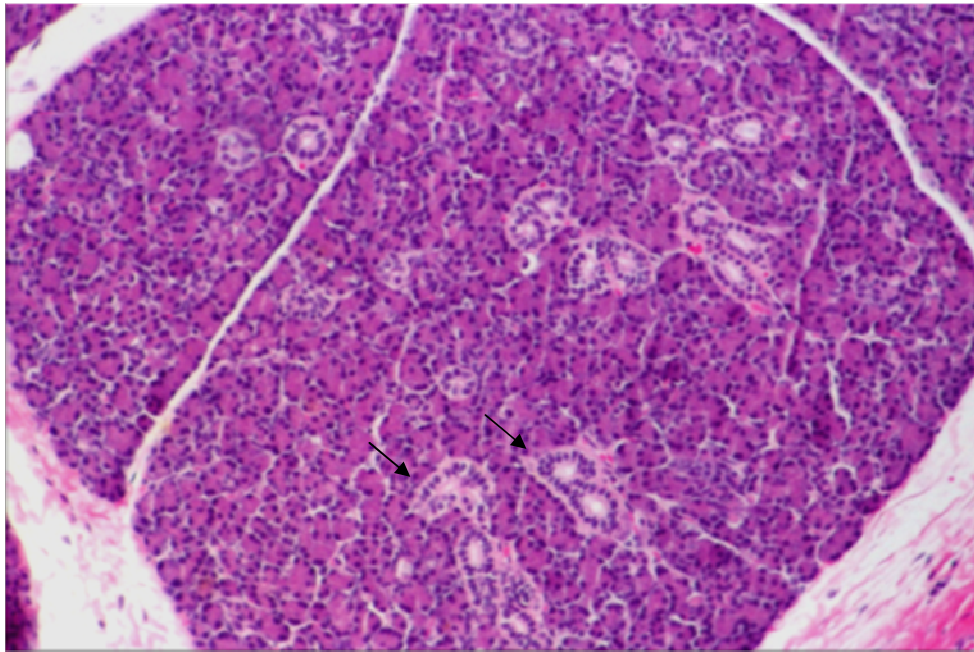


Fig. 1 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo de controle (HE $\times 100$). Observa-se o parênquima glandular, com arquitetura bem definida, composto por células serosas, organizadas em ácinos. Os lóbulos, separados por finos septos de tecido conjuntivo fibroso, rico em fibras de colagénio. Observa-se ainda a estrutura tubular do sistema excretor da glândula (↑).

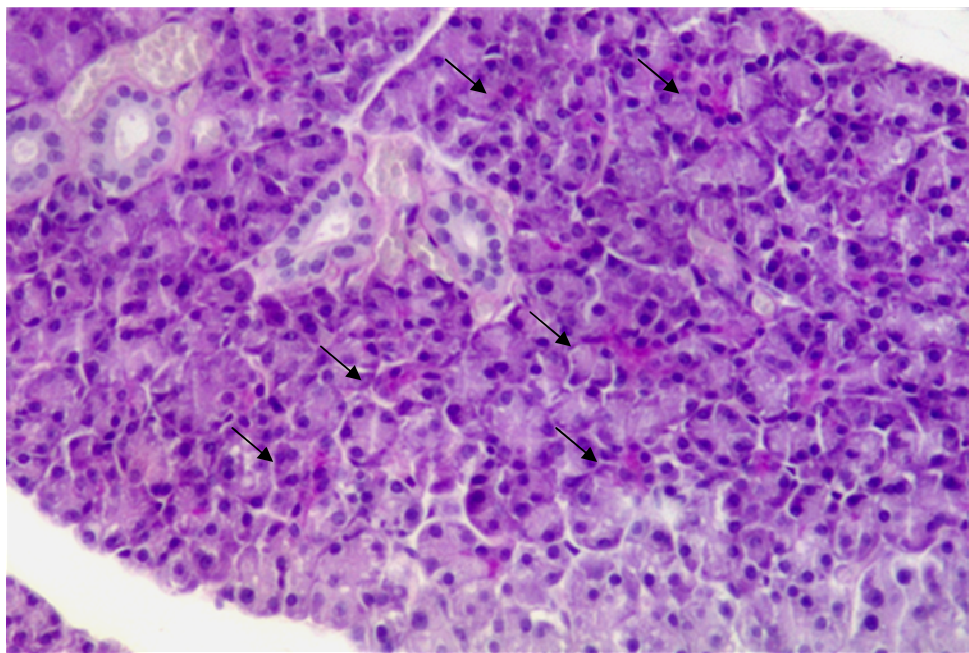


Fig. 2 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo de controle (PAS $\times 200$). Note-se a arquitetura do parênquima bem definida e devido ao conteúdo glicoproteico identifica-se a coloração avermelhada de um PAS+ (↑).

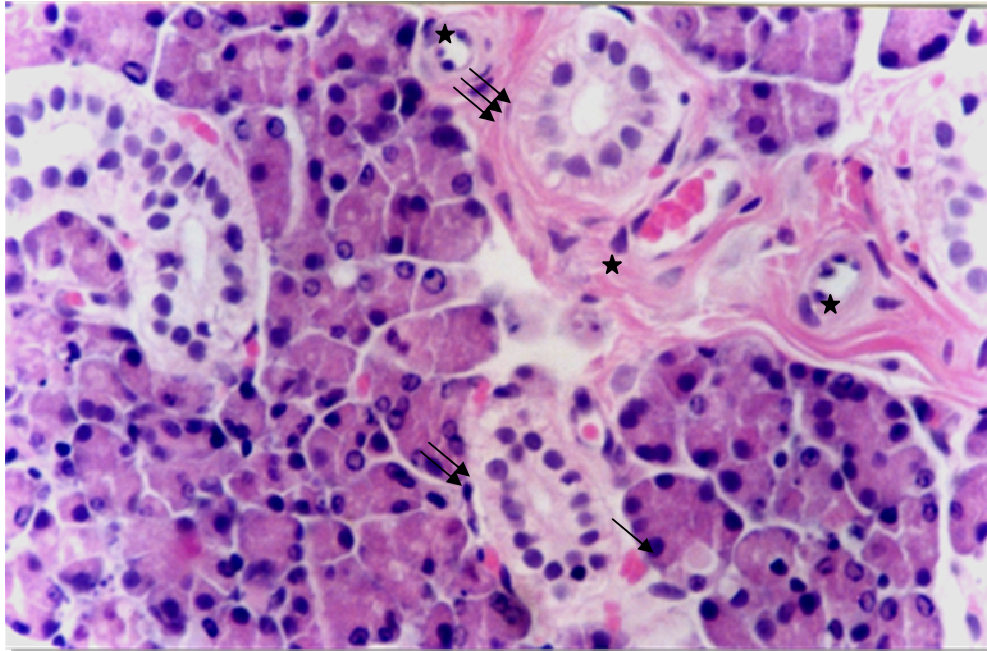


Fig. 3 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo de controle (HE ×400). As células, piramidais, possuem um núcleo esférico de localização basal. As células formam ácinos no centro dos quais podemos observar, o lume contendo o produto de secreção (↑). Podemos ainda observar ducto intercalares (↑↑) e ductos estriados (↑↑↑), rodeados por tecido conjuntivo contendo pequenos vasos (*).

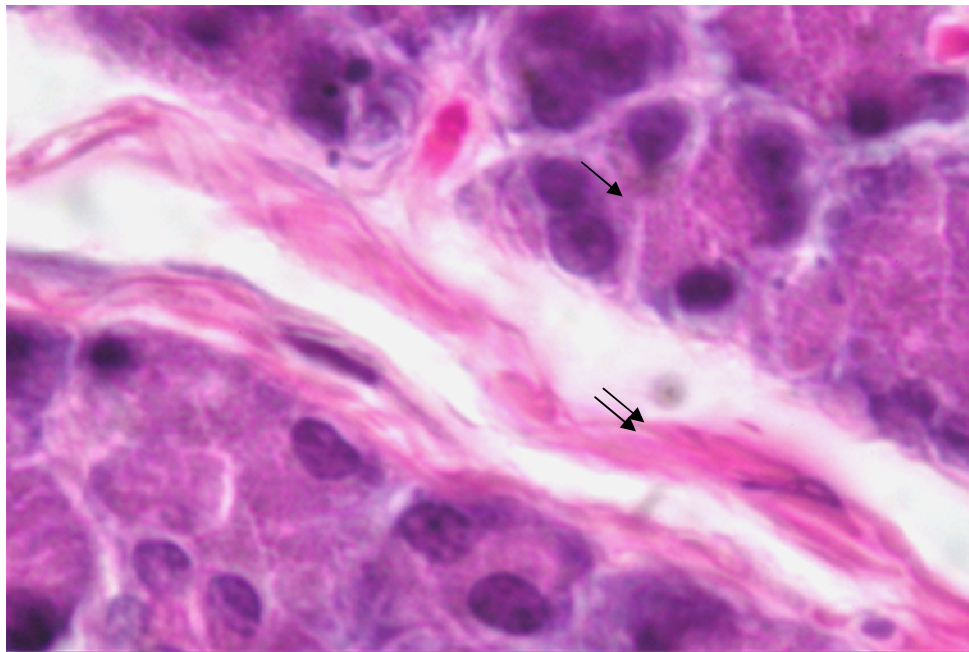


Fig. 4 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo de controle (HE ×1000). Pormenor de parênquima onde se identifica melhor a disposição das células acinares (↑) e o tecido conjuntivo interlobular (↑↑) com amplo espaço intersticial.

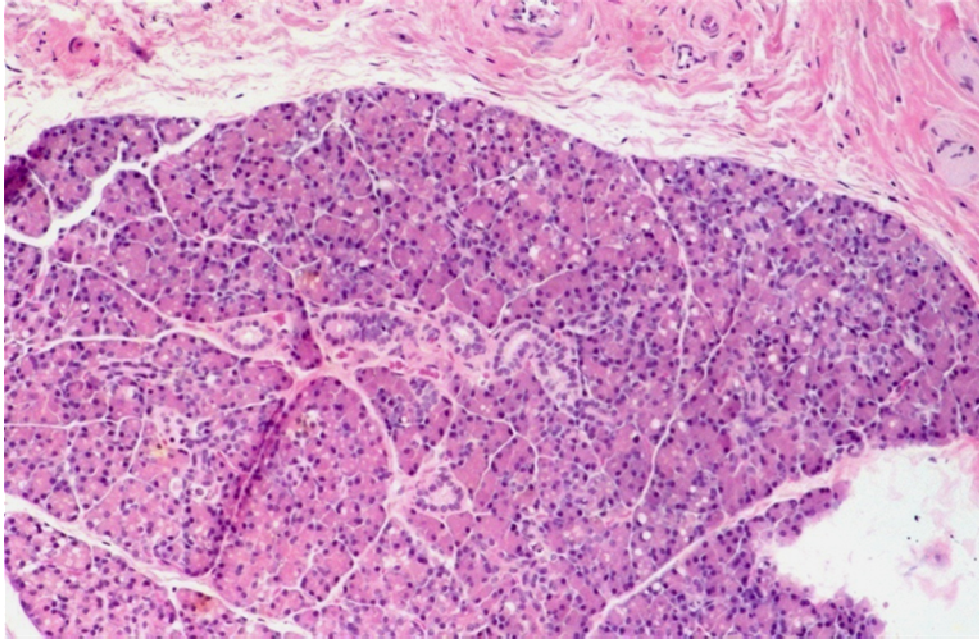


Fig. 5 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g1 (HE ×100). Parênquima com arquitetura mantida, apesar de se notar alguma vacuolização celular (intra-citoplasmática).

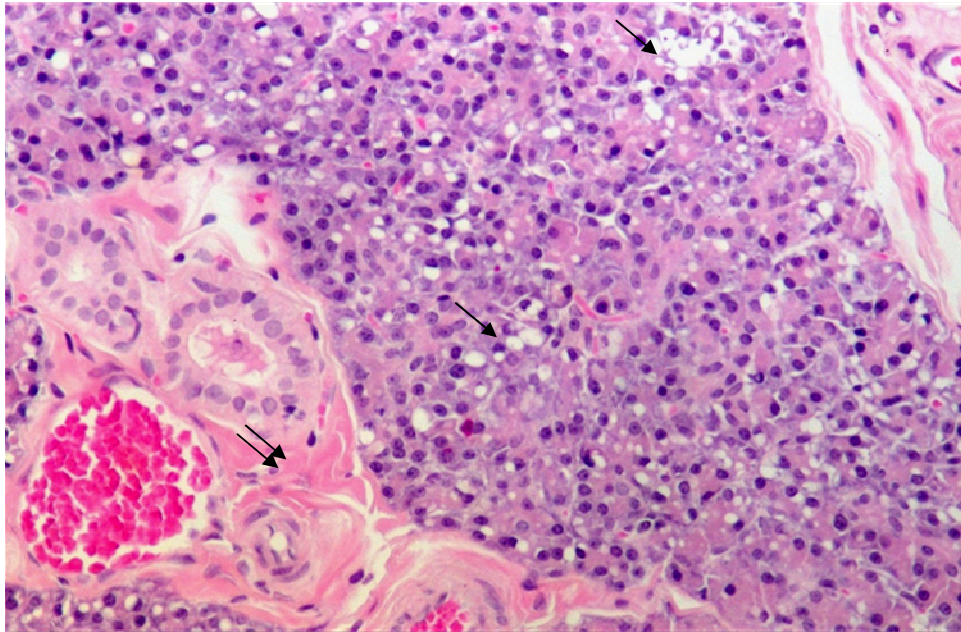


Fig. 6 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g2 (HE ×200). Ligeira distorção da arquitetura normal do parênquima glandular acompanhada de vacuolização (↑). Discreta hialinização do TCPVD (↑↑).

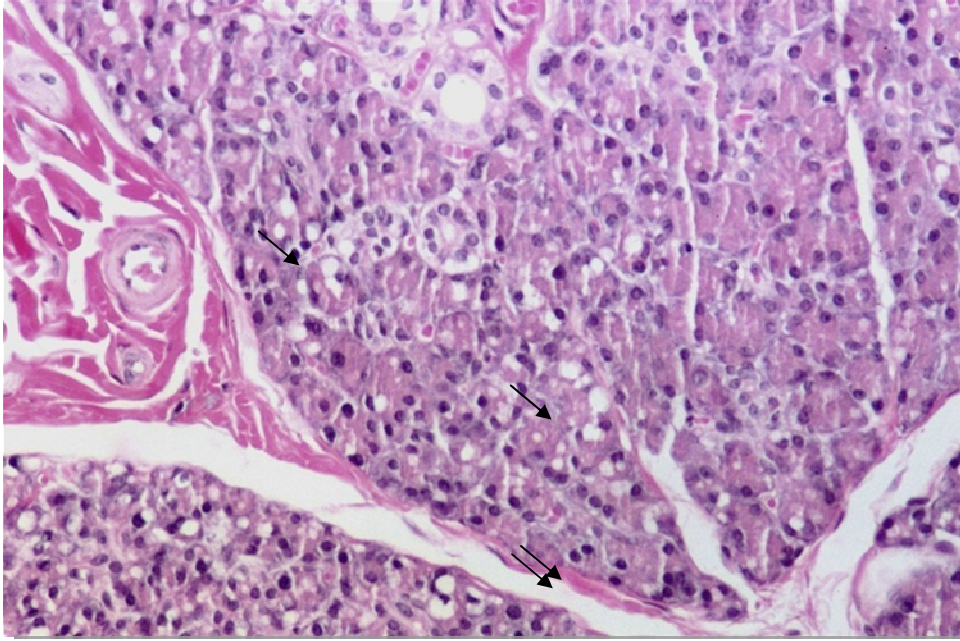


Fig. 7 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g3 (HE ×200). Vacuolização celular mais acentuada e desorganização do parênquima glandular (↑). Discreto espessamento dos "espaços interlobulares" à custa do tecido conjuntivo hialinizado (↑↑).

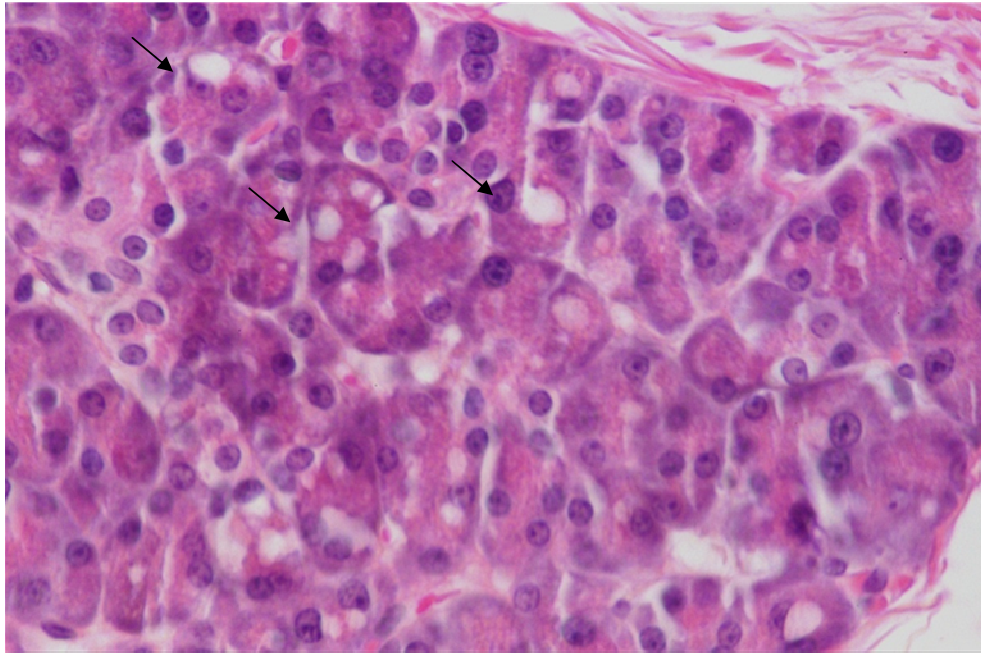


Fig. 8 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g4 (HE ×400). Presença de vacúolos intracelulares (↑) com alteração da morfologia normal das células.

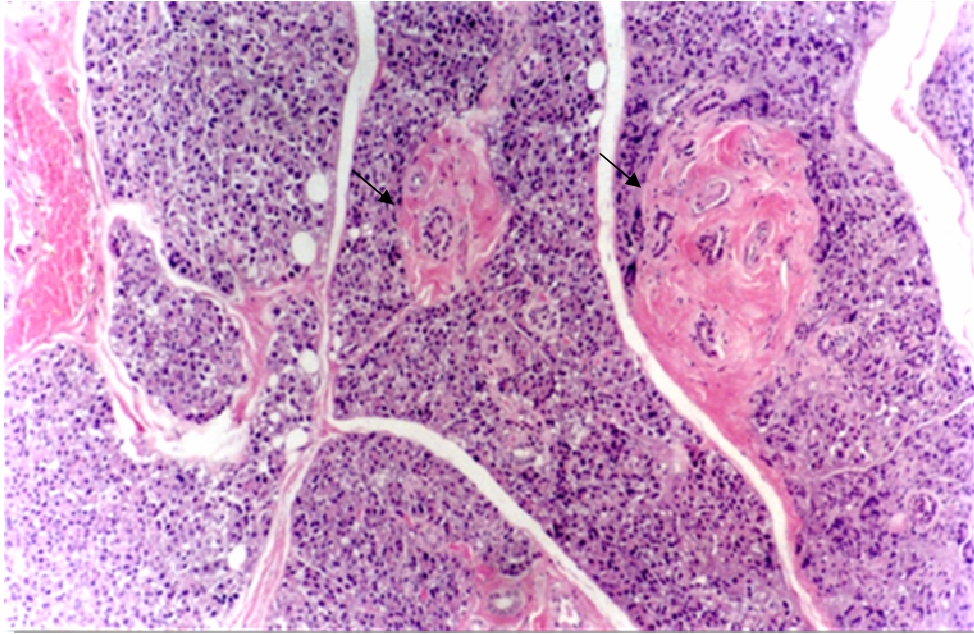


Fig. 9 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (HE ×40). Desorganização, identificando-se alguma redução do parênquima glandular. Células com numerosos vacúolos. Proliferação desordenada de tecido conjuntivo perivásculo-ductal, TCPVD (↑) e “interlobular” com marcada hialinização.

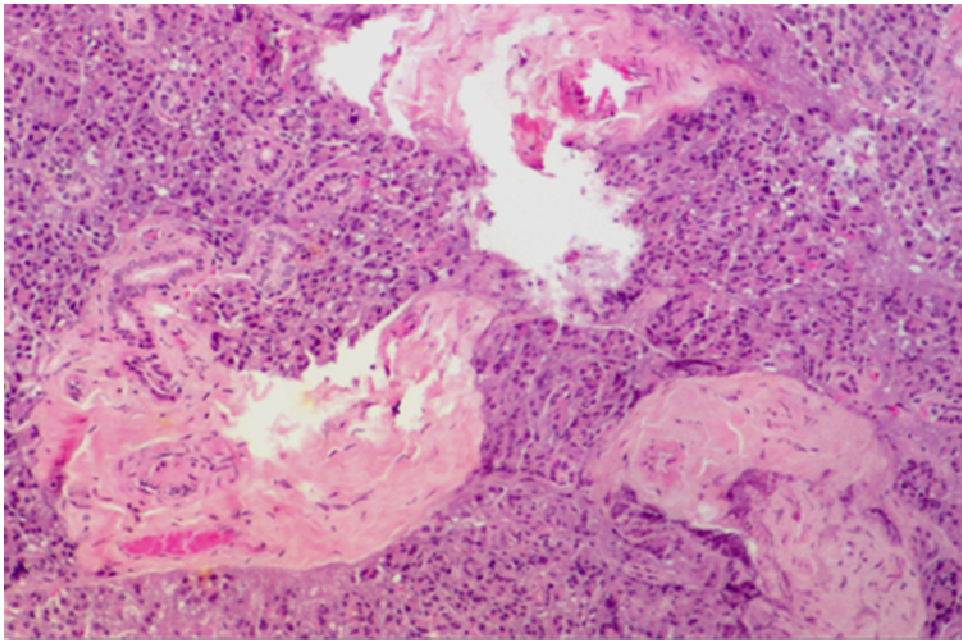


Fig. 10 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (HE ×40). Distorção da arquitetura normal do parênquima glandular acompanhada de substituição parcial por tecido conjuntivo fibroso.

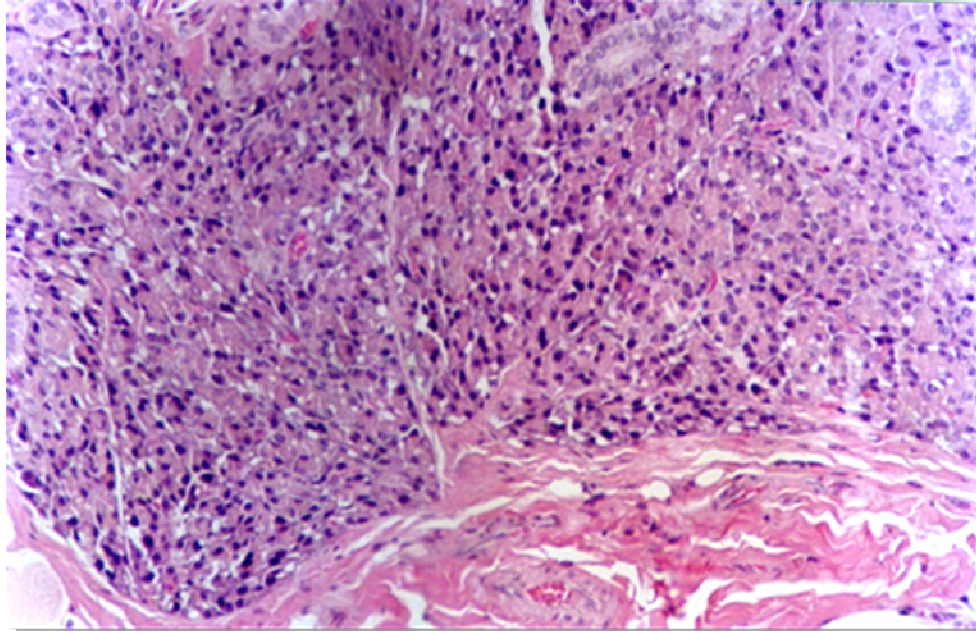


Fig. 11 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (HE ×100). Desorganização acinosa do parênquima, com perda da arquitectura normal, vacuolização celular e fibrose peri-lobular.

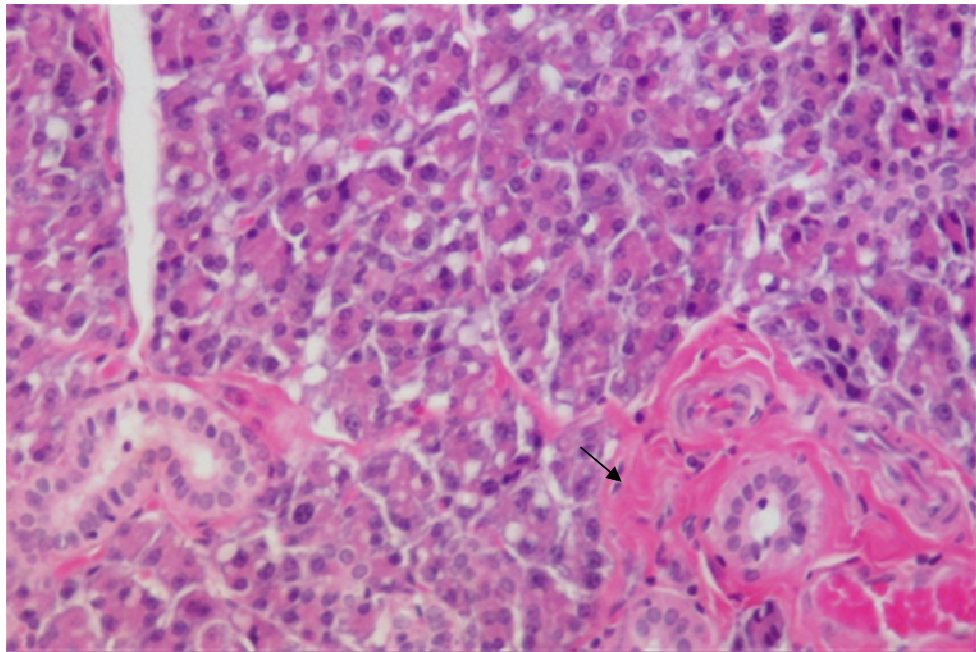


Fig. 12 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (HE ×200). Intensa vacuolização celular do parênquima glandular e forte hialinização do TCPVD (†).

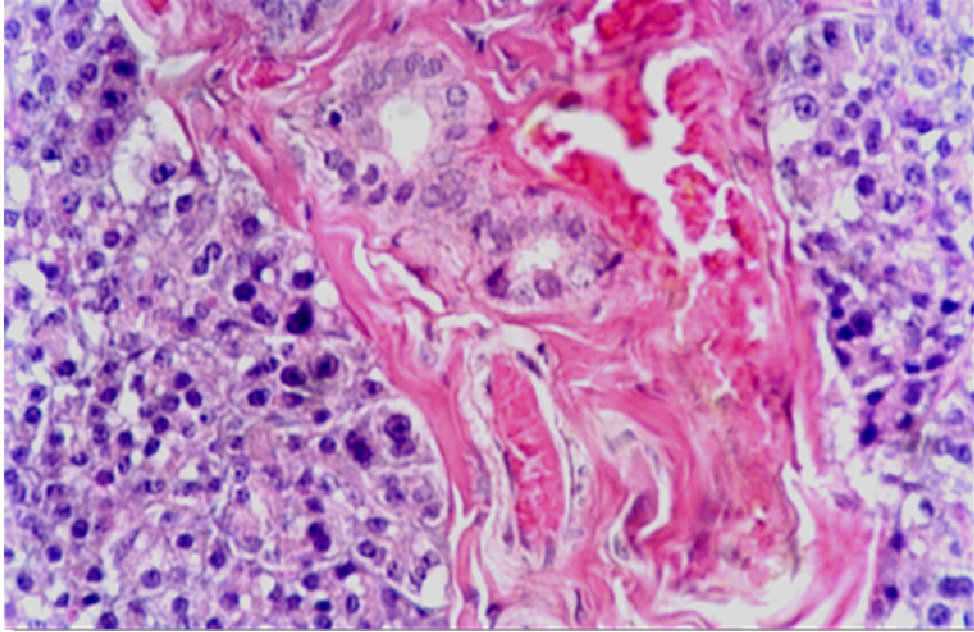


Fig. 13 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (HE ×400). Anarquia do parênquima glandular acompanhada de vacuolização. Note-se a heterocromasia nuclear. Proliferação do TCPVD com forte hialinização.

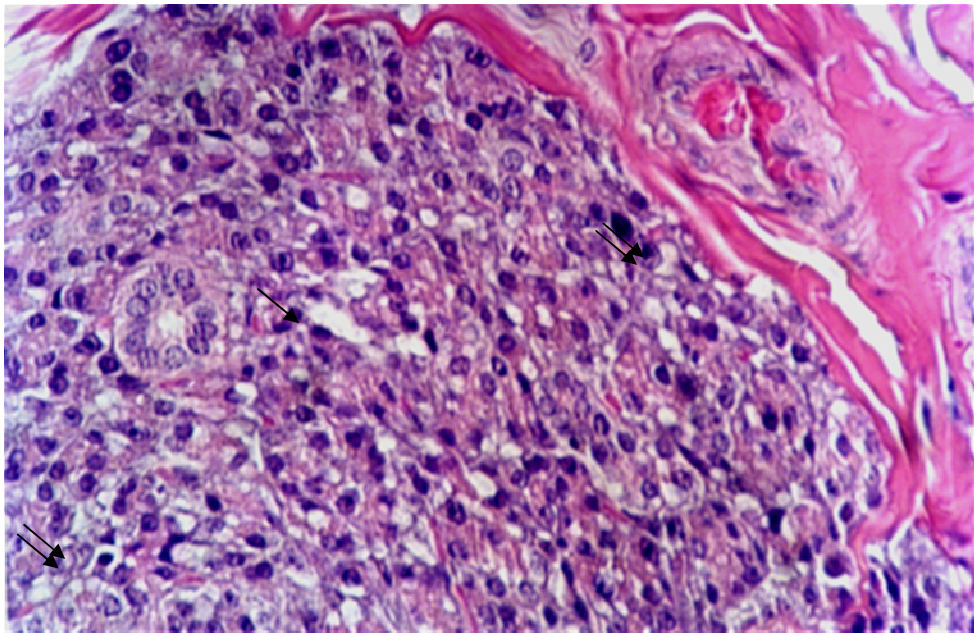


Fig. 14 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (HE ×400). Desorganização do parênquima, com vacúolos que coalescem em algumas zonas (↑). Presença de núcleos hiper cromáticos de aspecto picnótico ou fragmentado (↑↑).

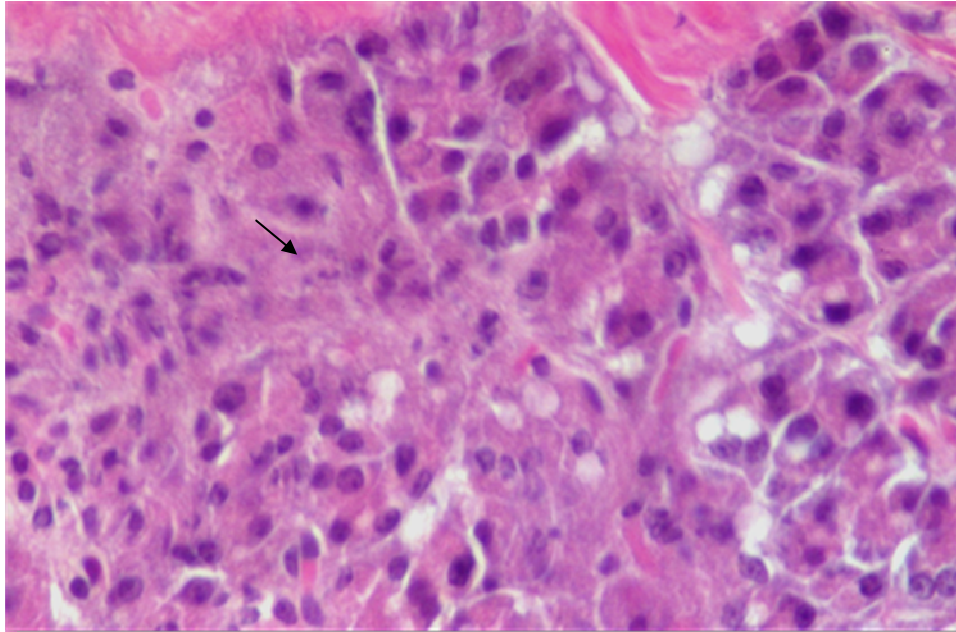


Fig. 15 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (HE ×400). Destruição do parênquima glandular com aparente substituição por tecido de aspecto indiferenciado. Aspectos sugestivos de fragmentação nuclear (↑).

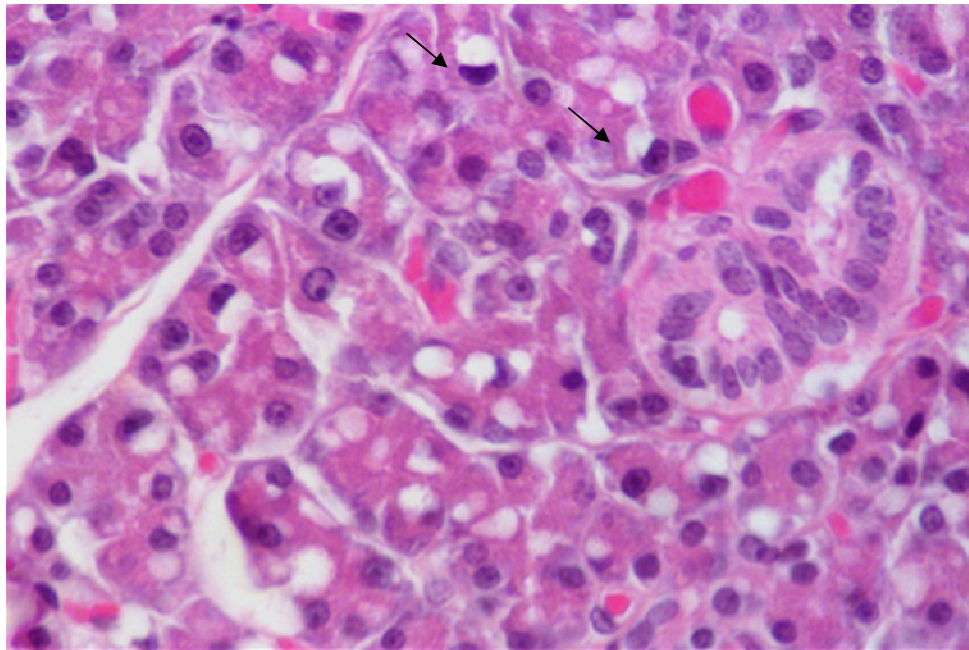


Fig. 16 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (HE ×400). Intensa vacuolização celular, com perda da anatomia normal. Os vacúolos parecem, em algumas zonas, causar empurramento do núcleo (↑), sugerindo grandes áreas do citoplasma preenchidas por esses mesmos vacúolos.

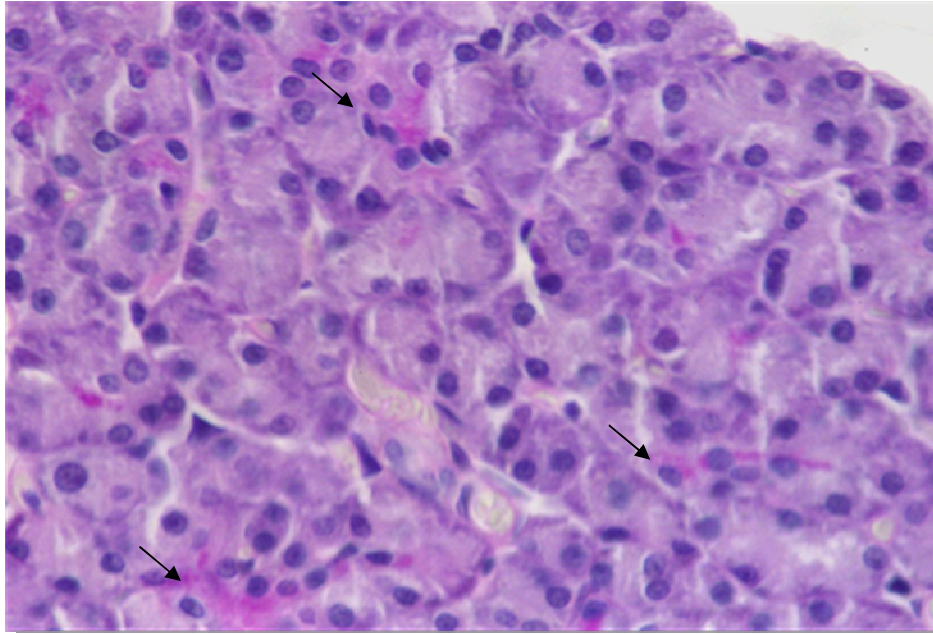


Fig. 17 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo de controlo (PAS $\times 400$). Parênquima de aspecto normal com alguma marcação glicoproteica (↑).

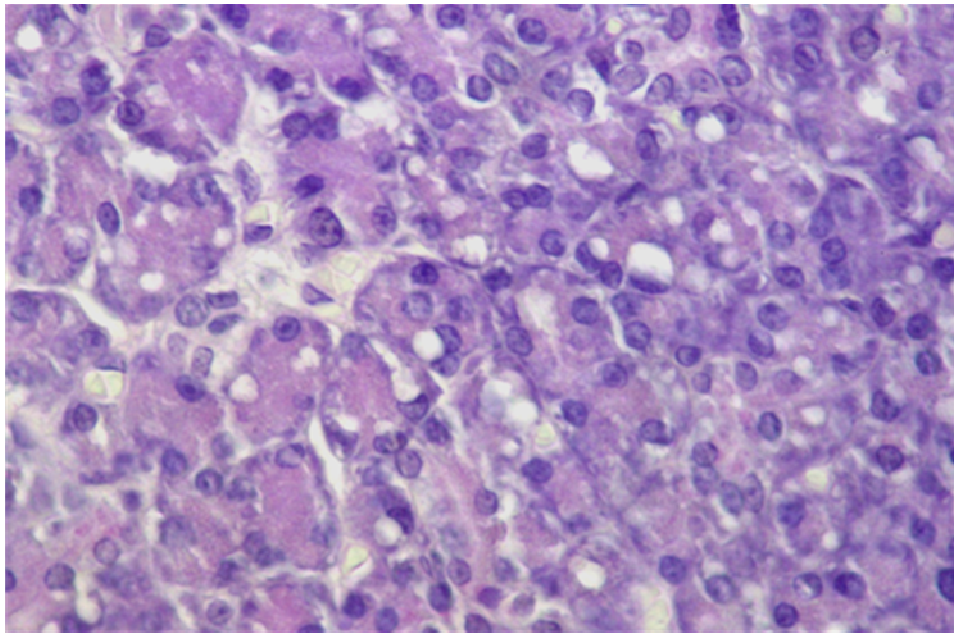


Fig. 18 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (PAS $\times 400$). Parênquima desorganizado e células intensamente vacuolizadas. Ausência de marcação para conteúdo glicoproteico.

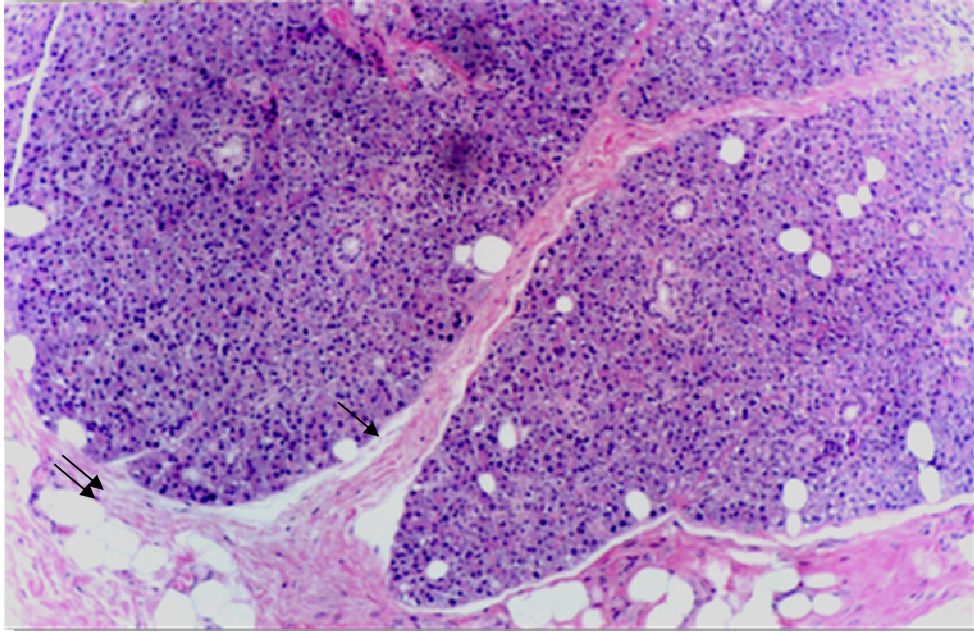


Fig. 19 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (HE x40). Importante espessamento de tecido conjuntivo fibroso interlobular (†) e perilobular (††). Discreta infiltração por grupos de células de tecido adiposo unilocular.

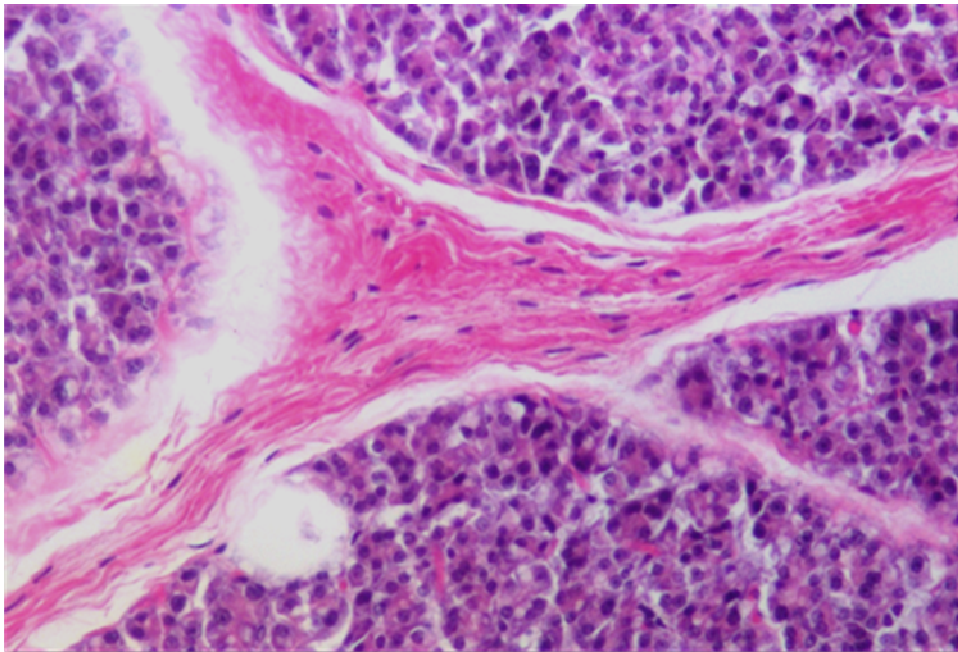


Fig. 20 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (HE x200). Espessamento interlobular à custa de tecido conjuntivo fibroso, acompanhado de desorganização parenquimatosa.

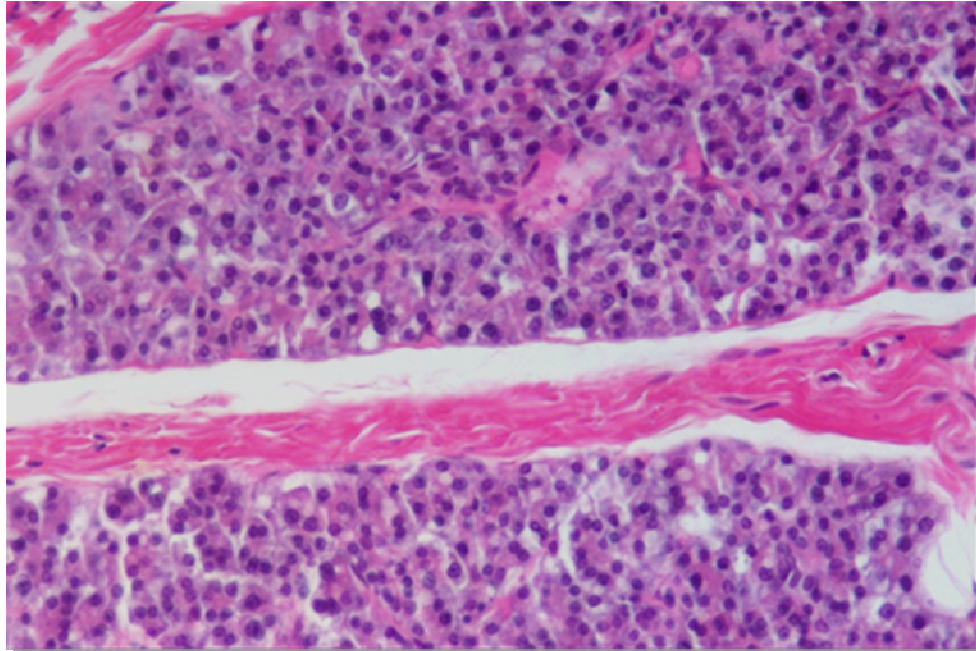


Fig. 21 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (HE $\times 200$). Na região interlobular observa-se abundante tecido conjuntivo denso. O corte longitudinal permite observar melhor a densidade das fibras colagêneas.

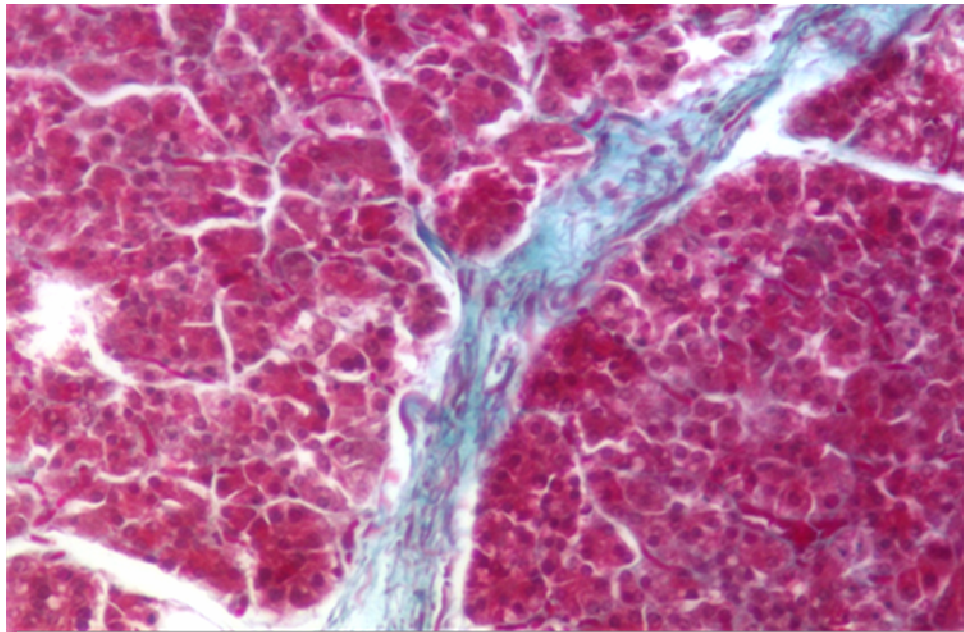


Fig. 22 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (tricrômico de Masson $\times 200$). Aspecto do septo interlobular, fortemente corado de azul-esverdeado, cor habitualmente observada nesta coloração para o colagénio.

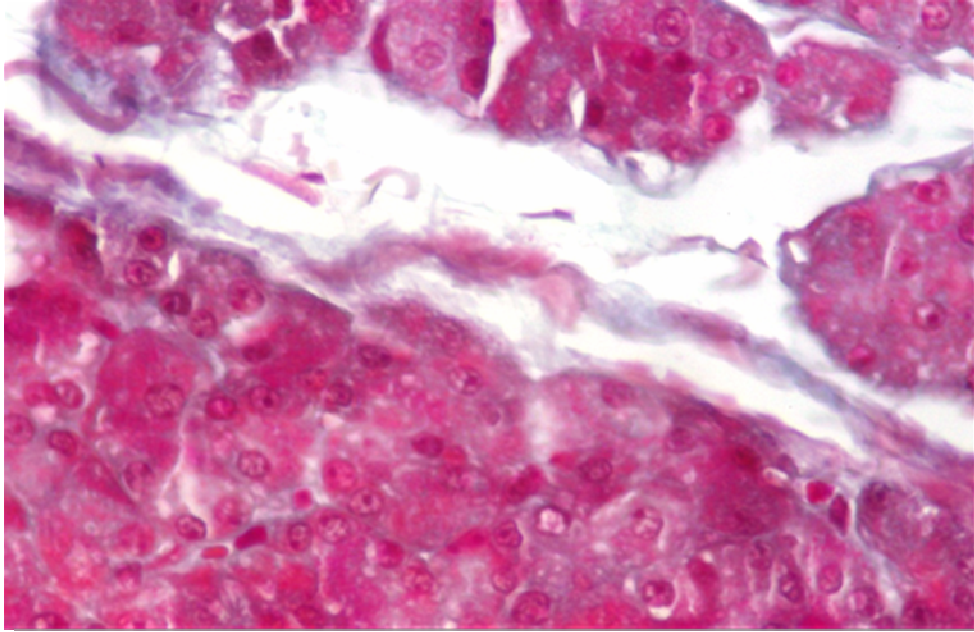


Fig. 23 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo de controlo (tricrómico de Masson $\times 400$). Delgado septo de tecido conjuntivo interlobular, com escassos feixes de fibras colagéneas.

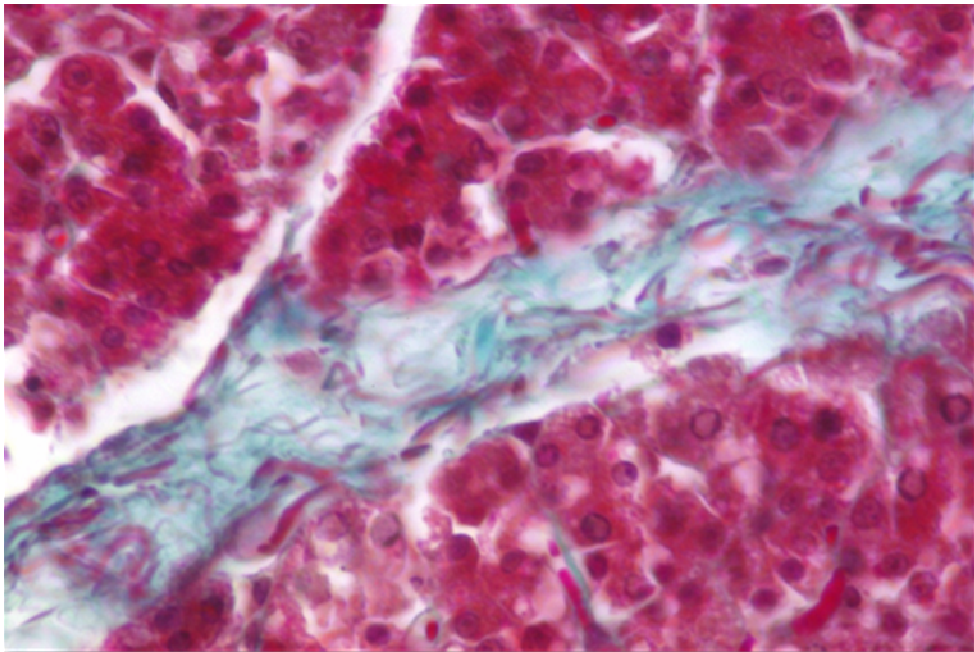


Fig. 24 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (tricrómico de Masson $\times 400$). Abundância de tecido conjuntivo rico em fibras de colagénio.

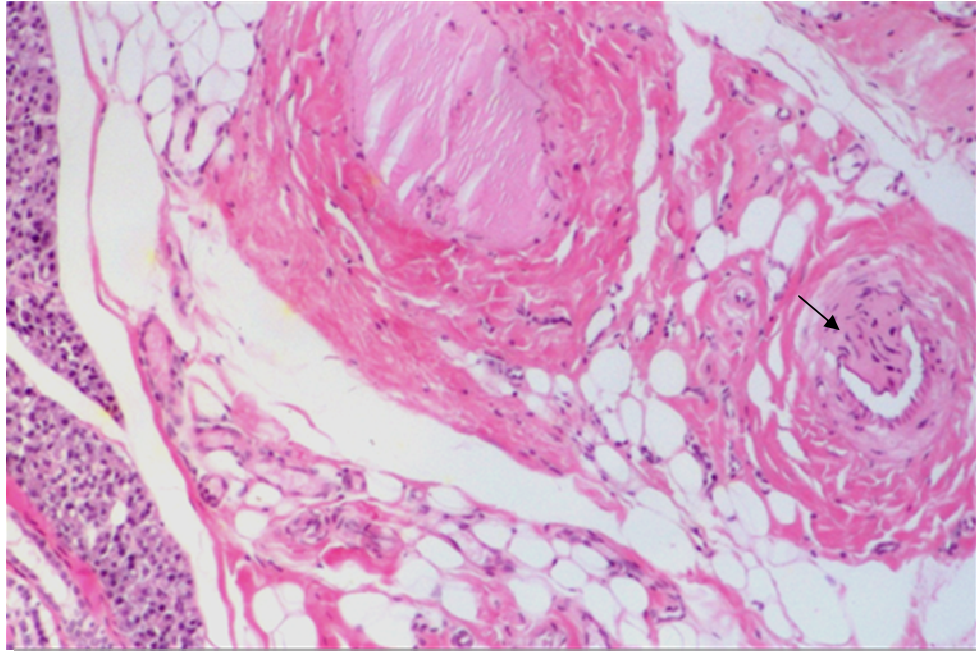


Fig. 25 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (HE ×40). Lesão vascular de tipo trombótico (†) em vaso de médio calibre, associada a uma proliferação fibrosa da íntima que abrange a média, diminuindo substancialmente o lume vascular.

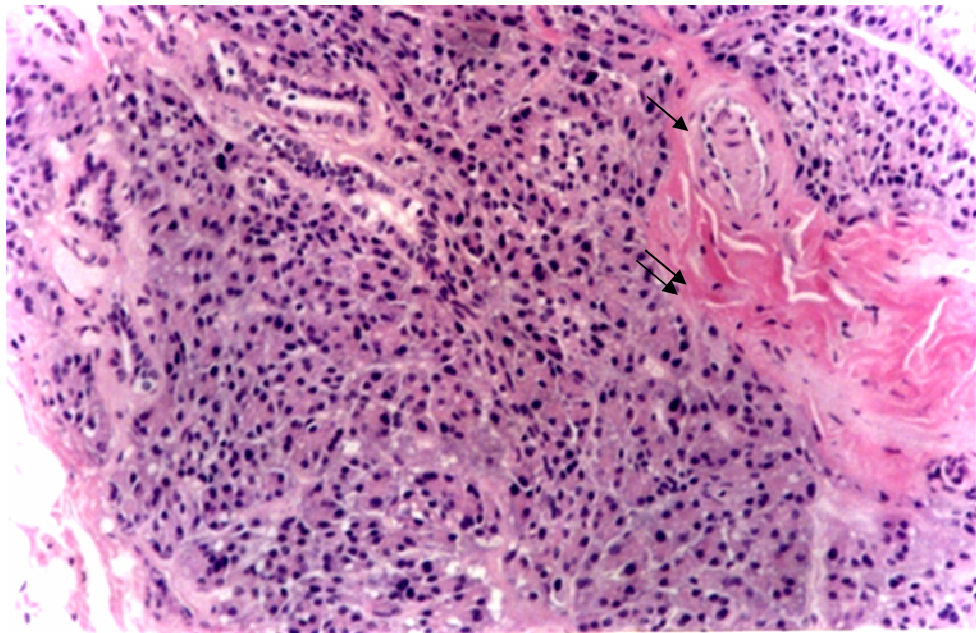


Fig. 26 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (HE ×100). Lesão vascular (†) constituída por tecido conjuntivo hialinizado, que parece ocluir quase totalmente o lume (††). Identifica-se também alguma vacuolização celular e desorganização parenquimatosa.

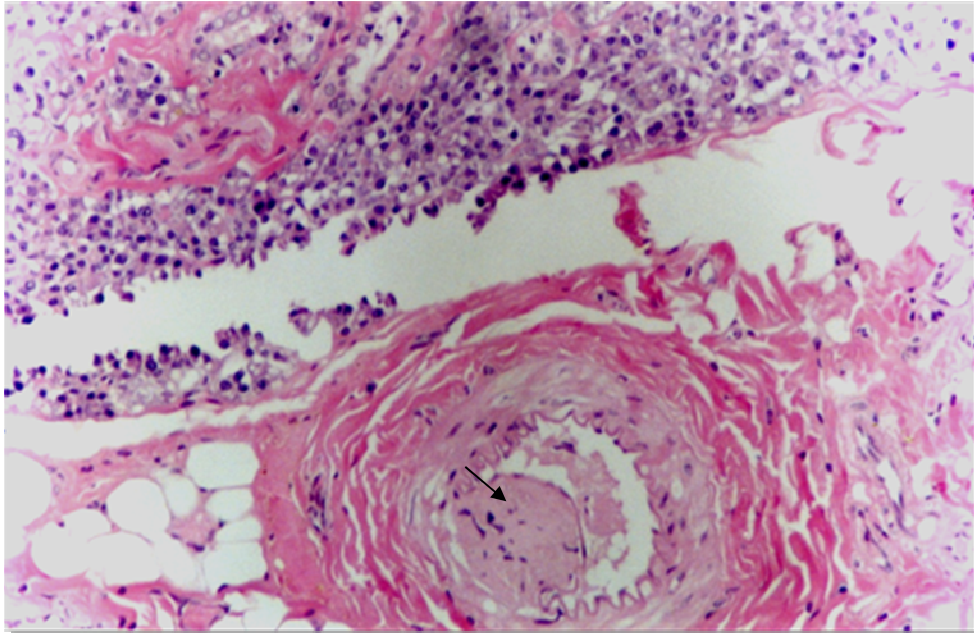


Fig. 27 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (HE ×100). Vaso de médio calibre identificando-se áreas de vacuolização da média e proliferação de uma massa eosinófila com raras estruturas nucleares, que se desenvolve de modo a obstruir parcialmente o lume vascular (†). Este vaso está rodeado por feixes de fibras colágenas, dispostas concêntrica. Na parte superior da imagem parênquima de aspecto desorganizado e aparentemente substituído por tecido conjuntivo fibroso.

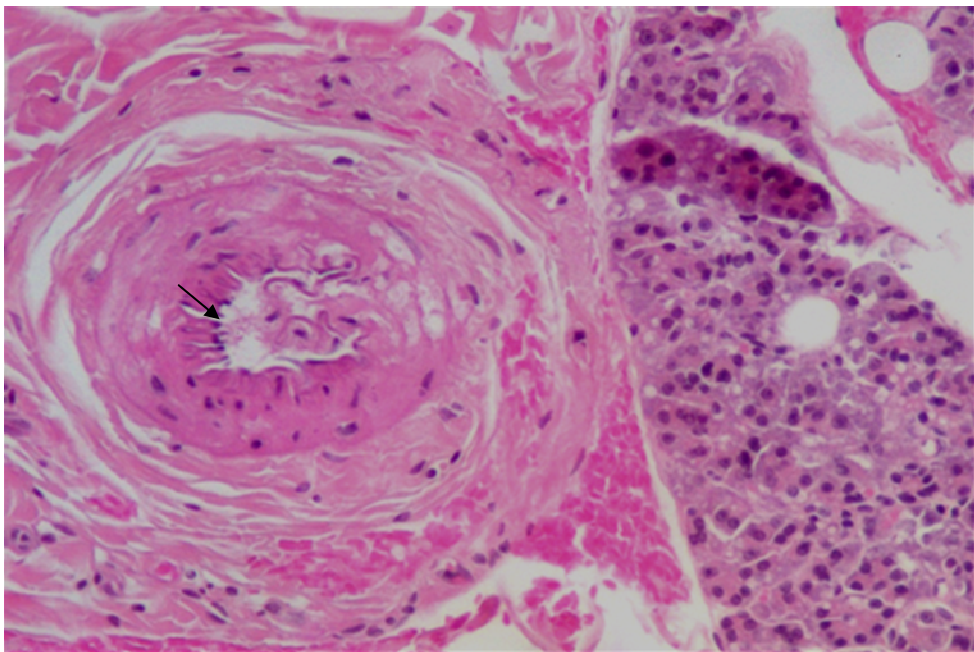


Fig. 28 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (HE ×100). Lesão em vaso de médio calibre com ruptura da íntima (†) e importante espessamento da camada média com áreas vacuolizadas. Fibrose perivascular de aspecto concêntrico.

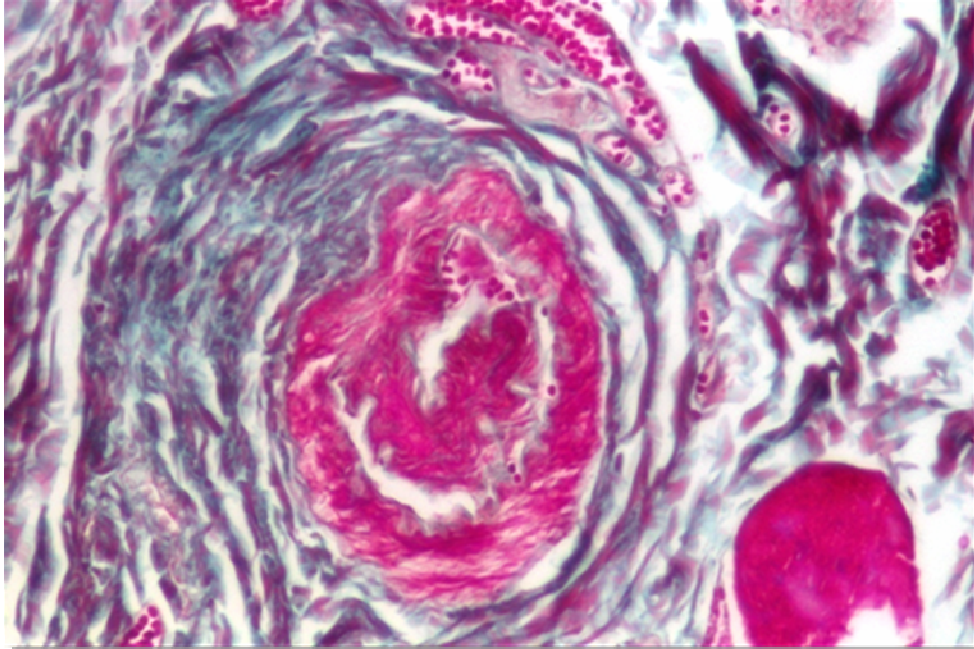


Fig. 29 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (Tricômico de Masson $\times 200$). Lesão vascular com vacuolização e ruptura parcial da camada muscular. Abundante tecido conjuntivo fibroso de disposição concêntrica.

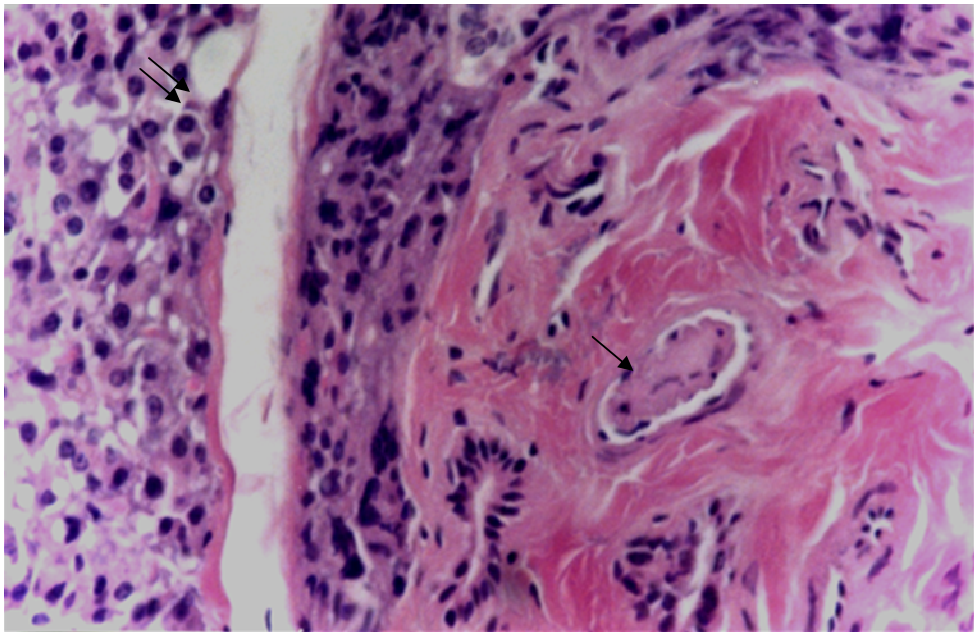


Fig. 30 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (HE $\times 400$). Lesão vascular parcialmente oclusiva (\uparrow), que preenche o lume na sua quase totalidade. Marcada vacuolização do parênquima e aspectos sugestivos de morte celular ($\uparrow\uparrow$). Fibrose com forte hialinização do TCPVD.

Morfometria – Análise Estatística

Para quantificação da fibrose, efectuámos medições, para um valor ordinal absoluto, ao perímetro de tecido conjuntivo perivásculo-ductal (TCPVD).

Grupo	Exposição ao RBF	Nº de medições	Média das áreas	Desvio Padrão
gC	Ø	46	3,5335	2,49288
g1	1 semana	46	5,1433	3,94804
g2	3 semanas	39	6,7938	4,32579
g3	5 semanas	33	6,4015	3,23013
g4	9 semanas	41	8,8795	7,46172
g5	13 semanas	42	14,3486	11,65720

Quadro I – Variação da média das áreas de TCPVD com o tempo de exposição ao RBF

Os resultados foram avaliados por grupos (Quadro I).

As áreas de TCPVD apresentam uma variação crescente até ao g2, 3^a semana, diminuindo ligeiramente no grupo g3, 5^a semana, para voltarem a crescer até ao g5, 13 semanas (Gráfico 1).

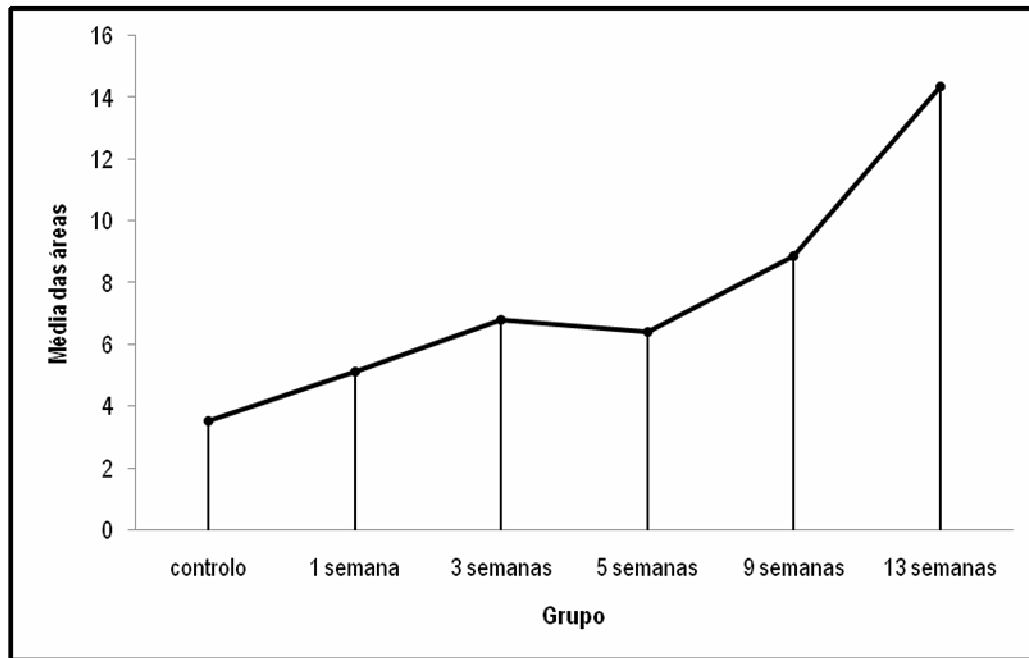


Gráfico 1 – evolução das médias de TCPVD com o tempo de exposição ao RBF

Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade de variância dos resultados são claramente violados, contudo, tal não é impeditivo desta análise porquanto não se verificam assimetrias de sinal contrário nem grandes assimetrias na dimensão dos grupos.

Confirmámos a normalidade da distribuição dos dados com o teste de Shapiro-Wilk após correcção da significância de Lilliefors (Quadro II).

Grupo	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig
gC	.206	46	.000	.720	46	.000
g1	.204	46	.000	.768	46	.000
g2	.217	39	.000	.829	39	.000
g3	.154	33	.046	.953	33	.158
g4	.209	41	.000	.652	41	.000
g5	.178	42	.002	.867	42	.000
g6	.264	36	.000	.644	36	.000

Quadro II – Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)

Verificou-se a homogeneidade das variâncias entre grupos com o teste de Levene (Quadro III).

Grupo	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Area				
Based on Mean	13.961	6	276	.000
Based on Median	7.163	6	276	.000
Based on Median and with adjusted df	7.163	6	86.503	.000
Based on trimmed mean	10.645	6	276	.000

Quadro III – Teste de homogeneidade das variâncias (Levene)

Tendo em conta a heterogeneidade das variâncias aplicou-se a ANOVA de Welch para as comparações múltiplas entre os grupos. Os resultados obtidos mostram-se no quadro seguinte (Quadro IV) e revelam a existência de diferenças significativas nas áreas médias de TCPVD, entre grupos, com $p < 0,001$.

Robust Tests of Equality of Means

Area

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	12.308	6	116.544	.000

a. Asymptotically F distributed.

Quadro IV – Teste de Welch

Para comparações múltiplas entre grupos dois a dois, e tendo em conta a heterogeneidade de variâncias, aplicou-se o teste “post-hoc” de Tamhane ao nível de significância de 5%, com os resultados que constam no quadro seguinte (Quadro V), no qual as comparações assinaladas com (*) denotam a existência de uma diferença significativa entre as médias dos grupos considerados.

Verificou-se que o grupo de controlo possui diferenças significativas para os outros grupos, portanto, o RBF produz lesões com efeitos significativos a partir da primeira semana de exposição. Pudémos também verificar que há diferenças significativas nos grupos expostos ao RBF, com excepção do g4, 9 semanas de exposição ao ruído, que só apresenta diferença significativa para o grupo de controlo. O g5, 13 semanas de exposição ao RBF é o que apresenta mais diferenças para os outros grupos expostos ao RBF, parecendo indicar uma tendência de maior aumento das áreas de TCPVD com a maior exposição ao RBF. Do grupo g2, 3ª semana de exposição ao RBF para o grupo g3, 5ª semana de exposição ao RBF há uma estabilização na média das áreas de TCPVD ($p=1,000$).

(I) Grupo	(J) Grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence interval	
					Lower bound	Upper Bound
controllo	1 semana	- 1.60978	.68844	.373	- 3.7684	.5488
	3 semanas	- 3.26037*	.78416	.002	- 5.7447	- .7761
	5 semanas	- 2.86804*	.67177	.002	- 4.9976	- .7385
	9 semanas	- 5.34603*	1.22192	.001	- 9.2560	- 1.4360
	13 semanas	- 10.81509*	1.83591	.000	- 16.7157	- 4.9145
1 semana	controllo	1.60978	.68844	.373	- .5488	3.7684
	3 semanas	- 1.65059	.90480	.792	- 4.4852	1.1841
	5 semanas	- 1.25825	.80933	.938	- 3.7964	1.2799
	9 semanas	- 3.73625	1.30262	.113	- 7.8610	.3885
	13 semanas	- 9.20531*	1.89059	.000	- 15.2441	- 3.1665
3 semanas	controllo	3.26037*	.78416	.002	.7761	5.7447
	1 semana	1.65059	.90480	.792	- 1.1841	4.4852
	5 semanas	.39233	.89218	1.000	- 2.4149	3.1995
	9 semanas	- 2.08567	1.35565	.945	- 6.3619	2.1905
	13 semanas	- 7.55473*	1.92751	.005	- 13.6911	- 1.4184
5 semanas	controllo	2.86804	.67177	.002	.7385	4.9976
	1 semana	1.25825	.80933	.792	- 1.2799	3.7964
	3 semanas	.39233	.89218	1.000	- 3.1995	2.4149
	9 semanas	- 2.47800	1.29389	.730	- 6.5823	1.6263
	13 semanas	- 7.94706*	1.88458	.002	- 13.9715	- 1.9226
9 semanas	controllo	5.34603*	1.22192	.001	1.4360	9.2560
	1 semana	3.73625	1.30262	.113	- .3885	7.8610
	3 semanas	2.08567	1.35565	.945	- 2.1905	6.3619
	5 semanas	2.47800	1.29389	.730	- 1.6263	6.5823
	13 semanas	- 5.46906	2.14324	.239	- 12.2090	1.2709
13 semanas	controllo	10.81509*	1.83591	.000	4.9145	16.7157
	1 semana	9.20531*	1.89059	.000	3.1665	15.2441
	3 semanas	7.55473*	1.92751	.005	1.4184	13.6911
	5 semanas	7.94706*	1.88458	.002	1.9226	13.9715
	9 semanas	5.46906	2.14324	.239	- 1.2709	12.2090

Quadro V – Teste de Tamhane

Finalmente, para verificar se existia uma relação entre o valor médio da área e o nível do factor, ou seja, a duração da exposição ao ruído, procedeu-se à análise dos contrastes usando um polinómio de 1º grau para a partição da soma dos quadrados entre grupos (Quadro VI).

ANOVA

Area

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Combined)		4542.024	6	757.004	10.238	.000
	Linear Term	Weighted	4320.384	1	4320.384	58.428	.000
		Deviation	221.640	5	44.328	.599	.700
Within Groups			20408.408	276	73.944		
Total			24950.432	282			

Quadro VI – ANOVA (análise dos contrastes)

Os resultados que constam no último quadro demonstram que a tendência global para as áreas de TCPVD é de aumento, e que a área média de TCPVD cresce linearmente e de forma significativa com o tempo de exposição ao RBF, com $p < 0,001$.

Morfologia – Imunohistoquímica

gC - controlo

Pudémos identificar no grupo de controlo, imunomarcção para colagénio I no TCPVD (Fig. 31 e 32) e ainda nos septos interlobulares (Fig. 33). Ao nível do colagénio V há marcação nos septos de tecido conjuntivo (Fig. 34) mas é negativa no TCPVD (Fig. 35). Pudémos ainda observar discreta marcação para o colagénio IV nas membranas basais dos pequenos vasos da glândula e nos colectores do sistema excretor (Fig. 36 e 37).

g5 – 13 semanas RBF

Neste grupo, há um aumento da intensidade da marcação para o colagénio I nos septos interlobulares (Fig. 40 e 41) bem como no TCPVD (Fig. 37, 38 e 39). Há também um aparente aumento das áreas de TCPVD (Fig. 36) que, em conjunto com os dados estatísticos da análise morfométrica, nos permitem afirmar que parte desse aumento se deve, em parte, à proliferação de colagénio I.

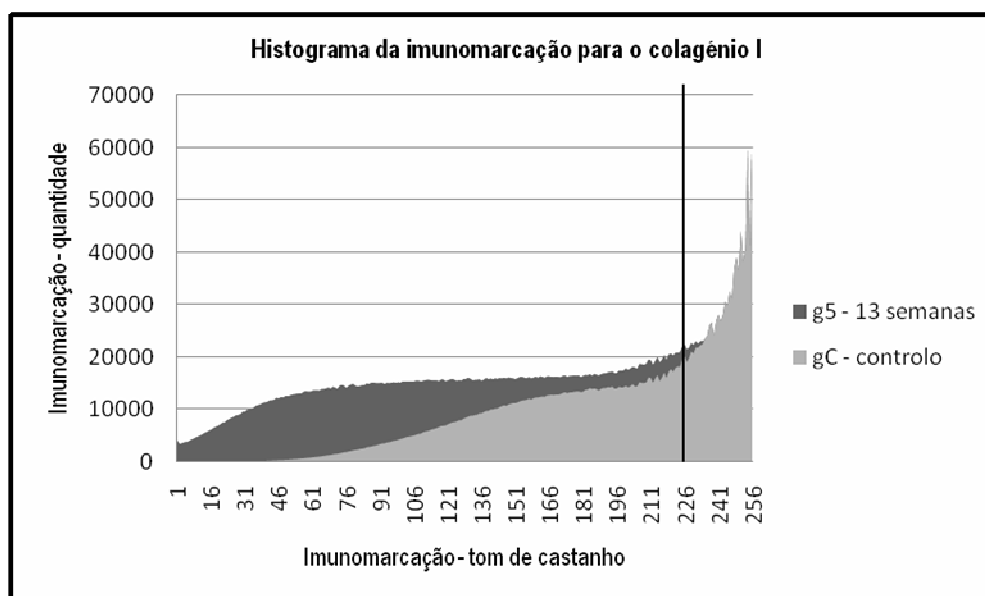


Gráfico 2 – Histograma das médias da marcação para o colagénio I no gC e o g5. O g5 apresenta mais quantidade e maior densidade de marcação, (tons de castanho: nºs menores – mais marcação).

No que diz respeito à análise estatística da quantificação numérica das intensidades de c6r na imunomarca73o para o colag6nio I, o teste n3o param6trico de Mann-Whitney identificou uma diferen73a significativa ($U=10$; $p<0,001$) entre a raz3o dos castanhos mais intensos e os castanhos totais do grupo de controlo para o grupo exposto a 13 semanas de RBF (Quadros VII e VIII).

Ranks

code	N	Mean Rank	Sum of ranks
Imunomarca73o colag6nio I controlo	11	6.91	76.00
13 semanas RBF	11	16.09	177.00
Total	22		

Quadro VII – MANN-WHITNEY – imunomarca73o

Test Statistic^b

	Imunomarca73o colag6nio I
Mann-Whitney U	10.000
Wilcoxon W	76.000
Z	-3.316
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001
Exact Sig. [2* (1-tailed Sig.)]	.000^a

a. Not corrected for ties.

Quadro VIII – MANN-WHITNEY – imunomarca73o.

b. Grouping Variable: code

Ao n6vel do colag6nio V h3a um aumento de imunomarca73o nos septos interlobulares (Fig. 45) e aus6ncia de marca73o no TCPVD (Fig. 42, 43 e 44).

No colagénio IV não se verificou alteração na imunomarcacão do grupo de controlo para o g5 mantendo-se a marcação nos colectores do sistema excretor (Fig 48 e 49) e nas membranas basais dos pequenos vasos da glândula (Fig. 50 e 51).

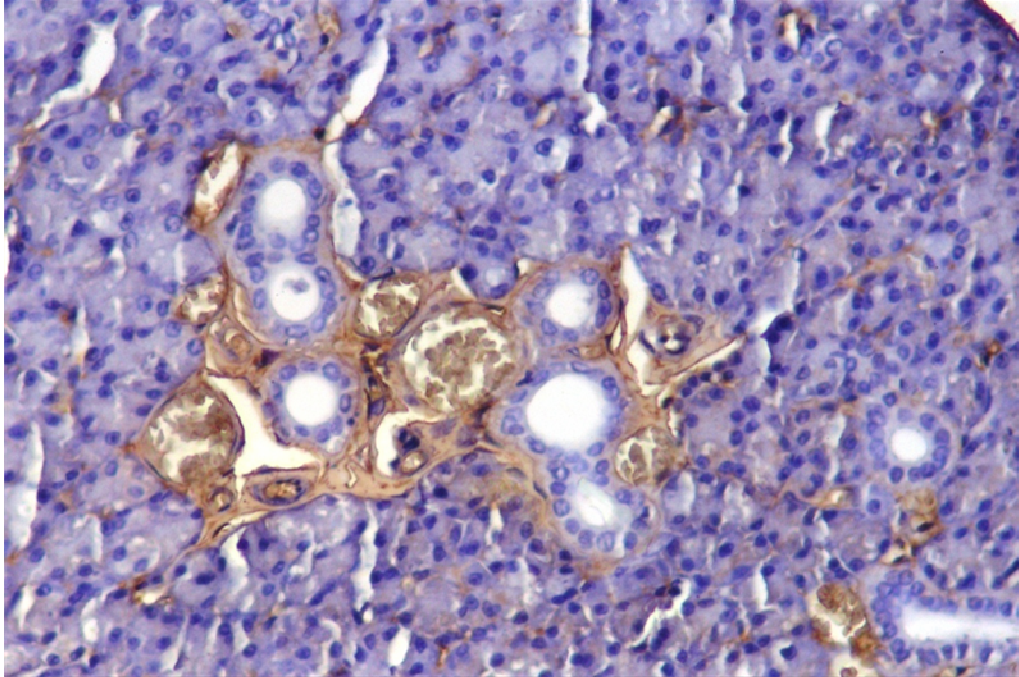


Fig. 31 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo de controlo (Imunomarcção para colagénio I $\times 200$). Marcação para colagénio I no TCPVD.

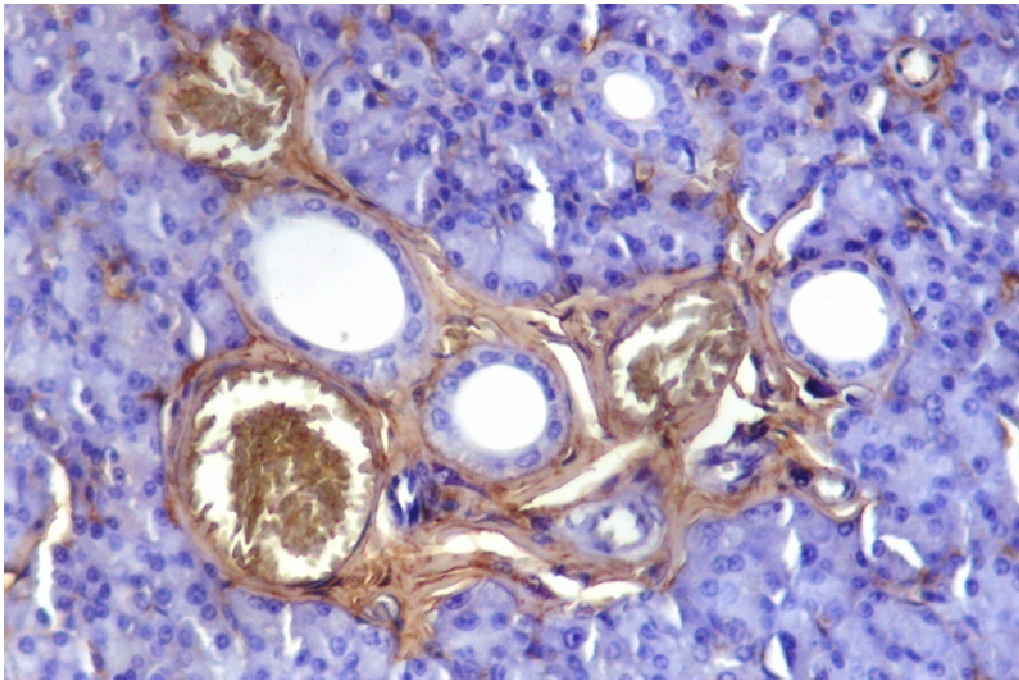


Fig. 32 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo de controlo (Imunomarcção para colagénio I $\times 200$). Observa-se marcação para colagénio I no TCPVD.

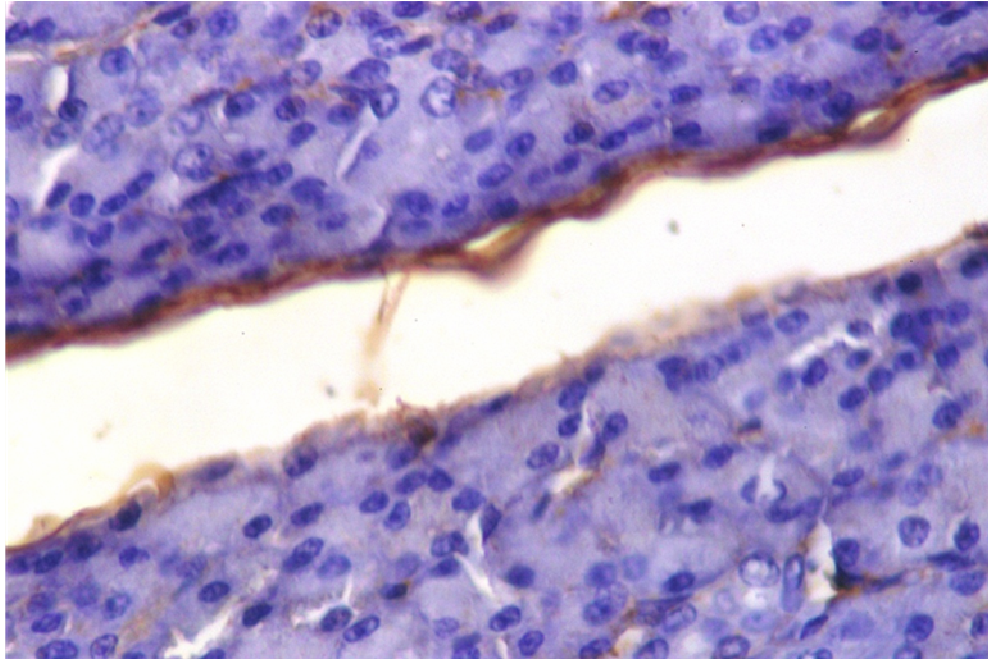


Fig. 33 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo de controle (Imunomarcção para colagénio I $\times 400$). Marcação para colagénio I nos septos de tecido conjuntivo interlobular.



Fig. 34 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo de controle (Imunomarcação para colagénio V $\times 200$). Marcação para colagénio V nos finos septos de tecido conjuntivo interlobular.

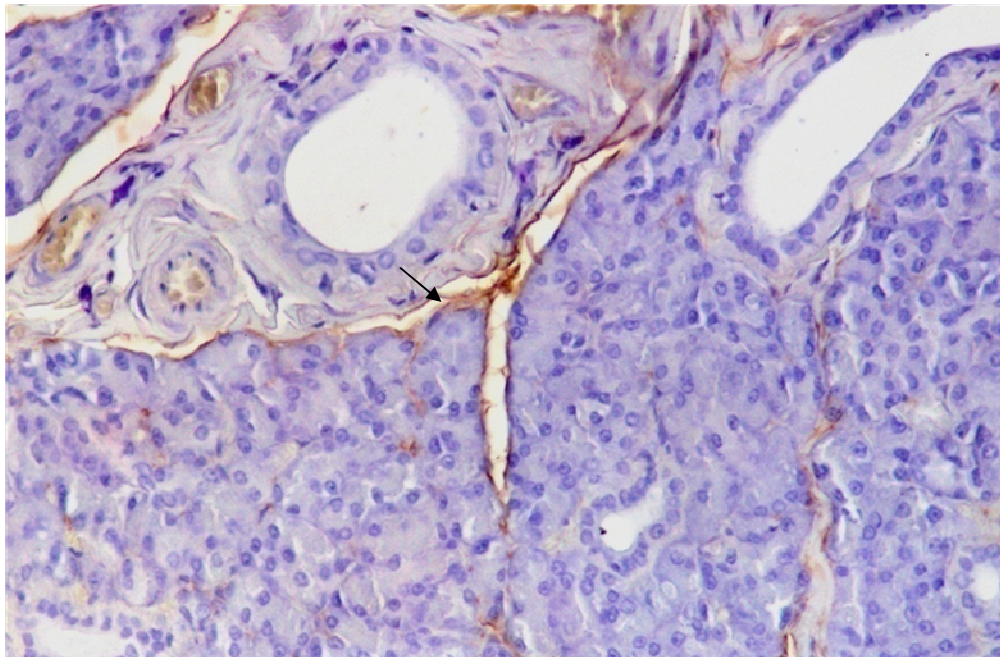


Fig. 35 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo de controle (Imunomarcação para colagénio V $\times 200$). Observa-se marcação discreta para o colagénio V (†) e ausência de marcação no TCPVD.

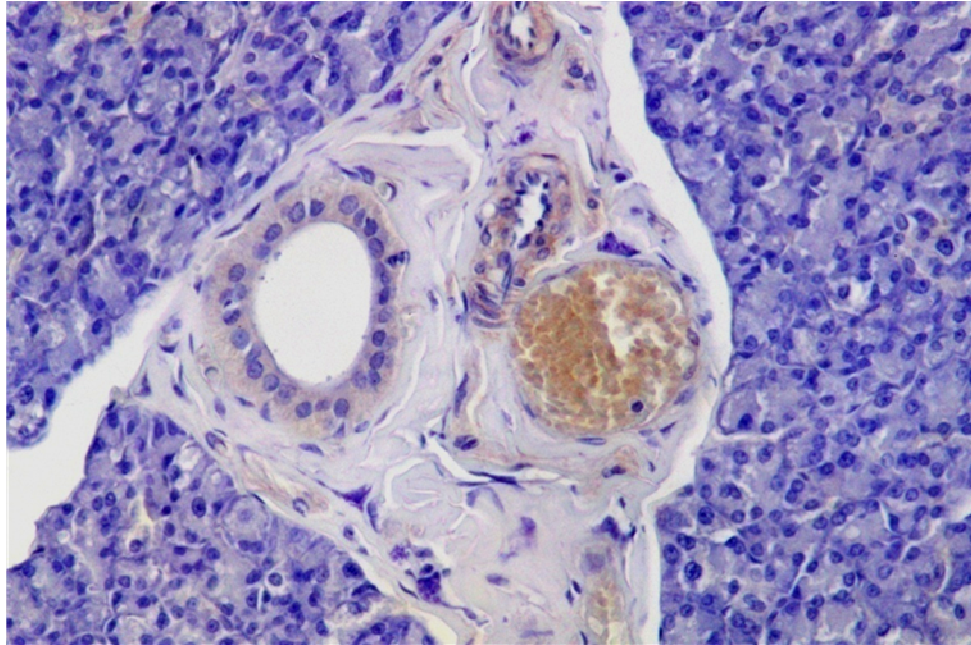


Fig. 36 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo de controlo (Imunomarcção para colagénio IV $\times 200$). Discreta marcação para colagénio IV nos vasos e nos colectores do TCPVD.

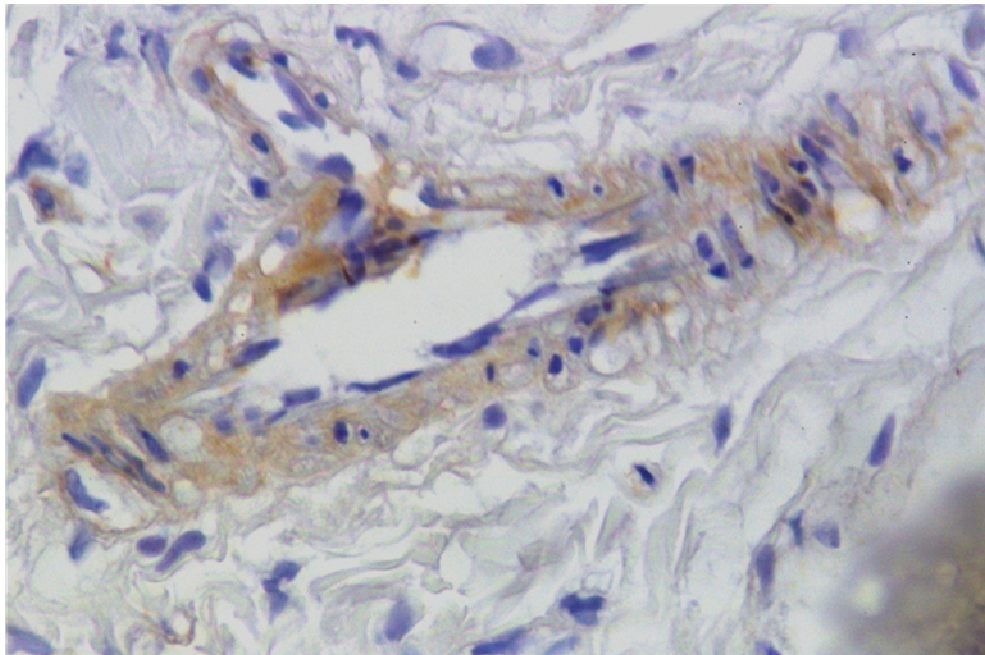


Fig. 37 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo de controlo (Imunomarcção para colagénio IV $\times 400$). Marcação para colagénio IV num vaso de médio calibre.

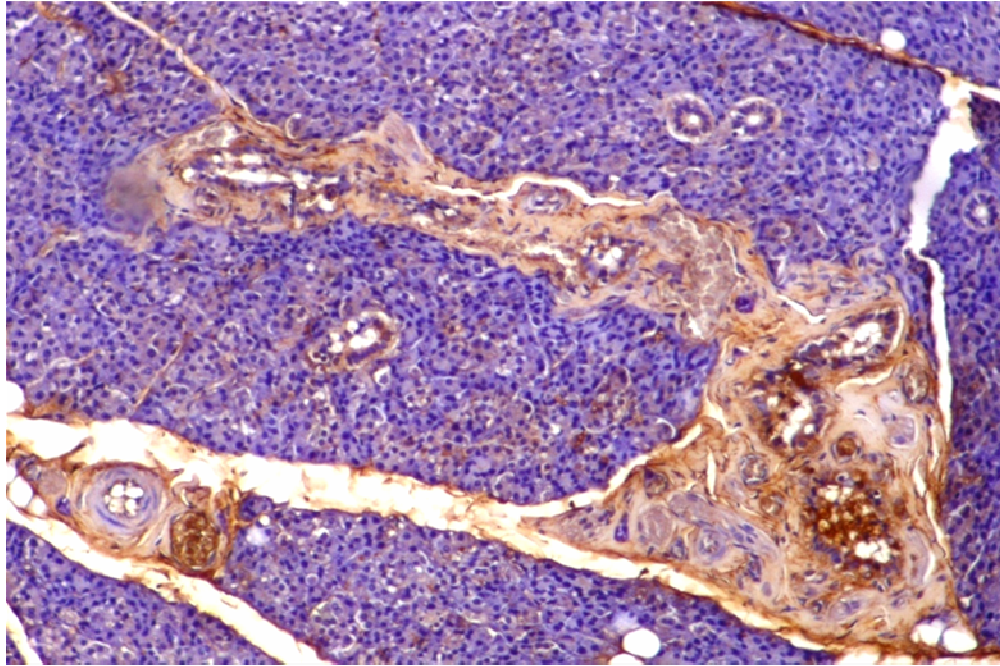


Fig. 38 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (Imunomarcção para colagénio I $\times 100$). Aumento da marcação para o colagénio I no TCPVD.

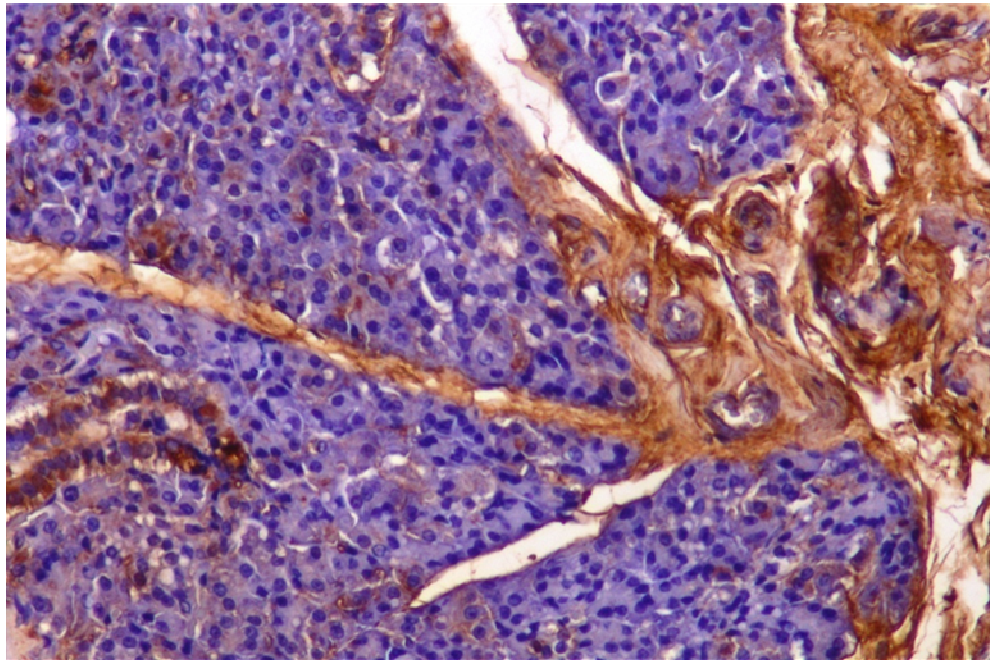


Fig. 39 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (Imunomarcção para colagénio I $\times 200$). Aumento de marcação para o colagénio I.

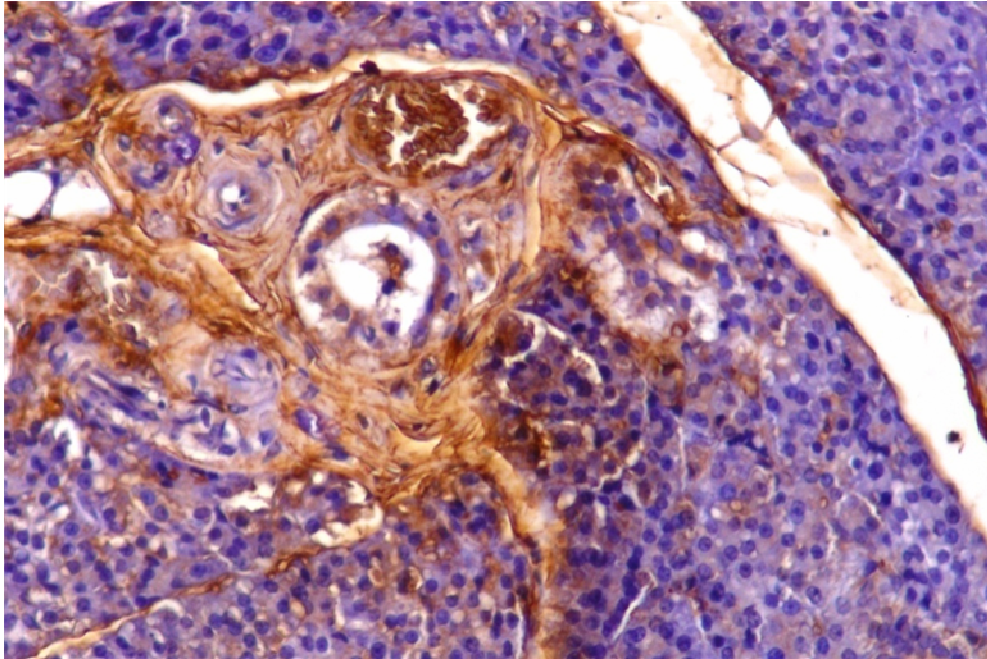


Fig. 40 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (Imunomarcção para colagénio I $\times 200$). Aumento da marcação para colagénio I no TCPVD.

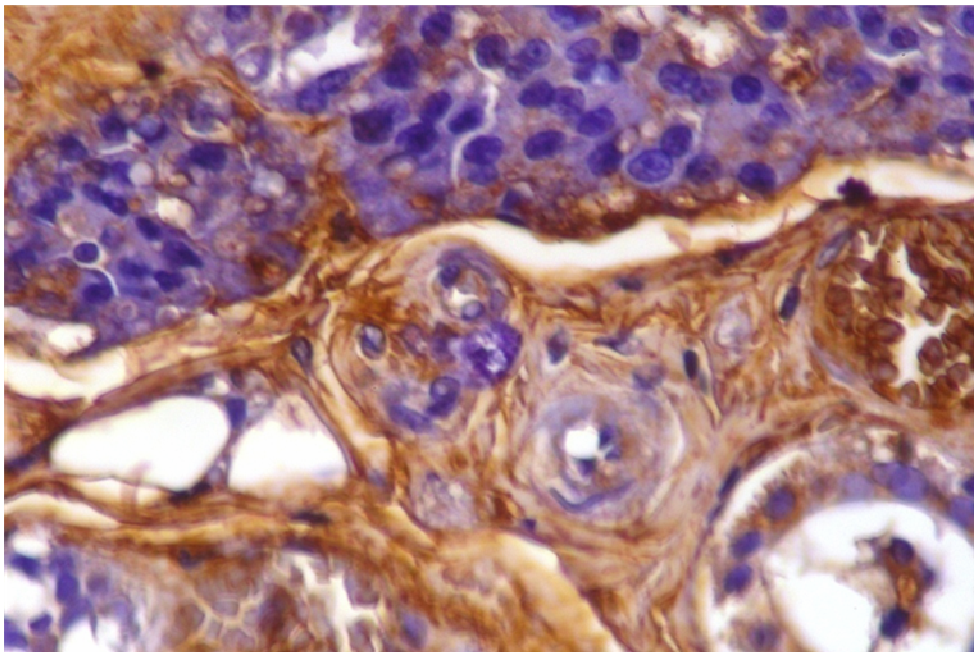


Fig. 41 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (Imunomarcção para colagénio I $\times 400$). Observa-se aumento da marcação para colagénio I no TCPVD.

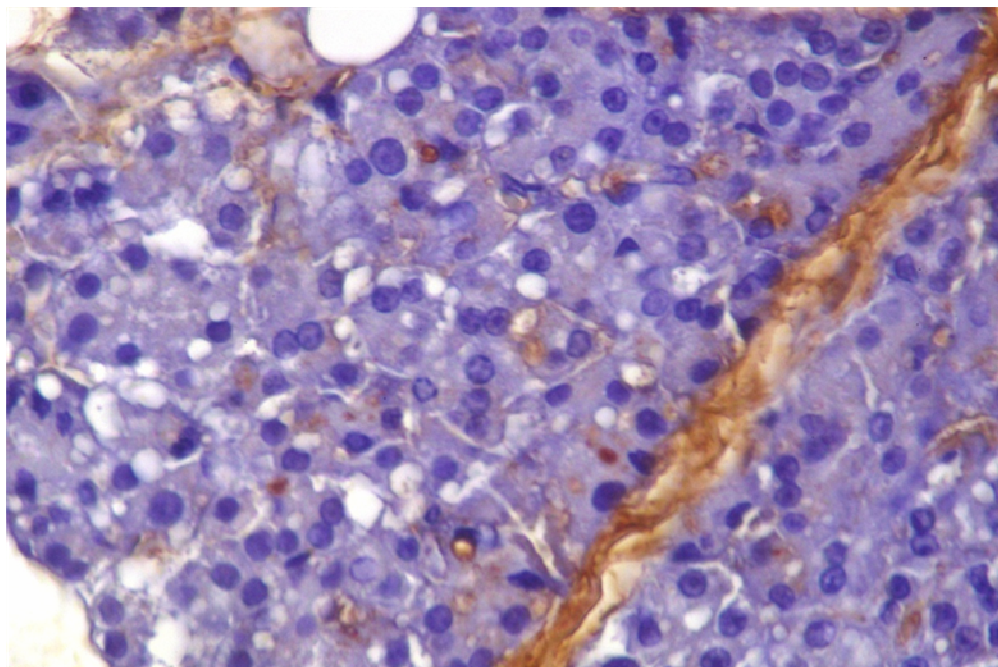


Fig. 42 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (Imunomarcção para colagénio I $\times 400$). Observa-se aumento da marcação para o colagénio I.

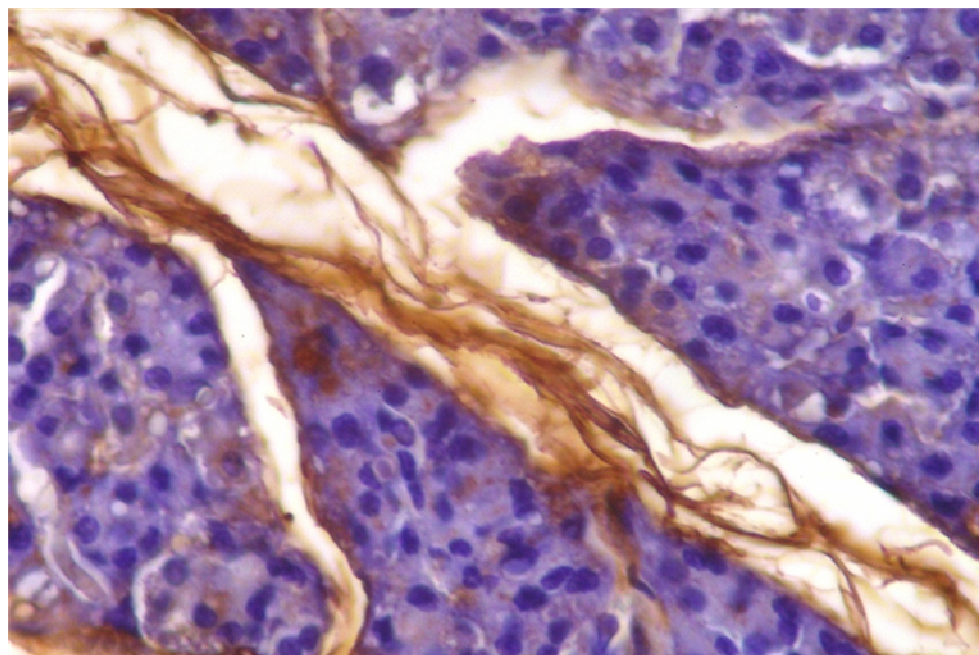


Fig. 43 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (Imunomarcção para colagénio I $\times 400$). Observa-se aumento da marcação para o colagénio I nos septos interlobulares.

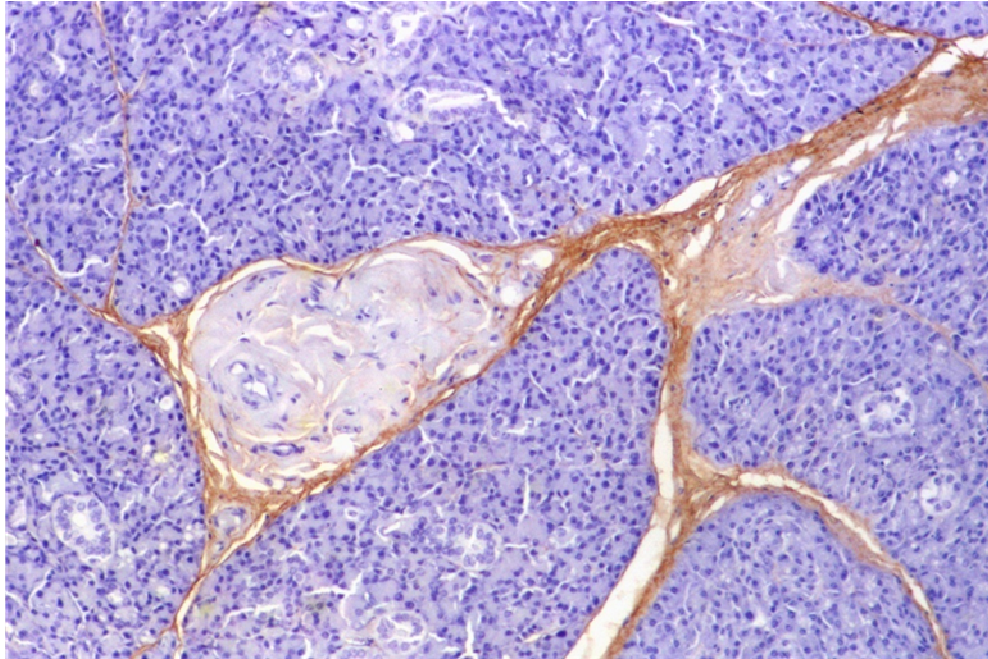


Fig. 44 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (Imunomarcção para colagênio V $\times 100$). Note-se o aumento de marcação ao nível dos septos mas não ao nível do TCPVD.

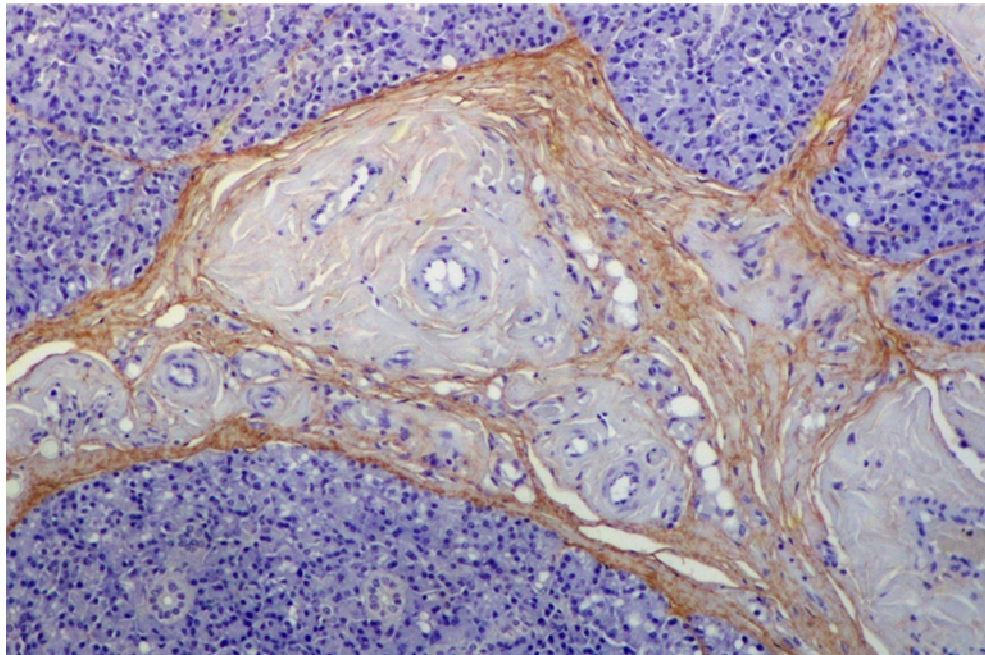


Fig. 45 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (Imunomarcção para colagênio V $\times 100$). Aumento da marcação nos septos e, a nível periférico, nas "ilhas" de TCPVD.

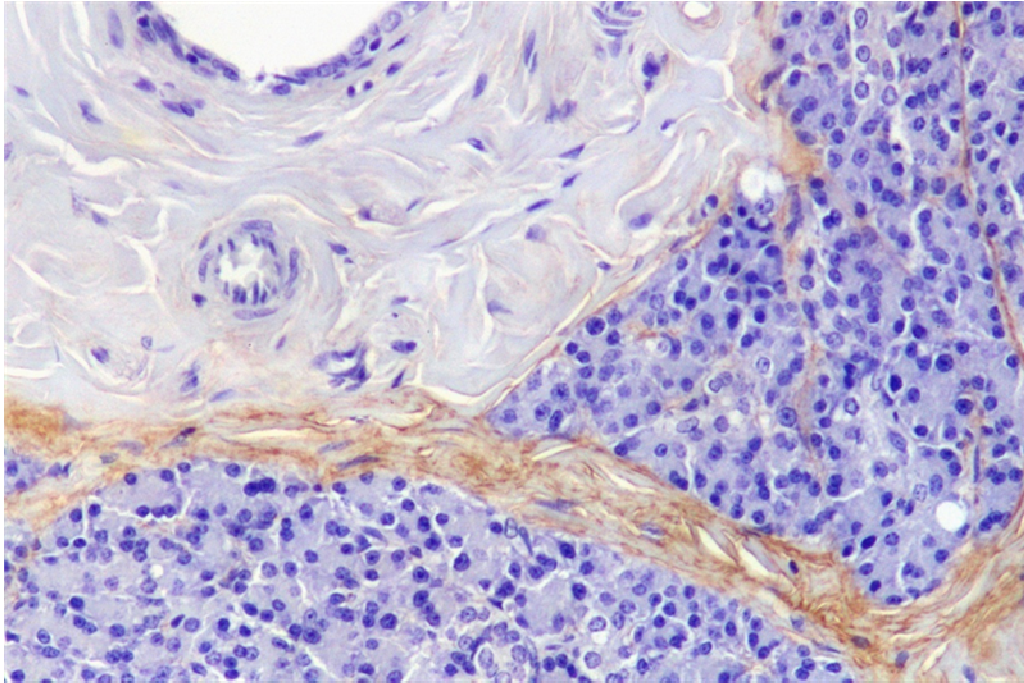


Fig. 46 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (Imunomarcção para colagénio V $\times 200$). Um pormenor do aumento do colagénio V ao nível do septo mas não do TCPVD.

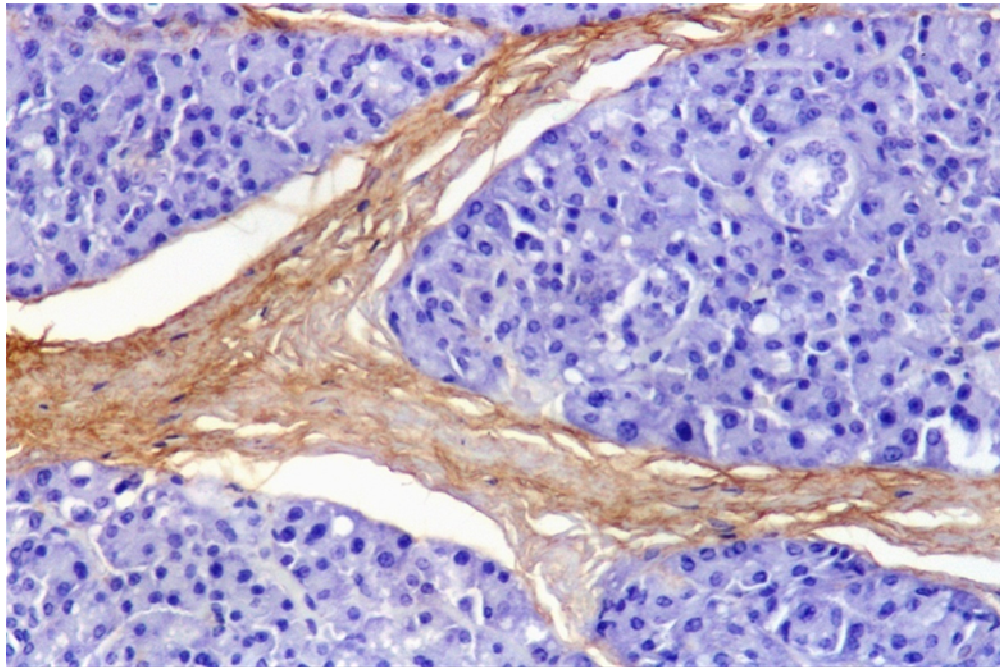


Fig. 47 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (Imunomarcção para colagénio V $\times 200$). Observa-se aumento da marcação nos septos de tecido conjuntivo.

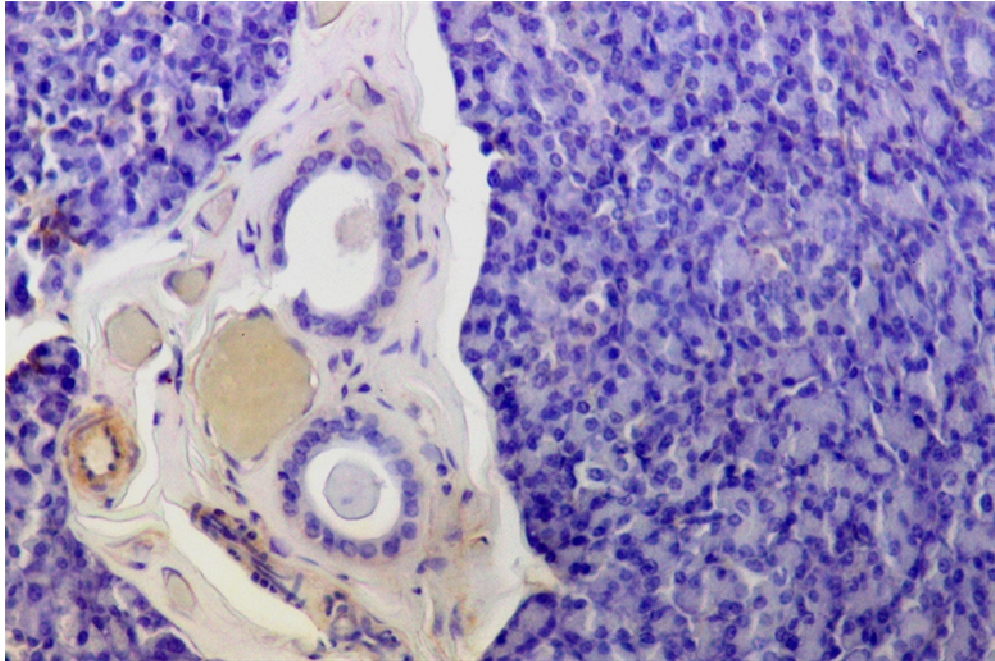


Fig. 48 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (Imunomarcção para colagénio IV $\times 200$). Discreta marcação para colagénio IV nos vasos e nos colectores.

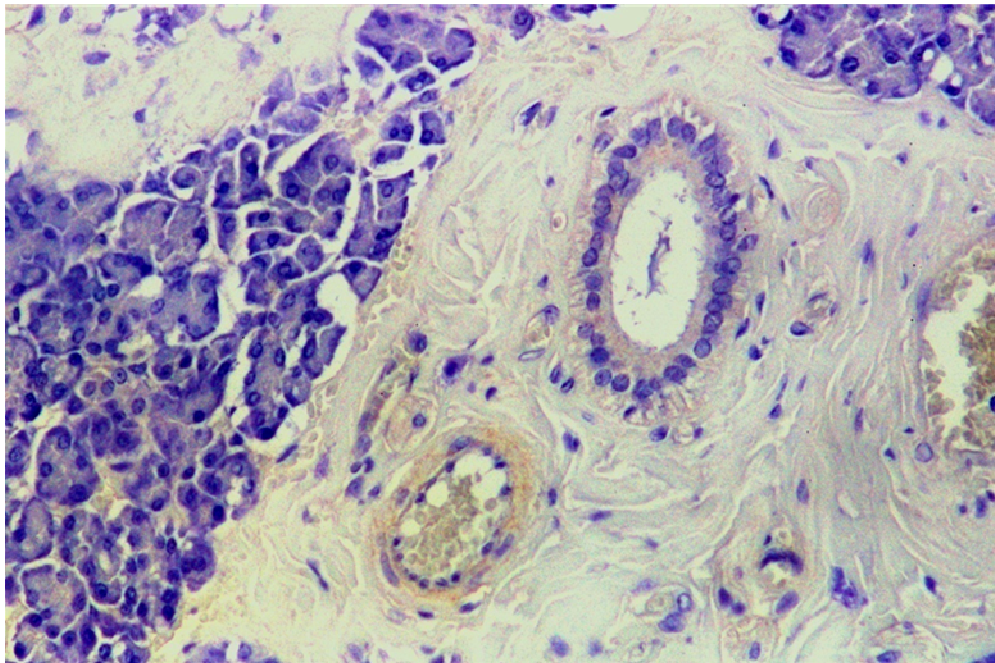


Fig. 49 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (Imunomarcção para colagénio IV $\times 200$). Marcação para colagénio IV nos vasos e colectores do TCPVD.

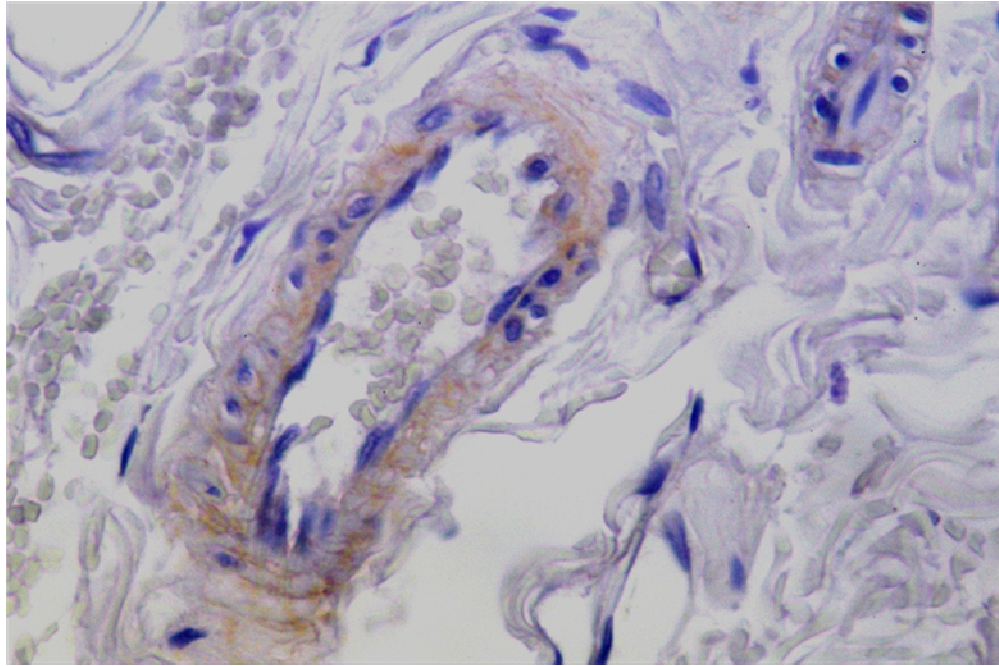


Fig. 50 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (Imunomarcção para colagénio IV ×400). Marcação para colagénio IV num vaso peri-lobular.

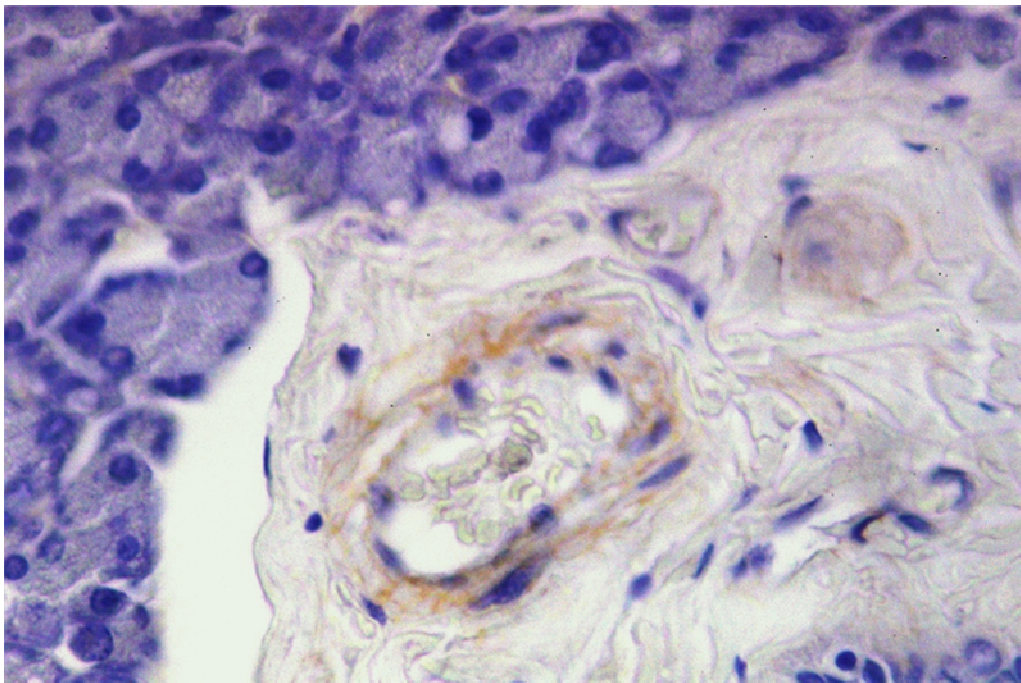


Fig. 51 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (Imunomarcção para colagénio IV ×400). Discreta marcação para colagénio IV num vaso do TCPVD.

Morfologia – Microscopia Electrónica de Transmissão

De uma forma geral, as alterações citopatológicas encontradas nas células secretoras sugerem sofrimento celular, podendo, algumas das células, estar a entrar em apoptose (Fig. 60 e 61). Nos vários grupos observa-se: vacuolização – há um incremento progressivo do número de grandes vesículas citoplasmáticas delimitadas por membrana. Nos tempos mais precoces parece que a vacuolização deriva de dilatação focal e desorganização do retículo endoplásmico; autofagia – iniciada pela delimitação de área de citoplasma por membranas concêntricas que levam depois à digestão destas regiões do citoplasma, à sua fusão com vesículas lisosomáticas, seguida de digestão e formação de corpos residuais escuros, cheios de pigmento, por vezes com lipofuscina, e com cristalóides (Fig. 68 e 71). Também se encontram inclusões paracristalinas no citoplasma (Fig. 65); observa-se uma acumulação de gotas lipídicas citoplasmáticas, de grau variável, que são raras nos grupos de controlo, e que sugerem esteatose (Fig. 64 e 69). Há um aumento da heterogeneidade dos grânulos de zimogénio.

gC - controlo

Não apresenta alterações de carácter citopatológico (Fig. 52 e 54). As células secretoras com a típica forma triangular (Fig. 53). Citoplasma de aspecto uniforme e núcleo em posição basal e secreção com direcção apical (Fig. 55, 56 e 57).

g1 – 1 semana RBF

Observa-se vacuolização do citoplasma das células glandulares.

g2 – 3 semanas RBF

Vacuolização e presença de inclusões lipídicas no citoplasma das células. Em relação ao grupo anterior, os vacúolos são maiores e menos numerosos, ocupando menos espaço citoplasmático.

g3 – 5 semanas RBF

Observa-se alteração do conteúdo dos grânulos de zimogénio das células glandulares, visto que esses grânulos aparecem, frequentemente, com conteúdo de electrodensidade heterogénea. As gotículas lipídicas parecem ser menos frequentes do que no g2. Aumento de vesículas lisosomais intracelulares, assim como algumas células apresentando dilatação das cisternas do retículo endoplasmático.

g4 – 9 semanas RBF

Alguns corpos residuais de natureza lipídica e heterogeneidade dos grânulos de zimogénio. Algumas células parecem estar em sofrimento celular (Fig. 58 e 59), expresso por dilatação das cisternas de retículo endoplasmático e acumulação de corpos residuais.

g5 – 13 semanas RBF

Presença, no citoplasma, de vacúolos de grandes dimensões (Fig. 63, 65, 69). Observa-se um número elevado de gotas lipídicas e corpos residuais, com dilatação do retículo (Fig. 62) e formação de vesículas autofágicas (Fig. 68). Algumas células possuem inclusões paracristalinas no citoplasma e imagens em bastão que parecem ser inclusões de lipofuscina (corpos residuais de lisosomas terciários) (Fig. 62, 66, 67, 70 e 72); existem também inclusões de lipofuscina sem arranjo paracristalino (Fig. 65) e partes do citoplasma com numerosas mitocôndrias, sugerindo transformação oncócica (Fig. 71). Ao nível do núcleo observam-se alterações do contorno nuclear e aumento da heterocromatina (Fig. 63). Observam-se algumas células com alterações que sugerem entrada em apoptose (Fig. 60 e 61).

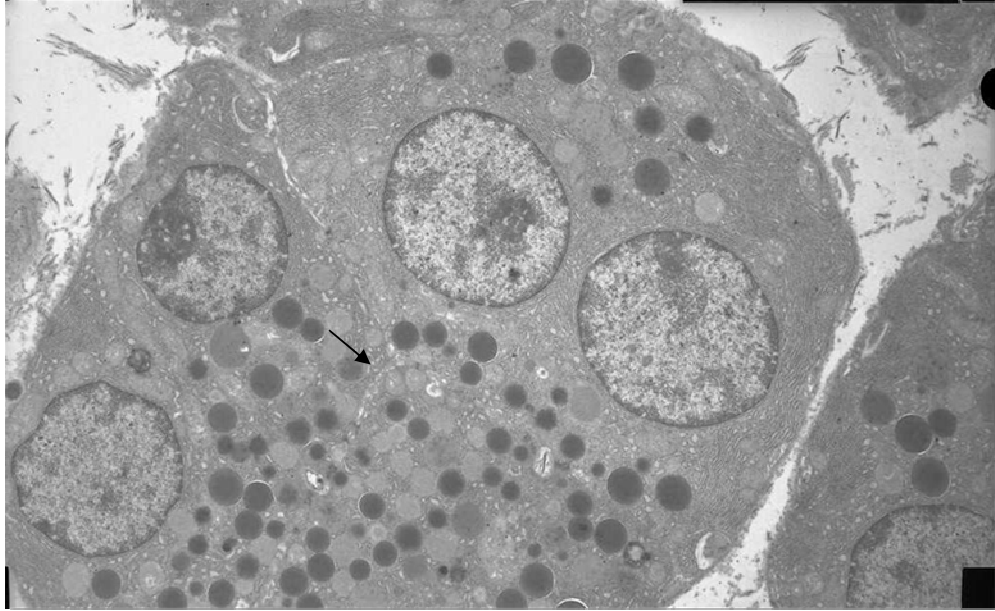


Fig. 52 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo de controlo (TEM $\times 2800$). Observam-se 4 núcleos correspondendo a 4 células de um ácino com o lume em posição central e secreção em sentido apical (\uparrow).

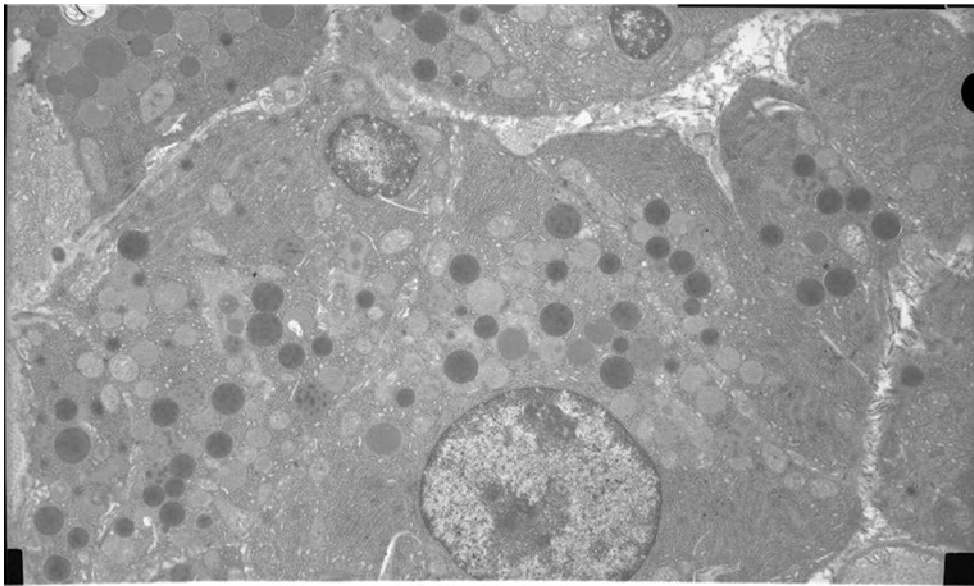


Fig. 53 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo de controlo (TEM $\times 2800$). Aspecto de uma célula secretora, com a típica forma triangular, núcleo em posição basal e secreção com direcção apical.

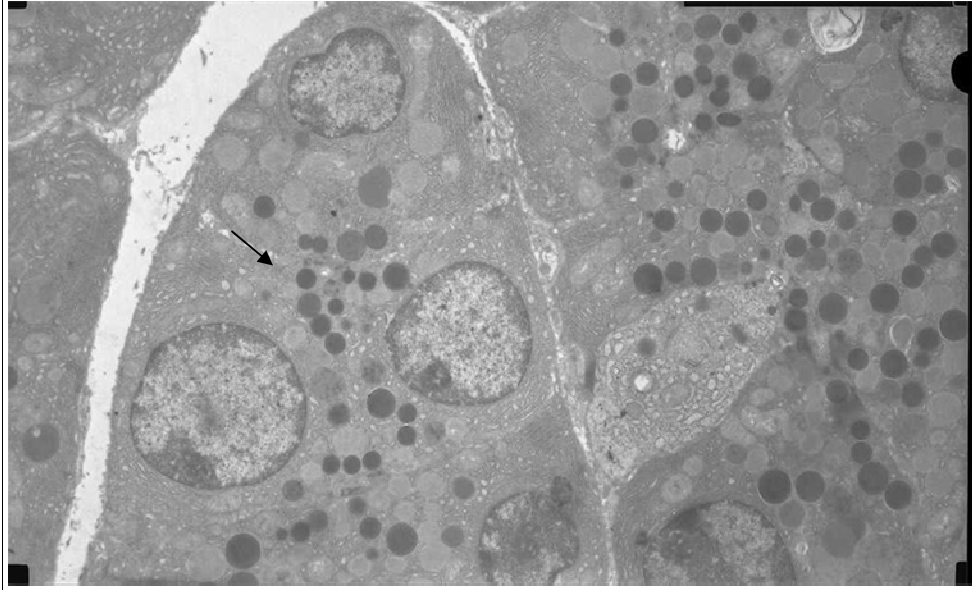


Fig. 54 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo de controlo (TEM $\times 2800$). Parte de um ácino com a secreção concentrada a nível do lume (↑).

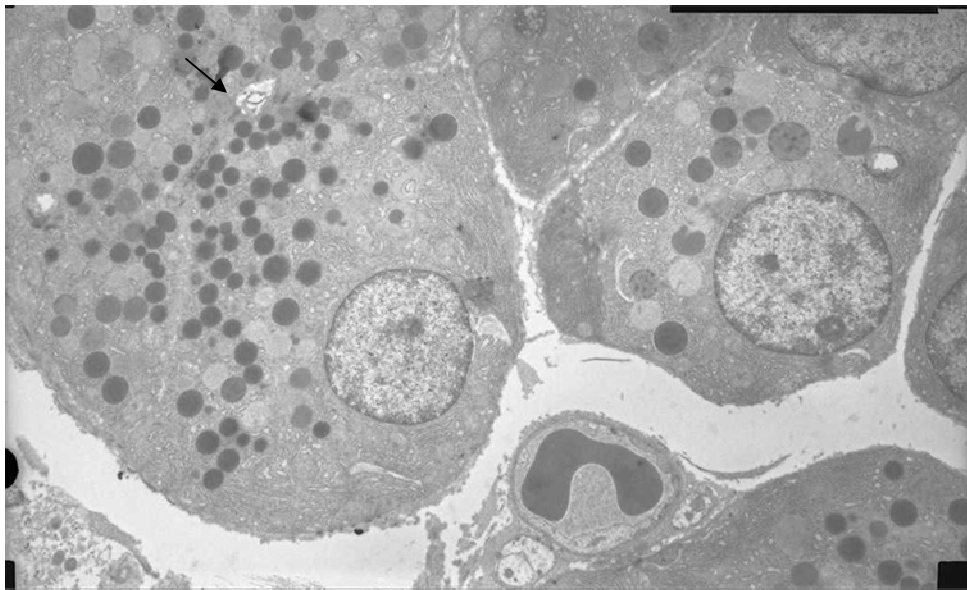


Fig. 55 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo de controlo (TEM $\times 2800$). Ácino com secreção de direcção apical (↑).

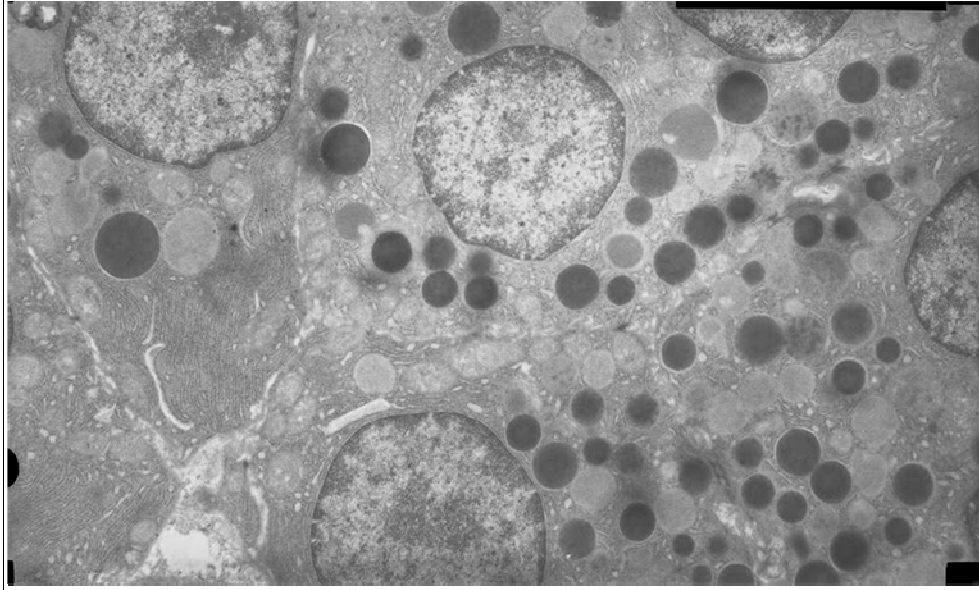


Fig. 56 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo de controlo (TEM $\times 4000$). Observam-se abundantes vesículas contendo secreção.

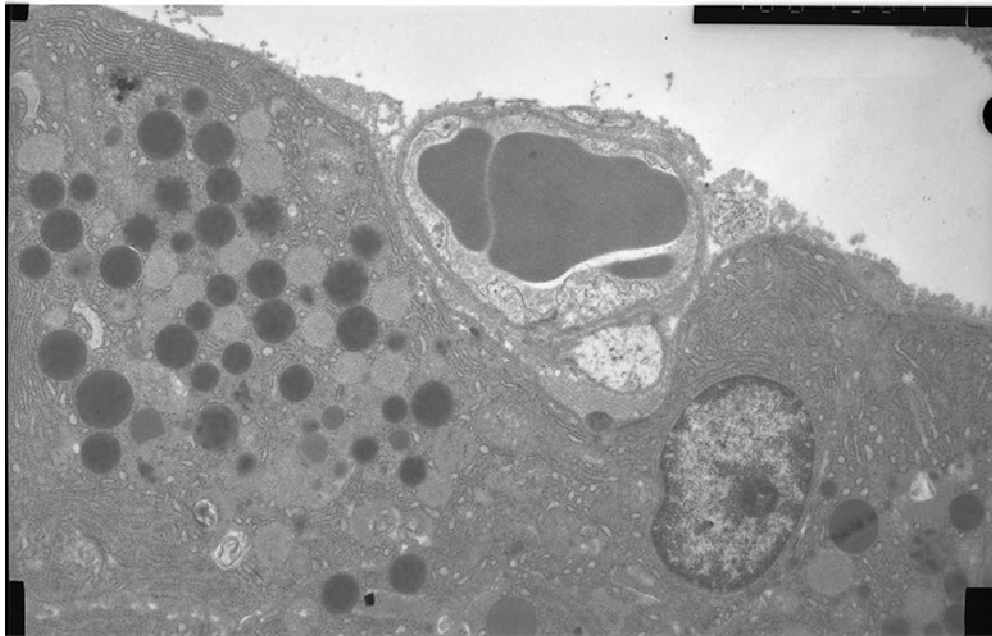


Fig. 57 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo de controlo (TEM $\times 4000$). Aspecto de normalidade do citoplasma das células.

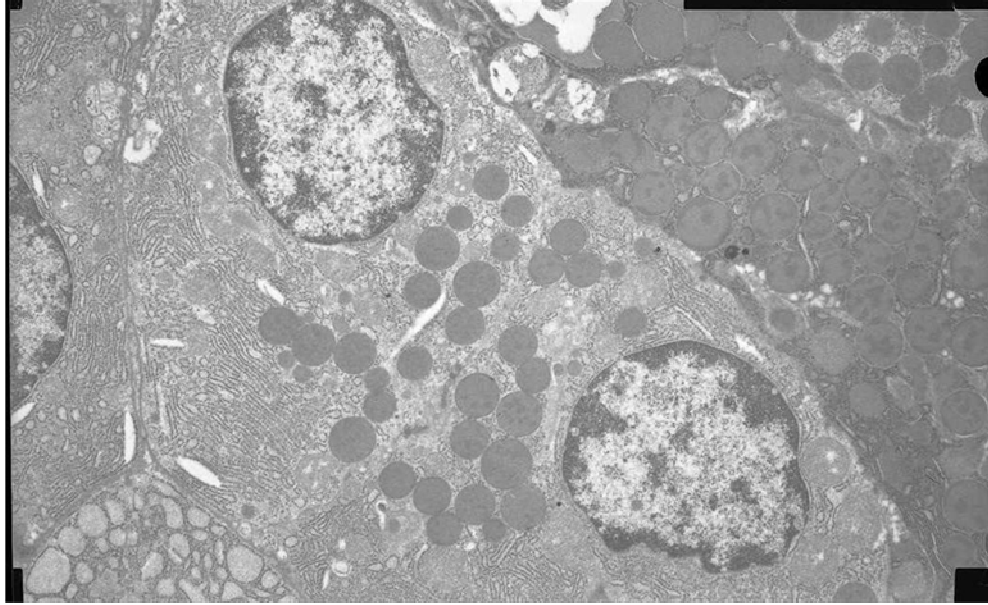


Fig. 58 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g4 (TEM $\times 4000$). Vacuolização do citoplasma, dilatação das cisternas de retículo endoplásmico e alteração do contorno do núcleo.

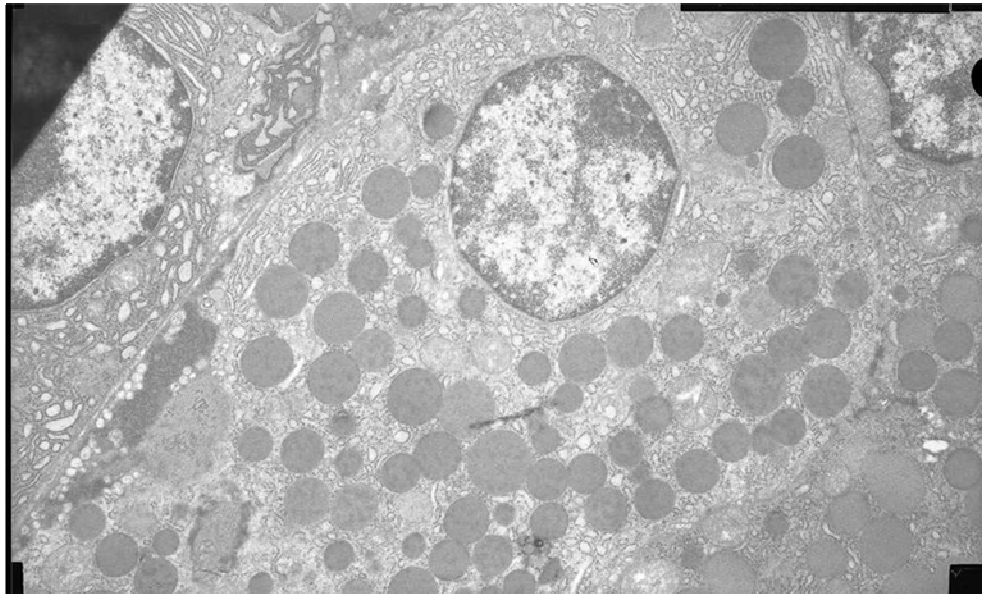


Fig. 59 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g4 (TEM $\times 4000$). Observa-se alguma vacuolização do citoplasma.

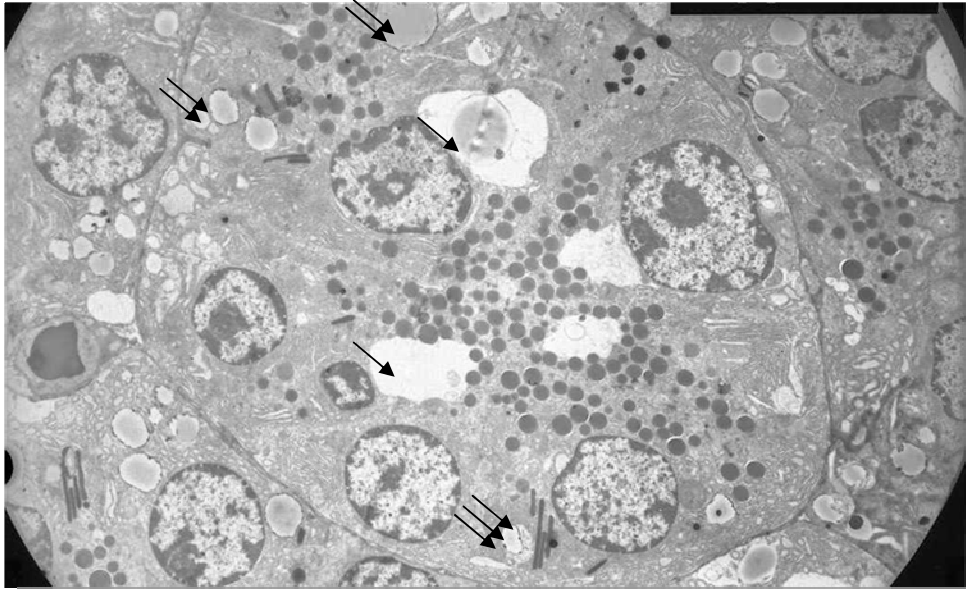


Fig. 60 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (TEM ×2000). Podemos observar um ácino perfeitamente delimitado, em que as células apresentam um aspecto heterogêneo e desorganizado. Presença de grandes vacúolos intracelulares (↑) e inclusões lipídicas no citoplasma (↑↑). O material nuclear possui uma distribuição heterogênea nas várias células. Observam-se inclusões paracristalinas no citoplasma (lipofuscina ↑↑↑).

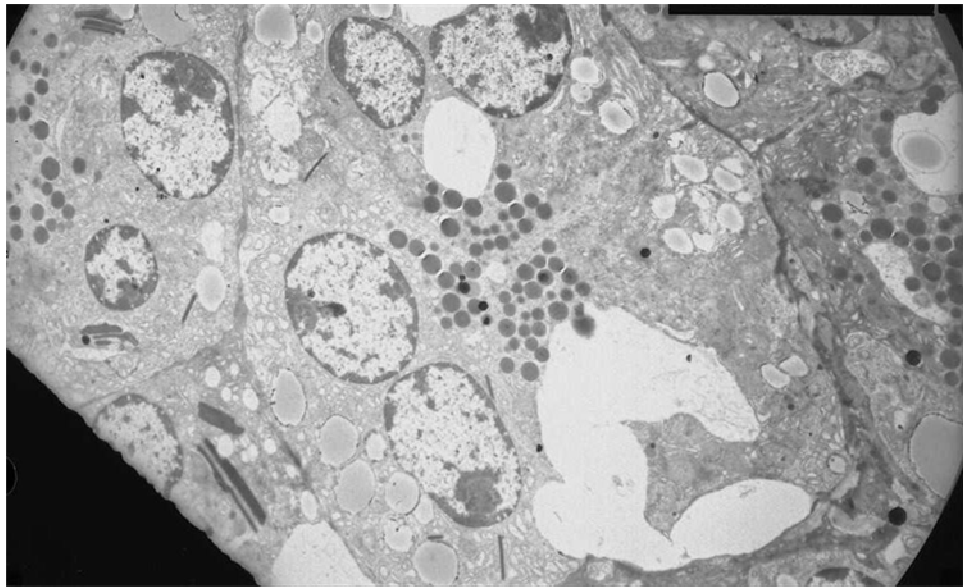


Fig. 61 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (TEM ×2000). Observa-se na porção central da imagem um ácino que parece em parte destruído, substituído por um grande vacúolo (imagem de necrose celular).

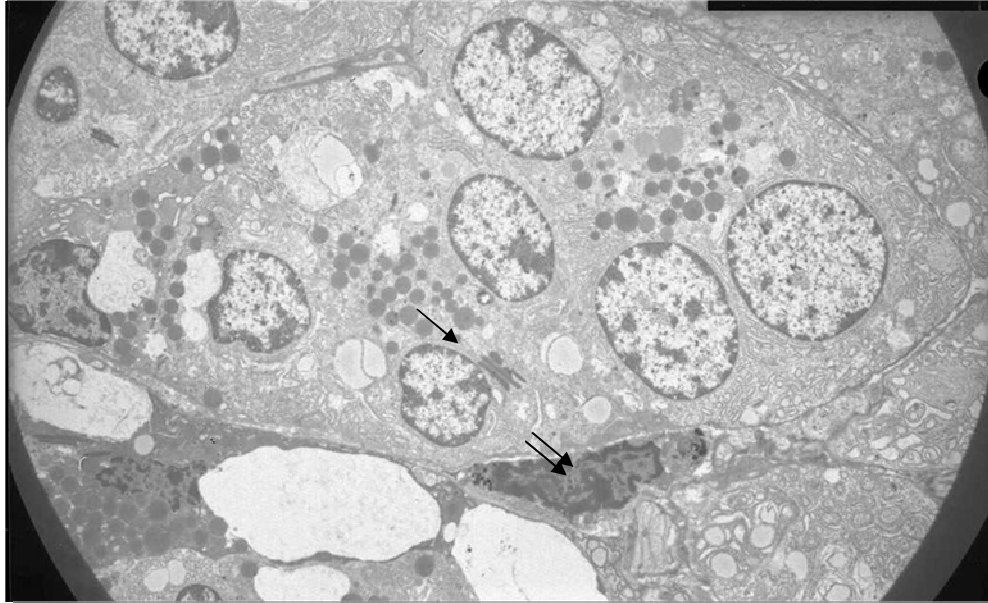


Fig. 62 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (TEM $\times 2000$). Vacuolização intracelular. Presença de inclusões lipídicas e de inclusões paracristalinas no citoplasma (lipofuscina) (\uparrow). Observa-se um célula mioepitelial ($\uparrow\uparrow$).

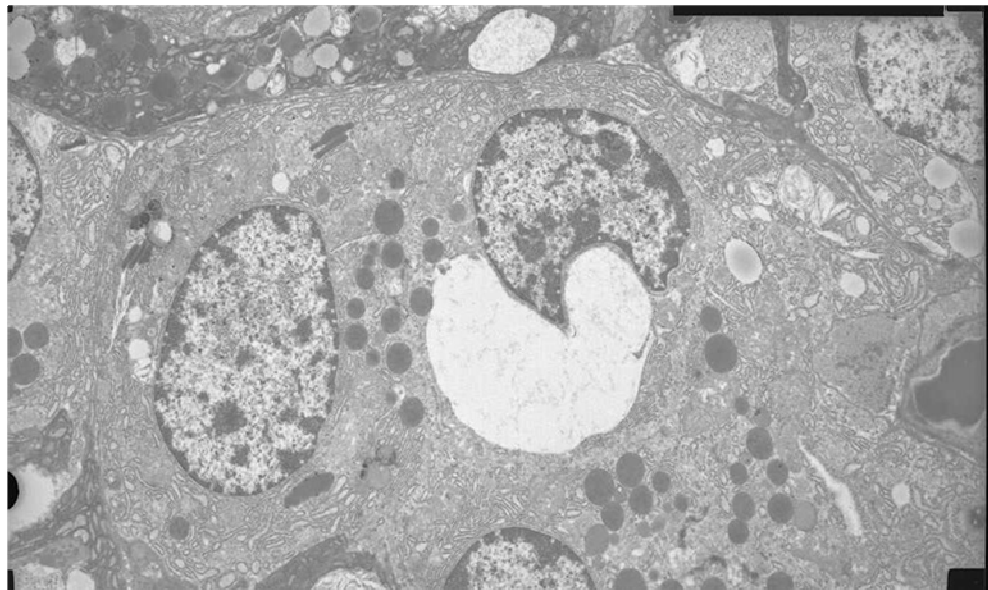


Fig. 63 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (TEM $\times 2800$). Observa-se um grande vacúolo citoplasmático que parece causar empurramento do núcleo.

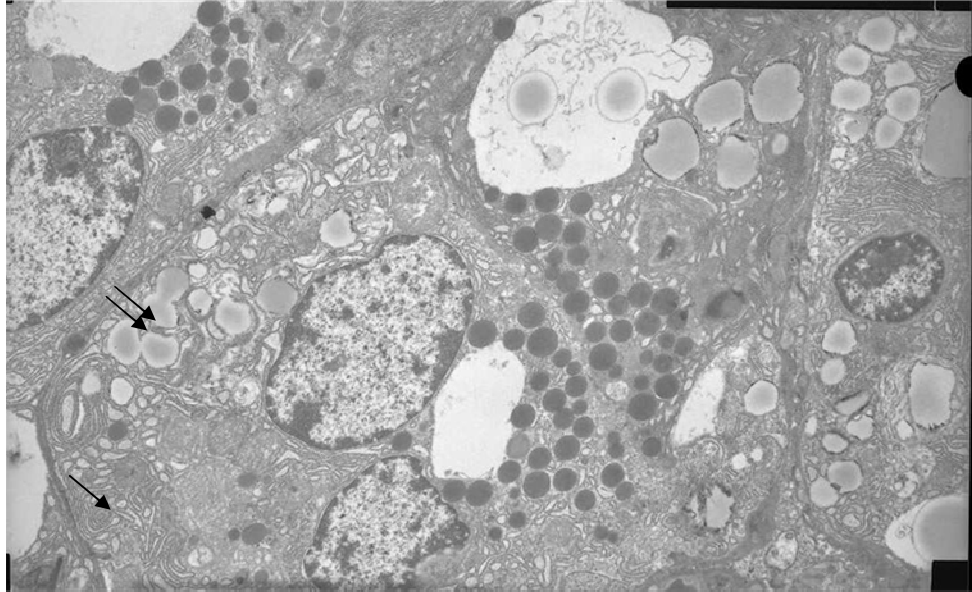


Fig. 64 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (TEM ×2800). Dilatação do retículo (↑) e abundância de inclusões lipídicas no citoplasma (↑↑).

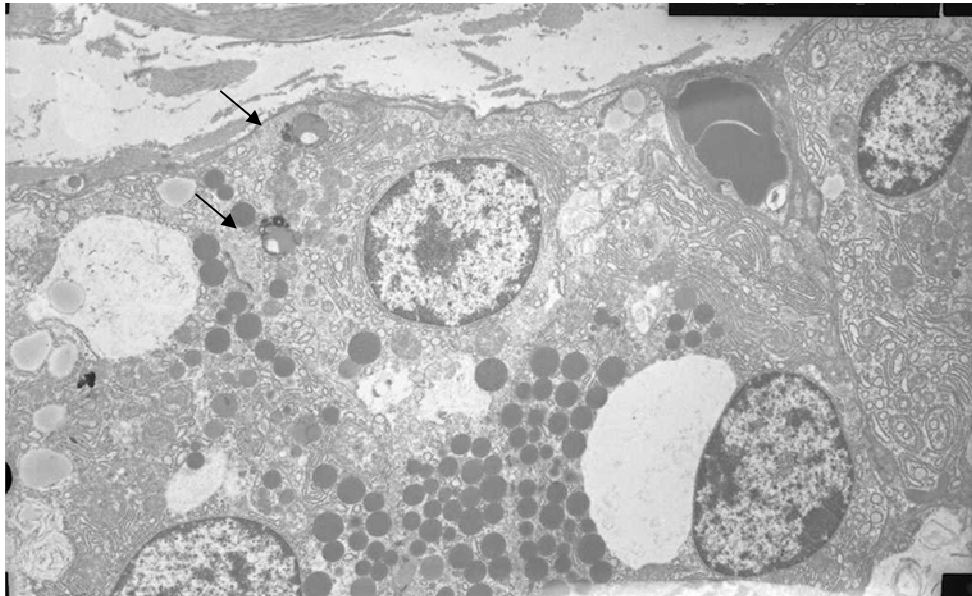


Fig. 65 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (TEM ×2800). Presença de grandes vacúolos intracelulares e inclusões de lipofuscina sem arranjo paracristalino (↑). Abundância de colagênio, visível na parte superior da imagem.

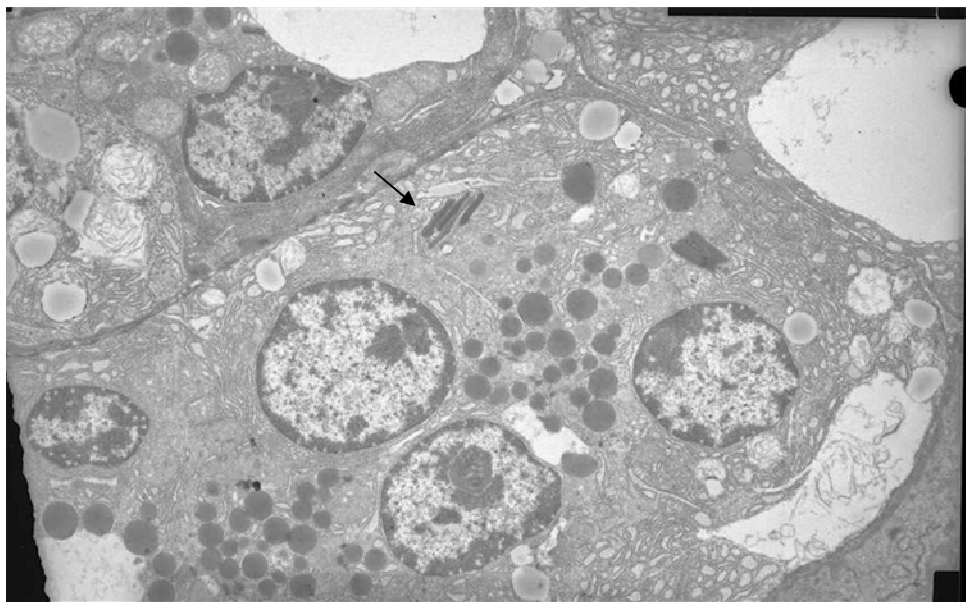


Fig. 66 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (TEM ×2800). Observa-se desorganização do citoplasma das células, vacúolos intracelulares e presença de inclusões paracristalinas (lipofuscina) (↑).

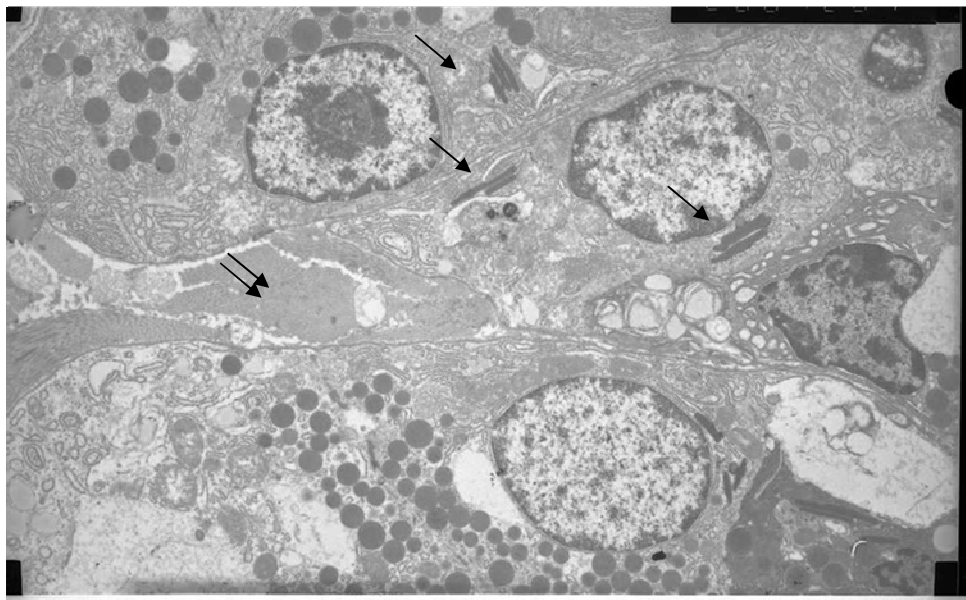


Fig. 67 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (TEM ×2800). Desorganização do citoplasma das células, heterogeneidade do material nuclear e presença de inclusões paracristalinas (lipofuscina) (↑). Observa-se colagênio entre as células (↑↑).

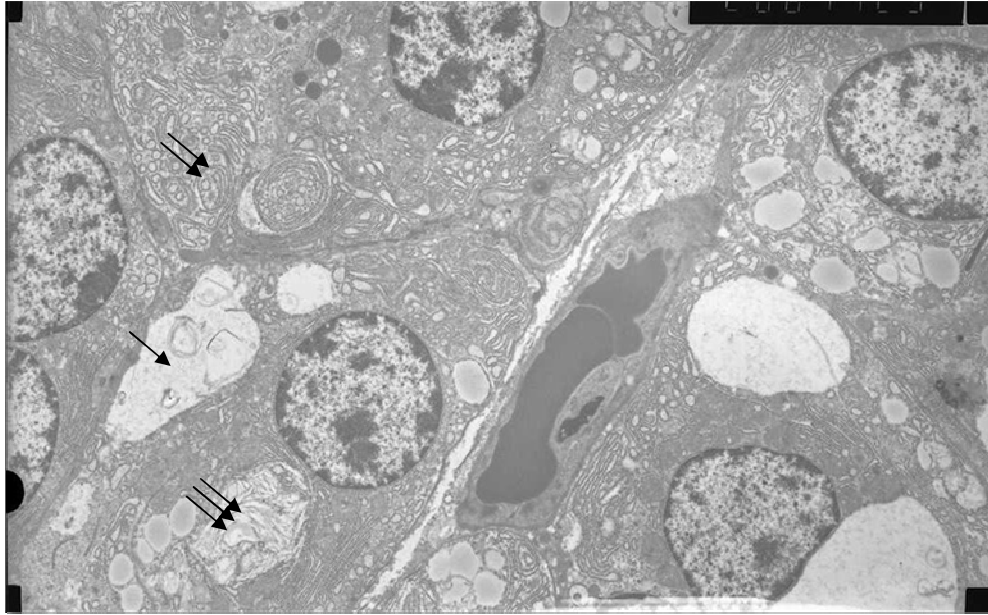


Fig. 68 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (TEM ×2800). Observam-se corpos residuais (↑), dilatação do retículo (↑↑) e formação de vesículas autofágicas (↑↑↑).

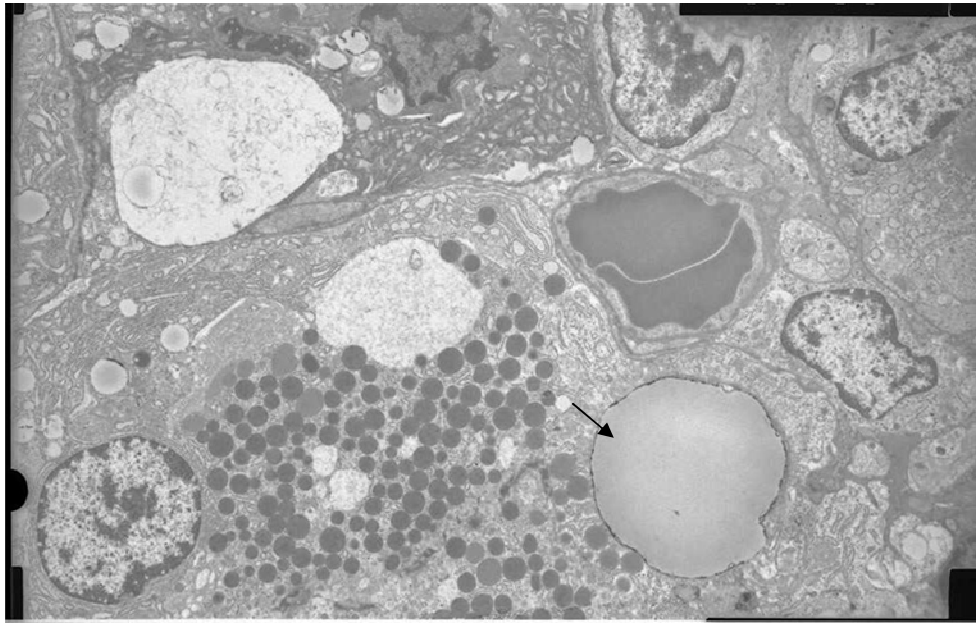


Fig. 69 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (TEM ×2800). Observa-se presença de vacúolos nas células e grande inclusão lipídica (↑).

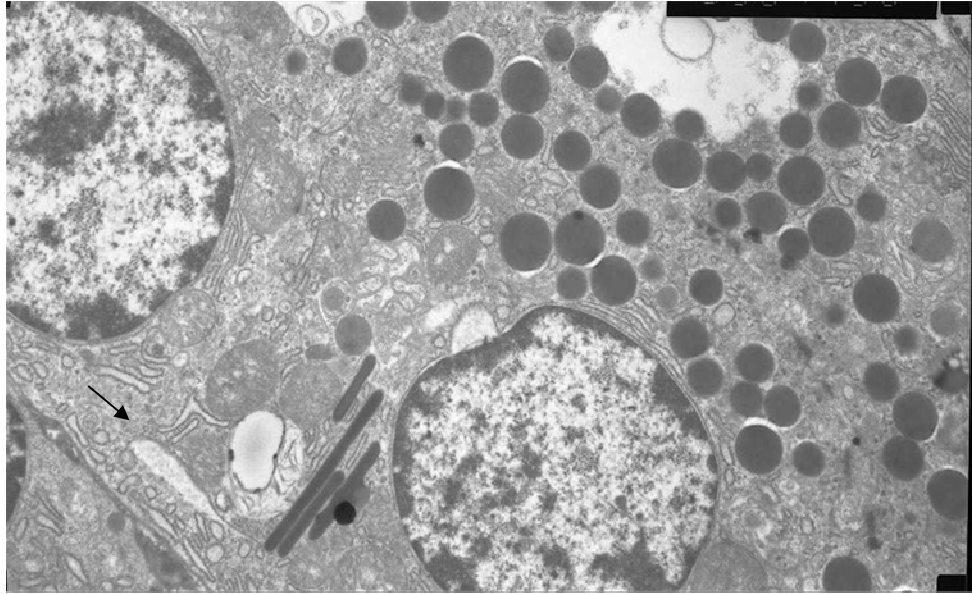


Fig. 70 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (TEM $\times 5300$). Observa-se dilatação do retículo (\uparrow) e presença de inclusões de lipofuscina.

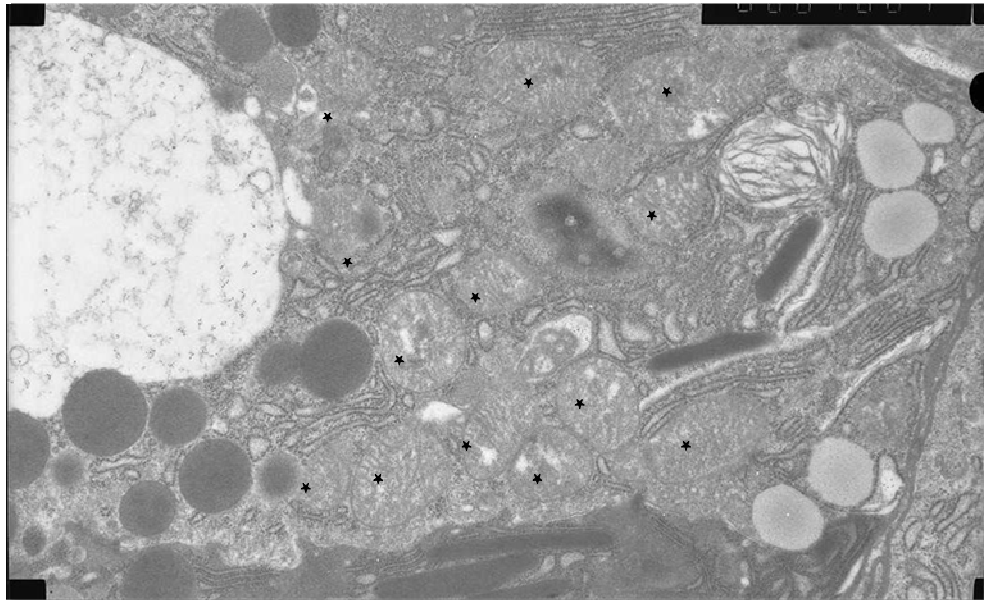


Fig. 71 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (TEM $\times 8000$). Observam-se numerosas mitocôndrias no citoplasma (*), que sugerem transformação oncótica.

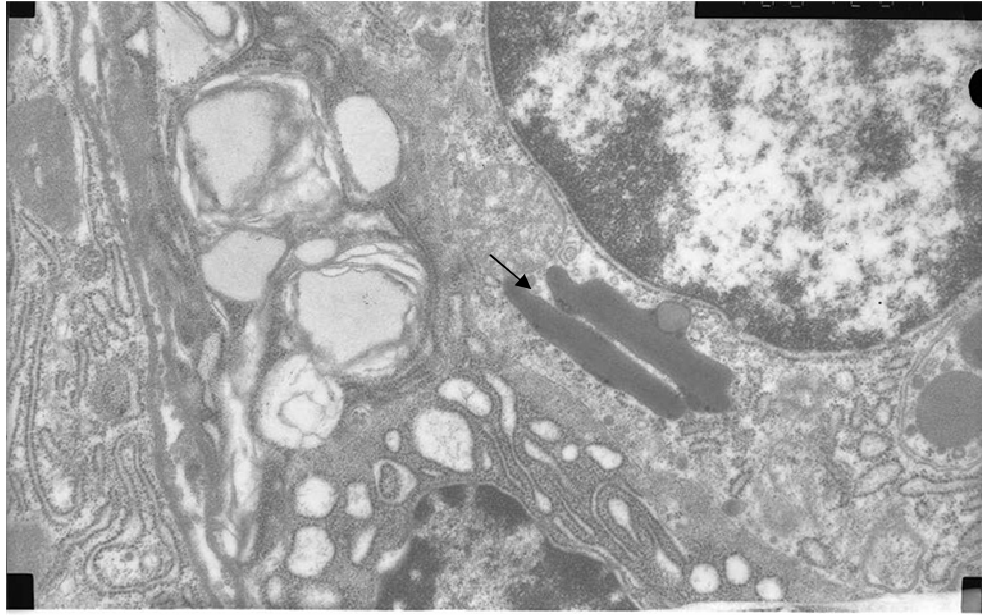


Fig. 72 – Glândula parótida de rato Wistar do grupo g5 (TEM $\times 10000$). Pormenor de inclusões de lipofuscina (corpos residuais de lisosomas terciários) (↑).

Morfologia – Estudo Vascular Macroscópico

gC - controlo

Não se observaram alterações no preenchimento vascular pelo micropaque no grupo de controlo (Fig. 73)

g5 – 13 semanas RBF

Observámos alterações de tipo obstrutivo (Fig. 75, 76 e 77) que poderão corresponder à tradução macroscópica das claras lesões microscópicas que encontrámos. Encontrámos ainda imagens de vasos sanguíneos que pensamos poderem ter-se reaberto em consequência da diminuição do fluxo (Fig. 74), com obstrução a montante.

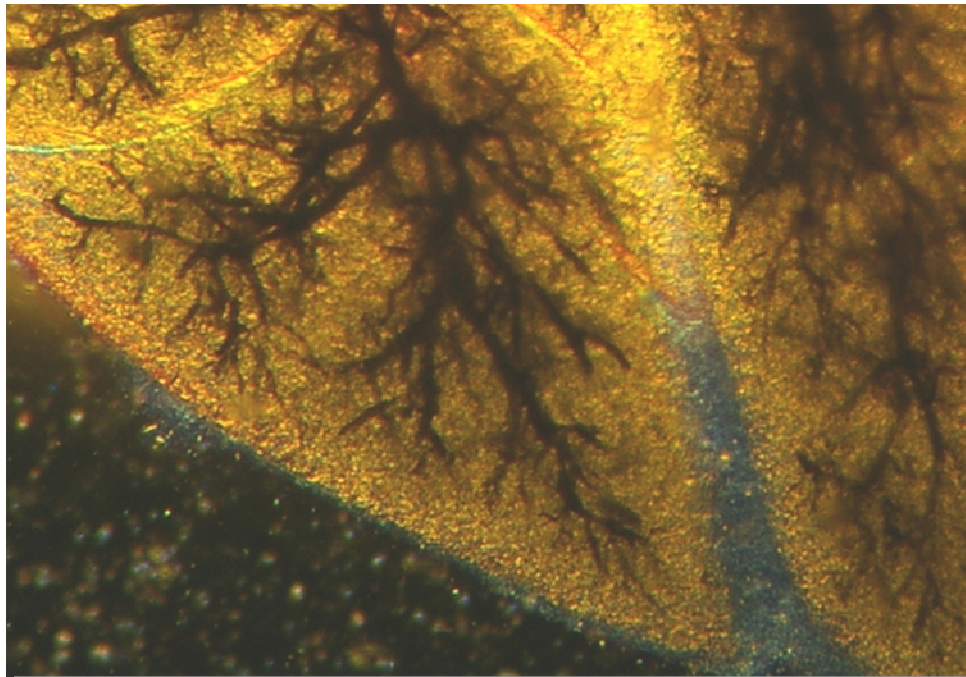


Fig. 73 – Glândula parótida, diafanizada, de rato Wistar do grupo de controlo (injecção vascular com micropaque $\times 25$). Imagem de preenchimento vascular de um lobo da glândula

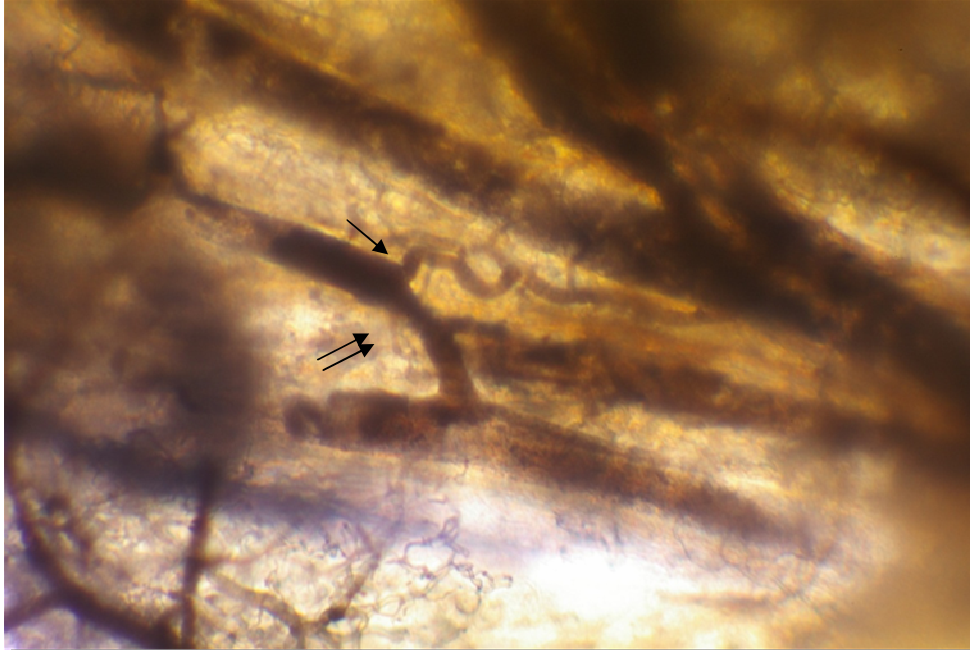


Fig. 74 – Glândula parótida, diafanizada, de rato Wistar do grupo g5 (injecção vascular com micropaque x40). Vaso tortuoso (↑) e imagem de subtração num vaso (↑↑).

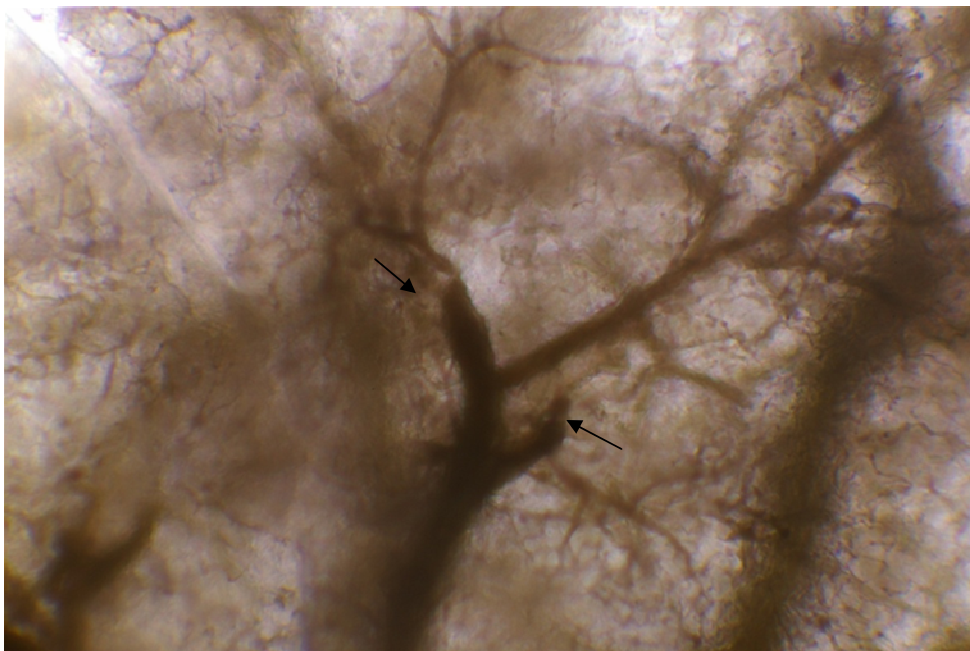


Fig. 75 – Glândula parótida, diafanizada, de rato Wistar do grupo g5 (injecção vascular com micropaque x40). Observa-se imagem de lesão obstrutiva (↑).

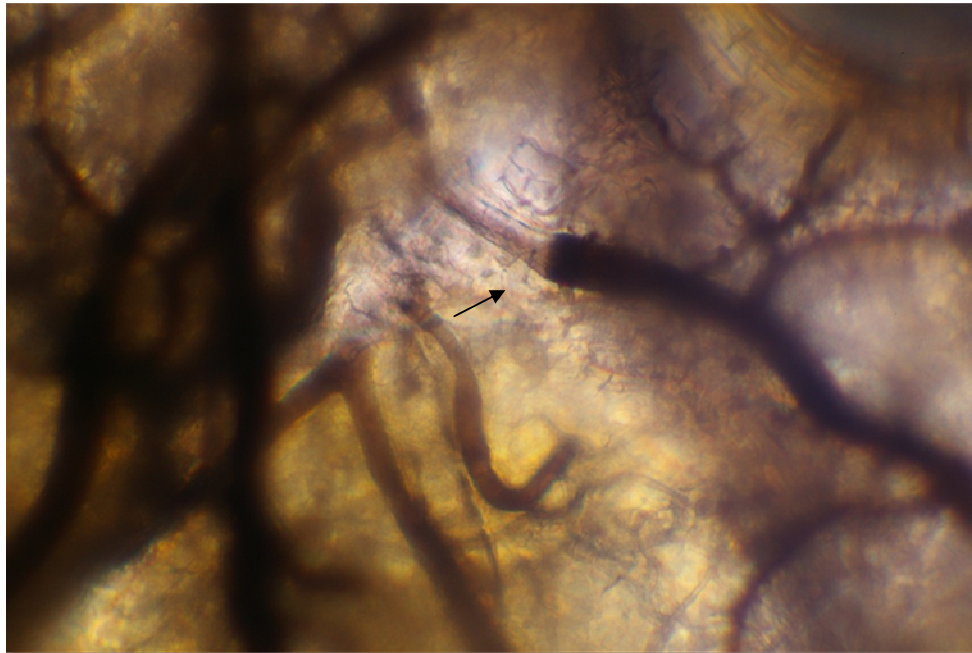


Fig. 76 – Glândula parótida, diafanizada, de rato Wistar do grupo g5 (injeção vascular com micropaque $\times 40$). Observa-se uma ausência de preenchimento com contraste (↑).

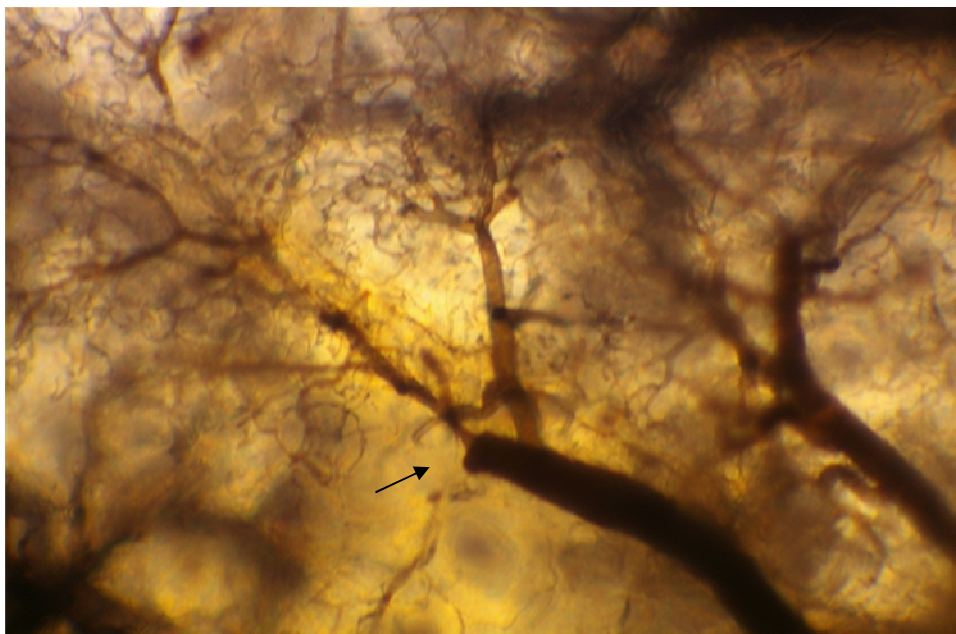


Fig. 77 – Glândula parótida, diafanizada, de rato Wistar do grupo g5 (injeção vascular com micropaque $\times 40$). Observa-se uma imagem de lesão obstrutiva (↑).

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

As referências encontradas na literatura relacionadas com as glândulas salivares, ou com a saliva, em indivíduos expostos a RBF, são de carácter funcional, não sendo do nosso conhecimento a realização de estudos sobre a morfologia da glândula parótida exposta a RBF. As descrições encontradas correspondem, por um lado, à utilização da saliva como veículo para determinar a concentração de cortisol livre para avaliação do stress ou para avaliar a susceptibilidade individual às baixas frequências de alta intensidade (*Persson-Waye et al., 2002; Ising et al., 2004*) e, por outro, encontrámos a descrição de uma sensação inespecífica de boca seca (*Castelo Branco, 1999c*), também de carácter funcional. Se o primeiro estudo avalia a composição da saliva, a segunda referência corresponderia à expressão da diminuição da saliva total excretada.

No nosso estudo, pudémos comprovar histologicamente, nos animais expostos ao RBF, um processo destrutivo do parênquima glandular acompanhado de fibrose que aumenta linearmente com o tempo de exposição. As alterações encontradas têm uma repercussão funcional clara, com diminuição qualitativa e quantitativa da saliva excretada (*Oliveira et al., 2007*).

Existem muitas condições patológicas que provocam alterações na morfologia da glândula parótida com repercussões na saliva total. Contudo, um diagnóstico de hipofunção ou hipoparotidismo baseado apenas num sintoma, sensação de boca seca, seria incorrecto, pois cerca de 30% da população refere algum grau de secura de boca (*Humphrey et al., 2001*). O registo individual do fluxo salivar basal (sialometria quantitativa), o estudo imagiológico por ressonância magnética (RM) ou o estudo histológico pós-biopsia, são por vezes necessários para um diagnóstico correcto e para a determinação etiológica das causas de hipofunção das glândulas salivares (*Llena-Puy, 2006*). Assim, e porque é uma ocorrência relativamente comum na generalidade da população, dificilmente poderemos vir a utilizar o sintoma de boca seca, isoladamente, como sinalizador de uma acção do RBF sobre a glândula parótida.

O estudo histológico apresenta-se, então, como uma boa alternativa para avaliarmos as alterações identificadas na glândula parótida na sequência da exposição ao RBF. Já a avaliação funcional da glândula, através do seu produto de secreção, a saliva, apesar de

não ser o âmbito deste texto, demonstrou que a secreção basal de amilase, em animais expostos ao RBF, está significativamente diminuída comparativamente com os ratos de controlo, sugerindo que o RBF induz modificações funcionais na glândula parótida (Oliveira et al., 2007). Llana-Puy (2006) refere, numa revisão sobre o papel da saliva, que esta pode servir como meio auxiliar de diagnóstico, como meio de monitorizar a evolução de certas doenças, ou ainda para verificar dosagens de fármacos. No caso concreto dos efeitos do RBF poder-se-ão levantar problemas práticos para a aplicação de avaliações funcionais. Em patologias que têm como consequência histológica *major* uma destruição do parênquima, como se verifica nos nossos resultados, ou como acontece na síndrome de Sjögren (Tishler et al., 1999), o estudo da saliva poderá ser aceite, mas como auxiliar no diagnóstico. Na síndrome de Sjögren, por exemplo, há um aumento das concentrações salivares de mediadores da inflamação e autoanticorpos, conjuntamente com a diminuição do fluxo salivar (Tishler et al., 1999), devendo estes sinais ser considerados. No entanto, o estudo histológico continua a ser encarado como o meio de diagnóstico *par excellence*, quando este é feito através das glândulas salivares (Kassan et al., 2004).

À luz dos nossos resultados, a destruição observada na glândula parótida ocorre por três vias que procuraremos analisar: i) a lesão do parênquima glandular e das células secretoras; ii) a proliferação desordenada do tecido conjuntivo; iii) o compromisso vascular.

i) No que diz respeito às lesões observadas no parênquima, a que mais precocemente se observa, e talvez a mais óbvia numa fase inicial, é a degenerescência vacuolar. A vacuolização do parênquima é referida frequentemente na literatura, e por norma tida como um sinal de atrofia glandular (Hall et al., 1964; Sreebny et al., 1971; Hand et al., 1981), sendo observada nos regimes de dieta líquida (Coelho Leal et al., 2003), na degenerescência etanólica (Maier et al., 1990; Banderas et al., 1992; Carda et al., 2004), na irradiação com Rx (Coppes et al., 2001; Gazda et al., 1992) ou até no envelhecimento normal (Faustino et al., 2003).

Em animais mantidos em regime de dieta líquida está descrita vacuolização intensa do parênquima, sugerindo que alimentos que não requerem esforço mastigatório considerável, podem reduzir o fluxo e alterar a composição salivar através de um reflexo local (Coelho Leal et al., 2003). Há também referências à relação entre stress emocional e aumento da quantidade de líquidos na dieta de ratos de laboratório (Suckow et al., 2006). Existem muitos factores que podem causar stress em animais de laboratório: do

acasalamento à idade e até ao simples facto de estarem num espaço restrito (*Barrett et al., 1963*). Sendo também conhecida a relação entre ruído de alta intensidade e stress (*Pawłaczyk-Luszczynska et al., 2003*), não podemos deixar de equacionar a possibilidade de que o RBF possa causar aumento da ingestão de líquidos na dieta, por stress, ainda que nenhum estudo, por nós conhecido, tenha associado o stress emocional a um dos outros resultados no nosso estudo: a existência fibrose na ausência de sinais inflamatórios. Ainda assim, e apesar de não esperarmos que os mecanismos neuro-endócrinos sejam, por si só, responsáveis pelo aparecimento das lesões encontradas, pensamos à luz do que se conhece da relação RBF - stress, que estes podem ter um papel não negligenciável na génese de algumas das alterações encontradas, por exemplo, na vacuolização. Esse efeito será, no entanto, limitado pois lesões semelhantes foram identificadas por Grande *et al.* (1999) e por Castelo Branco *et al.* (2003a), no parênquima pulmonar e no epitélio respiratório, respectivamente, não tendo essas alterações sido relacionadas, de nenhum modo, com acções neuro-endócrinas, pelos respectivos autores, antes foram atribuídas à acção directa do RBF sobre essas estruturas. Também Nakamura *et al.* (1992) puderam verificar que o bloqueio farmacológico dos mediadores neuro-endócrinos do stress, em ratos sujeitos a imersões forçadas, não eliminava o aparecimento de úlceras em estômagos de ratos expostos a vibração.

Vários estudos distinguem claramente o stress por exposição a um estímulo agudo ou crónico em animais de laboratório. Se no caso de um estímulo aplicado de modo agudo dá lugar a inúmeras alterações fisiológicas, com uma dramática alteração do eixo hipotálamo-hipófise-suprarenal (*Jones et al., 1988*), no caso da exposição crónica e contínua, o agente de stress evoca, com o tempo uma resposta neuro-hormonal cada vez mais discreta (*Pitman et al., 1988*). A exposição contínua ao agente de stress, em animais de laboratório, pode conduzir a fenómenos de adaptação e habituação (*Jones et al., 1988; Pitman et al., 1988*). Kant *et al.* (1987) referem que animais expostos, de modo contínuo, a choques eléctricos nos pés mantêm os comportamentos de fuga, de alimentação, aumentam de peso e acasalam. O nosso protocolo experimental expôs os animais a RBF de modo contínuo. Pomos assim a hipótese que o RBF possa ter tido uma acção como agente de stress mas limitada a um período inicial. Kui-Cheng *et al.* (2007) estudaram a resposta da função imune e do status oxidativo induzido por stress sonoro em ratos, de modo agudo e crónico. Os autores puderam comprovar alterações linfoproliferativas nos animais expostos de modo agudo e diminuição das células esplénicas CD4+ e da IgG sérica, nos animais expostos ao ruído de modo crónico. Estes

estudos contrastam com os de Castro *et al.* (1999) e de Águas *et al.* (1999a) em que se verifica um aumento dos linfócitos CD8+ e CD4+ e aceleração da expressão de doenças autoimunes em indivíduos e animais expostos cronicamente ao RBF. Estes resultados, conjuntamente com os nossos, permitem-nos atribuir responsabilidade ao RBF pelo aparecimento de lesões nos corpos biológicos, e não só ao stress ou outros mecanismos neuro-endócrinos, quando estes estão expostos de modo crónico. A acrescentar a estes dados, e partindo do princípio que o stress poderá contribuir para a vacuolização do parênquima - e apesar de derivar de uma observação subjectiva, portanto de não estar quantificado - constatámos o facto de nos nossos resultados termos registado um aparente aumento da quantidade de vacúolos, no parênquima glandular, com o tempo de exposição ao RBF, o que não seria de esperar se o único agente nocivo fosse o stress.

Nos regimes de dieta líquida, à semelhança do nosso estudo, a coloração para PAS, é negativa (Coelho Leal *et al.*, 2003), demonstrando que os vacúolos não continham glicoproteínas e que esse mesmo conteúdo, provavelmente água ou lípidos, desapareceria com o processamento. Hand *et al.* (1981) referiram como habitual em glândulas atróficas a presença de lípidos nas células acinares. Apesar de não termos efectuado colorações específicas para a detecção de lípidos, e não termos podido verificar se esse seria o conteúdo os vacúolos encontrados no parênquima a nível da microscopia óptica, pudémos identificar ultraestruturalmente a presença de inclusões lipídicas no citoplasma das células secretoras.

Esta e outras alterações ultraestruturais são semelhantes às que ocorrem na degenerescência etanólica. A presença de corpos lisossómicos heterogéneos, de núcleos de contorno irregular e com vários graus de cromasia, ou a presença de inclusões lipídicas em regiões distintas do citoplasma, não visíveis no grupo de controlo, sugerem de algum modo um processo de carácter degenerativo, à semelhança do que acontece na sialose parotídea alcoólica (Banderas *et al.*, 1992; Carda *et al.*, 2004), ainda que na parótida do doente cirrótico se observe, a nível histológico, uma boa organização e conservação da estrutura glandular (Carda *et al.*, 2004), o que não acontece nas nossas observações. A justificação para esta diferença poderá advir do facto de no caso da degenerescência etanólica, estarmos perante um estímulo fundamentalmente químico, e na exposição ao RBF estamos um estímulo de carácter físico o responsável pelas lesões encontradas. Por outro lado, não podemos deixar de considerar, para justificar algumas semelhanças nos dois processos, a possível acção sistémica dos mesmos, por exemplo,

relacionada com as funções endócrina e nervosa ou, no limite, a tradução bioquímica que os agentes físicos terão, sob ponto de vista ultraestrutural, nas células.

Outra situação onde é frequente ocorrer degenerescência gorda, e há muito conhecida, está associada à senescência glandular (*Andrew, 1949*). Ultraestruturalmente, foram descritas no citoplasma das células acinares de ratos idosos, inclusões lipídicas e estruturas contendo lípidos, os grânulos de lipofuscina. As primeiras são encontradas, por vezes, sob a forma de grandes gotas lipídicas, que ocupam grande parte do citoplasma, em ratos considerados idosos, com 36 meses (*Kim, 1984; Faustino et al., 2003*), ocorrendo também nas glândula parótidas de animais expostos a RBF. Os grânulos de lipofuscina são estruturas com membrana, consistindo de lípidos, resultantes de uma digestão lisossômica, de materiais granulares electrodensos e de uma matriz de suporte (*Kim, 1984*). Estes grânulos poderão estar associados à presença de fosfatase ácida, relacionada com as estruturas lisossomais, e poderão eles mesmos corresponder a estruturas lisossomais ou representar resíduos devidos a essa digestão lisossomal (*Brunk et al., 1972; Skepper et al., 1987*). Estes pigmentos estão ainda associados a lesões por radicais livres e peroxidação lipídica – natural no envelhecimento – sendo mais frequentes em tecidos com baixo índice de renovação celular, como o cerebral. Havendo maior susceptibilidade à oxidação celular, parece-nos que, na sequência de uma possível intervenção farmacológica já referida por outros autores (*Alves Pereira et al., 2007*), contra os efeitos do RBF, pode vir a ser interessante, investigar a possibilidade de mecanismos, ou moléculas, anti-oxidantes conferirem alguma protecção aos tecidos expostos a baixas frequências. *Freitas et al. (2004)* determinaram a redução da presença deste pigmento – lipofuscina – em cérebros de ratos submetidos a alcoolismo crónico após tratamento com agentes antioxidantes. Em todo o caso, a presença destas estruturas, associadas a processos de senescência celular, nas nossas observações, sugerem, mais uma vez, podermos estar perante um processo de carácter degenerativo na glândula parótida provocado pela acção do RBF.

Existem, nas alterações relacionadas com a idade, outras alterações a nível dos vários elementos estruturais das glândulas salivares (*Kim, 1984*) que são comparáveis às que acontecem nas glândulas parótidas expostas ao RBF. Estão descritas, também, no envelhecimento glandular, oncocitose acinar, poliploidismo e hiper cromatismo nuclear (*Faustino et al., 2003*). Os oncócitos são células com marcada acidofilia citoplasmática, que estão presentes nos ácinos e nos ductos excretorios. Estas células têm a sua origem num processo de transformação sequencial de células epiteliais normais (*Tandler, 1966*),

cujas alterações mitocondriais são profundas. *Loreti et al., (2002)* propõem que estas células possam ser bioquimicamente deficientes. Nos nossos resultados pudémos observar presença de corpos acidófilos, relacionáveis com a transformação oncocítica e morte celular, que pode corresponder a fenómenos de apoptose. A apoptose de células epiteliais da traqueia já foi descrita anteriormente e associada ao RBF em doentes referidos com o diagnóstico de doença vibroacústica (*Reis Ferreira et al., 2006*). Também da *Fonseca et al. (2006a; 2006b)* descreveram, picnose, uma alteração indicativa de apoptose, na mucosa do estômago e do duodeno, de ratos Wistar, na sequência da exposição a RBF.

Na irradiação da glândula parótida com Rx ocorrem descrições de morte celular por apoptose (*Gazda et al., 1992, Stephens et al., 1991*). As lesões na glândula parótida resultantes de irradiação, incluindo as últimas que são referidas, ocorrem sobre três linhagens de células, que não estão completamente estabelecidas. Serão as células com “alguma” capacidade de divisão, primárias, as células de fim de estágio, secundárias (*Dardick, 1998*), e as derivadas de divisão das células dos ductos intercalares, terciárias (*Denny et al., 1997*). O interesse de podermos vir a estudar ou determinar os efeitos do RBF sobre cada uma destas linhagens celulares reside na possibilidade de, tendo capacidades secretórias diversas (*Dardick, 1998*) podermos compreender melhor o fenómeno de lesão e de, na sequência do que já referimos anteriormente, podermos vir a actuar farmacologicamente em diferentes fases do processo de lesão. Num estudo realizado por *Coppes et al. (2001)* com irradiação por Rx de glândulas parótidas de ratos, conseguiram determinar algum grau de protecção celular por estimulação combinada de receptores muscarínicos de acetilcolina com metacolina e dos α -adrenoreceptores com fenilepinefrina. Apesar de os autores reconhecerem não poder aplicar as concentrações necessárias para uso clínico, foi possível compreender que algumas das alterações ocorridas nas células eram devidas a lesão nas vias de sinalização celular mediadas por estes receptores.

A aplicação destes conhecimentos ao nosso estudo, ao leque de alterações celulares descritas e encontradas nas nossas observações, remete-nos para a tentativa de compreender o mecanismo de lesão ultraestrutural dos tecidos biológicos pelo RBF, nomeadamente na estrutura membranar da célula, altamente organizada, e do seu aparelho genético.

As células possuem uma organização morfo-funcional fortemente desenvolvida que tem um papel vital na actividade metabólica normal e também na doença (*Ingber, 2003b*).

Este aparelho celular forma um sistema de transdução químico-mecânico capaz de interpretar forças externas e de interferir nas vias de actividade intracelular (*Ingber, 2004; Wang et al., 1993*). O citoesqueleto tem a este nível, um importante papel, e forças geradas no citoesqueleto estão envolvidas no transporte citoplasmático de organelos (por exemplo mitocôndrias) ou na movimentação de cromossomas durante a mitose (*Ingber, 2003b*). O citoesqueleto forma uma rede, que se encontra ancorada à matriz extracelular através de proteínas transmembranares, as integrinas (*Ingber, 2003a*). Verificou-se que forças mecânicas aplicadas directamente ao nível destes complexos transmembranares alteram as células sob ponto de vista bioquímico, alteram a expressão de genes – e o padrão de proteínas sintetizadas (*Lafrenie et al., 1998*) – de uma maneira proporcional a essas forças (*Ingber, 2004; Ingber, 2003a; Wang et al., 1993*). Relativamente aos efeitos genotóxicos do ruído e da vibração, que são estímulos de carácter mecânico, estão documentados em trabalhadores e também em modelo animal (*Silva, 2002; 1999a; 1999b*). Este processo de sinalização transmembranar pode ainda mediar a organização de estruturas do citoesqueleto (*Lafrenie et al., 1998*), que possui, entre outros constituintes, fibras de actina e tubulina (*Small et al., 1999*). Existe evidência de que estruturas contendo núcleos de actina, as microvilosidades, ao nível dos microfilamentos e contendo tubulina, os cílios, ao nível dos microtúbulos, são especialmente lesadas pelo RBF – acção do RBF sobre microvilosidades: *Sousa Pereira et al., 1999; Castelo Branco et al 2003a, 2004a; da Fonseca et al., 2006a, 2006b*; acção do RBF sobre cílios: *Sousa Pereira et al., 1999; Grande et al., 1999*.

Assim, propomos que, directamente, ou através da matriz extracelular, possa existir uma acção negativa do RBF sobre as células, possivelmente através das vias de sinalização intracelular (à semelhança do que se propõe para o estudo com agentes antioxidantes, também a estimulação de estruturas de membrana, como receptores, poderá vir a ser estudada). A hipótese de poder haver lesão nas vias de sinalização intracelular, causada por fenómenos mecânicos aplicados à matriz, remete-nos para o segundo ponto que nos propusémos analisar ao nível dos resultados: os efeitos sobre a matriz extracelular e a proliferação desordenada do tecido conjuntivo.

ii) A proliferação anormal de tecido conjuntivo tem sido apontada como uma das principais consequências do RBF sobre os tecidos biológicos (*Alves Pereira et al., 2007, 2004; Castelo Branco et al., 2004a*).

Como esperado, encontrámos proliferação de tecido conjuntivo no estroma da glândula parótida. Este aumento é generalizado, ocorrendo no tecido conjuntivo perilobular, nos

septos interlobulares e no tecido conjuntivo perivásculo-ductal (TCPVD). Através da análise morfológica, pudémos comprovar, que a média das áreas de TCPVD avaliadas cresce linearmente e de forma significativa ($p < 0,001$) com o tempo de exposição ao RBF, com excepção do intervalo correspondente aos grupos g2 e g3, entre a 3ª e a 5ª semanas de exposição. Este fenómeno proliferativo é do tipo fibrótico. Assim, revela-se essencial entender este processo para compreender as lesões provocadas pelo RBF no estroma da glândula parótida.

Os processos fibróticos são fenómenos complexos que se caracterizam por uma deposição anormal e abundante de componentes da matriz extracelular (Verrecchia et al., 2004). Possuem um carácter multifactorial e resultam de uma activação de longo-prazo dos fibroblastos nos órgãos afectados (Verrecchia et al., 2002) em resposta a estímulos crónicos ou inflamatórios (Samuel, 2005), ocorrendo também na senescência, na sequência de isquémia tecidual ou em alterações neuro-endócrinas (Swynghedauw, 1999). A disfunção orgânica é uma consequência frequente, por vezes incapacitante, e está extensamente descrita na literatura (Tian et al., 2003).

Os processos fisiopatológicos subjacentes, nos vários órgãos, parecem ser semelhantes, o que tem importantes implicações para compreender globalmente o fenómeno (Samuel, 2005). Do esquema da Fig. 78, adaptado de Samuel (2005), vemos que a inflamação tem um importante papel na génese das lesões.

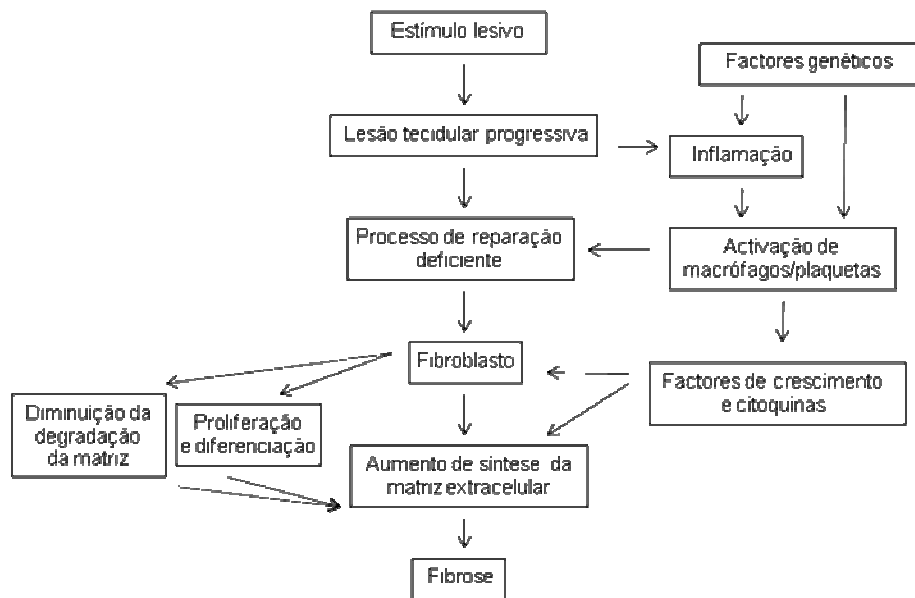


Fig. 78 - Adaptado de Samuel CS. *Relaxin: antifibrotic properties and effects in models of disease*. Clin Med Res. 2005 Nov;3(4):241-9.

No caso da proliferação fibrótica, atribuída ao RBF, as descrições encontradas têm como denominador comum a ausência de sinais inflamatórios (*Alves Pereira et al., 2007*). Também no estudo da glândula parótida exposta ao RBF não indentificámos células do processo inflamatório. Já na literatura com descrições de fibrose da glândula parótida, com origem noutros estímulos que não o RBF, é constante a presença de sinais inflamatórios associados. Seja na irradiação pós-operatória com Rx (*Coppes et al., 2001*), em áreas submetidas a cirurgia (*Som et al., 1989*) ou na sequência de trauma local (*Mukunyadzi et al., 2000*), associado ao consumo de álcool (*Banderas et al., 1992*) ou relacionado com fármacos (*Mourouzis et al., 2003*), em patologias quísticas esclerosantes (*Imamura et al., 2004*), em doenças autoimunes como a Síndrome de Sjögren (*Takashima et al., 1991*) ou em doenças tumorais (*Minami et al., 1993*), está associado um processo inflamatório.

O contraste entre a quantidade de situações acima referidas e as lesões provocadas pelo RBF, semelhantes nas consequências, sob o ponto de vista anatómico, mas tão grande diferença fisiopatológica, num dos mecanismos de lesão, ajuda a perceber o porquê de não ser uma tarefa simples explicar o fenómeno de fibrose relacionado com o RBF. A ausência de sinais inflamatórios torna a situação atípica sob o ponto de vista de conceitos médicos convencionais (*Alves-Pereira et al., 2007*). Ainda assim, existem na literatura descrições clínicas de processos fibróticos na ausência de sinais inflamatórios. A fibrose pulmonar idiopática é um exemplo em que há proliferação fibroblástica e remodelação da matriz extracelular que conduz a uma distorção irreversível da arquitectura do pulmão (*Selman et al., 2001*).

Por comparação com o diagrama que apresentámos anteriormente, levantam-se, a nosso ver, os seguintes desafios na compreensão das vias de lesão pelo RBF no estroma da glândula parótida (Fig. 79): qual ou quais os estímulos que activam a produção de matriz extracelular?; como se processa o balanço produção/degradação de componentes da matriz que conduz à fibrose?; qual o papel, se houver algum, de factores de crescimento e citoquinas que é sabido regularem a síntese de componentes da matriz extracelular a nível transcricional? (*Verrecchia et al., 2007; Ghosh, 2002*).

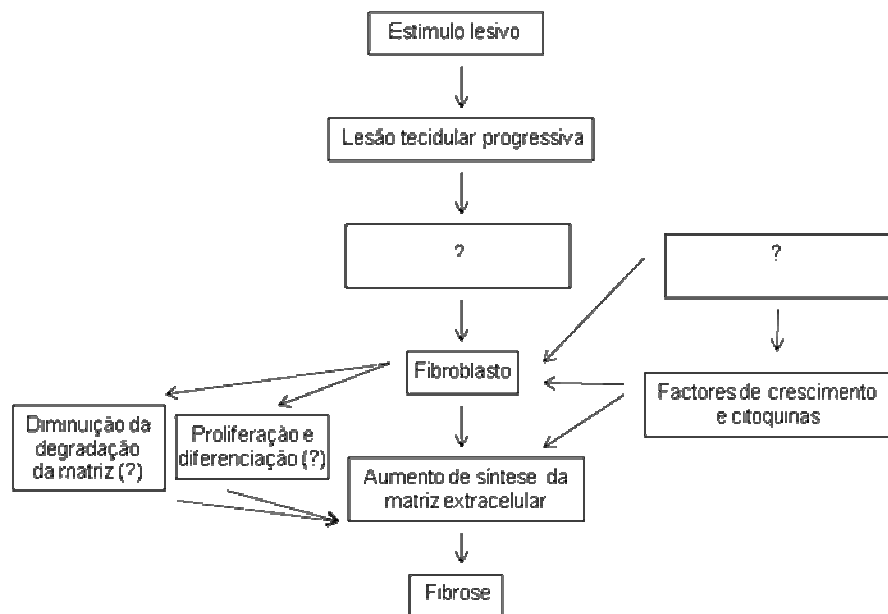


Fig. 79 – Diagrama representativo das questões levantadas nas vias de lesão relacionadas com o fenómeno de fibrose associado ao RBF.

Tentaremos, tanto quanto é razoável esperar do nosso trabalho, responder a algumas das questões levantadas pelo diagrama da Fig. 79.

A acumulação de tecido fibrótico é o resultado do balanço entre o aumento da produção e deposição, e não degradação dos componentes da matriz extracelular (Verrecchia et al., 2007). A matriz extracelular é composta por proteínas fibrosas, como colagénios ou elastina; por proteoglicanos, como a decorina e a fibromodulina; por moléculas relacionadas com adesão, como a fibronectina e laminina; e diferentes tipos de metaloproteínases (Ghosh, 2002). Os colagénios são, dos componentes da matriz extracelular, os que aparecem em maior proporção nos processos fibróticos (Verrecchia et al., 2007).

As moléculas de colagénio são constituídas por três cadeias polipeptídicas, as cadeias alfa (α), e formam uma família de proteínas que se estende a todo o organismo (van der Rest et al., 1991). Possuem funções variadas e estão envolvidas em vários processos que vão desde o suporte dos tecidos, à adesão celular, à angiogénese, à morfogénese tecidual, à oncogénese, à migração celular ou à reparação tecidual. Até à data foram identificados 28 tipos de colagénio (Kadler et al., 2007), contudo os tipos I, II, III, V e XI

(colagénios fibrilhares), constituem 90% dos colagénios do organismo (*Rhodes et al., 2007*).

O colagénio tipo I é o maior componente da matriz extracelular, sendo composto por duas cadeias $\alpha 1(I)$ e por uma $\alpha 2(I)$ que são o produto de dois genes o COL1A1 e o COL1A2 (*Verrecchia et al., 2007*). O colagénio IV é o maior componente das membranas basais sendo composto por duas cadeias $\alpha 1(IV)$ e por uma $\alpha 2(IV)$, produtos dos genes COL4A1 e o COL4A2. As membranas basais são estruturas especializadas do tecido conjuntivo que subjazem os epitélios e os endotélios possuindo inúmeras atribuições estruturais e funcionais (*Kadler et al., 2007*). A localização celular dos genes da matriz extracelular na glândula parótida identificou o gene COL1A1 (colagénio I) no estroma que rodeia as células, e o gene COL4A1 (colagénio IV) na membrana basal das células acinares e das células ductais (*Lazowski et al., 1994*). Na glândula, a expressão temporal dos genes dos colagénios I e IV vai diminuindo do nascimento até à idade adulta apesar de se manterem nas mesmas localizações. As grandes quantidades iniciais destes colagénios correspondem às alterações morfológicas e proliferativas que ocorrem nas células durante o seu desenvolvimento (*Lazowski et al., 1994*). Depois de transcritas e processadas, as moléculas de colagénio agregam-se para formar colagénios maiores. Um evento anormal em qualquer passo da produção dos colagénios pode resultar num aumento da síntese, que por seu lado causa fibrose tecidual (*Verrecchia et al., 2007*). O colagénio V, fibrilhar, é um componente menor, quando comparado com o colagénio I, das matrizes extracelulares. A isoforma mais abundante é a $\alpha 1(V)_2\alpha 2(V)$ que deriva dos genes COL5A1 e COL5A2 (*Wenstrup et al., 2004a*). Por norma, a um aumento do colagénio I corresponde um aumento do colagénio V, que parece ter um papel central na incorporação das moléculas de colagénio I em fibrilhas de colagénio (*Wenstrup et al., 2004a*). Aliás, a sua ausência ou deficiência leva à deficiente formação de colagénio I como acontece na síndrome de Ehlers-Danlos, tipo clássico (*Wenstrup et al., 2004b*). No nosso estudo há aumento destes dois tipos de colagénio, com a exposição ao RBF, mantendo as suas localizações relativas do grupo de controlo para o g5, 13 semanas de RBF.

A produção de colagénios pode ter três origens: os fibroblastos ou as células fibroblasto-like, a transição epitélio-mesênquima, ou recrutamento de fibrócitos da medula óssea (*Kisseleva et al., 2008*). Nas glândulas exócrinas e também na glândula parótida existem duas populações de colagénios fibrilhares, associadas a fibroblastos e ao epitélio. Na glândula parótida não existe diferença significativa na espessura dos dois tipos de

colagénio, senão que se encontram separados por um delgado agregado de fibras elásticas compostas por elastina e microfibrilhas (Hosoyamada et al., 2003). Segundo estes autores, a localização das fibras colagénias na *laminae densae* da membrana basal indica que as células epiteliais sintetizam e segregam fibrilhas de colagénio (Hosoyamada et al., 2003), à semelhança do que acontece na túnica fibrosa do fígado - folheto de Glisson - (Hosoyamada et al., 2000), ou na cápsula glomerular - de Bowman - (Mbassa et al., 1988). A produção de fibras formadoras de colagénios fibrilhares tipo I, III e V, foi aliás detectada em vários tipos de epitélios em modelos experimentais de fibrose (Hosoyamada et al., 2003). O TCPVD na glândula parótida contém ambas as populações de colagénio fibrilhares, associado a fibroblastos e ao epitélio de ductos excretores e de vasos sanguíneos (Hosoyamada et al., 2003).

No nosso estudo verificámos um aumento progressivo e significativo de colagénio I do grupo de controlo para o grupo exposto ao RBF por 13 semanas. Idêntico comportamento foi verificado no colagénio V. O aumento no colagénio I verifica-se no tecido conjuntivo perilobular, interlobular e no TCPVD. Sendo o colagénio I o maior componente da matriz extracelular (Verrecchia et al., 2007) e estando a proliferação da matriz extracelular associada à exposição crónica ao RBF podemos afirmar que este resultado era esperado, se partirmos do princípio que não há alterações estruturais no colagénio e na imunomarcação.

Também a irradiação com Rx leva à fibrose e à perda de função. Em glândulas salivares irradiadas comprovou-se imunoreacção para colagénio I, na área dos ductos excretores, e nos septos interlobulares (Friedrich et al., 2003), num padrão de distribuição semelhante ao encontrado por nós na glândula exposta ao RBF. Esta acumulação de proteínas – colagénio I – pode estar relacionada com apoptose e ainda condicionar um ambiente hipóxico que dê origem à transformação celular (Friedrich et al., 2002). Na glândula parótida há, como já vimos, um importante aumento de colagénio I, daí que pomos a hipótese que algumas das alterações celulares que encontrámos no parênquima glandular possam estar relacionadas com a fibrose de modo semelhante ao descrito para a irradiação.

Em patologias como a esclerodermia ou na osteogénese *imperfecta*, o nível elevado de colagénio tipo I tem como causa primária o aumento da taxa de transcrição das moléculas de colagénio, que é regulada por inúmeros mecanismos, nomeadamente factores de crescimento e citoquinas (Verrecchia et al., 2007; Ghosh, 2002). O *transforming growth factor-β* (TGF-β), de origem plaquetária mas também mesenquimal

ou epitelial (*Verrecchia et al., 2002*), está relacionado com a produção fibroblástica de *connective tissue growth factor* (CTGF) que promove a acumulação de matriz extracelular (colagénio I) (*Chaqour et al., 2006*), principal marca das doenças fibróticas (*Ghosh, 2002*). Também na fibrose pulmonar idiopática, processo ainda não totalmente compreendido, se crê que a proliferação fibrótica está relacionada com a proliferação fibroblástica/miofibroblástica, diminuição da apoptose miofibroblástica e aumento da actividade e da resposta a citoquinas fibrogénicas como TGF- β , platelet derived growth factor – PDGF, insulin growth factor – IGF ou tumor necrosis factor- α – TNF- α (*Selman et al., 2001*).

No processo fibrótico intestinal, associado a irradiação, a expressão de CTGF está aumentada (*Vozenin-Brotans et al., 2003*) e no isolamento *in vitro* de células musculares intestinais também expostas a irradiação, *Bourgier et al. (2005)* comprovaram uma concentração constitutiva de CTGF elevada e uma capacidade secretória de colagénio aumentada. Os mesmos autores puderam verificar que a via Rho/Rho kinase está relacionada com a activação da CTGF, e que o seu bloqueio diminuía a diferenciação fibrogénica (*Bourgier et al., 2005*).

A este propósito, os importantes progressos na área de engenharia tecidual podem ajudar a compreender os mecanismos de lesão atribuídos ao RBF, e formas possíveis de diminuir os seus efeitos, na medida em que o stress mecânico tem sido estudado como estímulo para a diferenciação celular e para a estimulação de células produtoras de componentes da matriz extracelular, nomeadamente colagénio (*Altman et al., 2001*). As matrizes tridimensionais de colagénio I são, neste campo, um modelo comum para investigar a influência do stress mecânico sobre os fibroblastos (*Grinnell, 2003*). As experiências *in vitro* com stress mecânico ajudam a perceber como é que, por exemplo, forças que são impostas exteriormente à célula levam a alterações na sua expressão genética (*Chaqour et al., 2006*).

Não tendo, no nosso trabalho, a pretensão de justificar a regulação da hiper-expressão genética de moléculas como os colagénios, não podemos deixar de focar um ponto que nos despertou curiosidade e que diz respeito às referências encontradas a propósito do estudo da activação destes genes, nomeadamente através de factores de crescimento, em patologias relacionadas com stress mecânico, que resultam de um aumento de forças externas aplicadas aos tecidos, e que se traduzem em alterações mecânicas no citoesqueleto de actina das células. Estas forças estão significativamente aumentadas em situações tão diversas como a hipertensão, a obstrução orgânica ou a sobrecarga

hemodinâmica (*Chaqour et al., 2006*). Nestas patologias os componentes celulares dos órgãos, particularmente fibroblastos, células endoteliais e células musculares lisas ficam submetidas a um *input* mecânico que vai além do que seria aceitável em condições normais (*Hill et al., 2006*). A transferência deste tipo de forças às células causa, em órgãos como os vasos, uma produção de factores de crescimento, citoquinas ou hormonas que levam ao aparecimento de respostas hipertróficas, hiperproliferativas ou fibróticas (*Hill et al., 2006*).

De algum modo, o impacto mecânico causado pelo RBF ou pela vibração directa poderão ter pontos comuns, sob ponto de vista físico, com os que acontecem em algumas destas patologias em que estímulos mecânicos anormais são aplicados aos tecidos de forma cíclica. Consistente com estas considerações – que admitimos terem algum carácter especulativo – é o facto de estudos *in vitro* demonstrarem que forças mecânicas aplicadas às células resultam em profundas alterações histomorfométricas, fenotípicas e funcionais (*Ingber, 2002; Silver et al., 2003; Janmey et al., 2004*). Na glândula parótida exposta ao RBF pudémos comprovar alterações morfométricas. Oliveira *et al.* (2007) comprovaram a existência de alterações funcionais, com diminuição da saliva total e ainda alteração qualitativa.

Os modelos – *in vitro* – poderão vir a ser importantes para compreender, por exemplo, porque é que encontrámos uma aparente estabilização do processo de fibrose provocado pelo RBF do g2 para o g3, ou seja da 3ª para a 5ª semana de exposição. Em experiências realizadas *in vitro*, em células submetidas a stress mecânico, a expressão de CTGF decai para valores basais após o estímulo mecânico se tornar o ambiente de normalidade em que a célula se encontra. Este facto pode ser indicativo de um mecanismo adaptativo em que vias sinalizadoras compensatórias são activadas para permitir que a transcrição genética volte a níveis normais (*Abdel et al., 2004*).

No mesmo sentido vem a afirmação de Reis Ferreira *et al.* (2006) que referem que ao contrário da proliferação fibrótica em resposta a um estímulo inflamatório, nos tecidos expostos ao RBF, nomeadamente nas vias aéreas, o fenómeno, parece corresponder a um reforço estrutural com o objectivo de assimilar o stress vibratório anormal. Este reforço estrutural seria conseguido pela produção maciça de colagénio (*Reis Ferreira et al., 2006*). No pericárdio de doentes expostos cronicamente a RBF foi identificado o desenvolvimento anormal de duas camadas de tecido conjuntivo que dariam ao pericárdio uma maior eficiência energética na absorção de forças mecânicas externas (*Castelo Branco, 1999a; Alves-Pereira et al., 2007*). Na glândula parótida esse reforço

estrutural seria conseguido à custa do aumento do TCPVD. O TCPVD acompanha as artérias, as veias e a árvore ductal e pensa-se que possa ter funções ao nível da estabilização mecânica do tecido glandular (*Hosoyamada et al., 2003*).

Verrecchia et al. (2007) referem que nos processos de fibrose provocados por estímulos crónicos, a lesão tecidual e a tentativa de um processo de regeneração estão implícitos. Assim, na glândula parótida exposta ao RBF poderia haver, da 3^a para a 5^a semanas de exposição ao RBF, uma resposta de recuperação, no estroma, que tenderia para o desequilíbrio com a continuação da aplicação do estímulo mecânico. Também *Kisseleva et al. (2008)* referem que, apesar da fibrogénese ser um mecanismo reparador, tende para o desequilíbrio, com extensa deposição de proteínas da matriz e fibrose, com a cronicidade do estímulo lesivo sobre os tecidos.

Parece-nos importante nesta fase, na continuação da linha que vínhamos seguindo, para interpretar os mecanismos que levam à fibrose encontrada na glândula e provocada pelo RBF, tentar compreender a transmissão de forças à célula, assunto que já afluímos atrás, e o conceito de mecanotransdução, que já foi associado à doença vibroacústica e aos efeitos biológicos do RBF como a via pela qual a pressão sonora lesa as células e os tecidos (*Alves-Pereira et al., 2007*).

Um ponto de partida para a interpretação deste recente conceito na área da biologia celular e que poderá ter aplicação na área dos efeitos biológicos do RBF é uma interessante experiência de *Naruse et al. (2003)* que utilizaram ultrasons pulsáteis de baixa intensidade, que são uma forma de energia mecânica, para acelerar a reparação de fracturas e a distração osteogénica. Os autores atribuem ao estímulo mecânico a diferenciação osteoblástica, referindo ainda que diversas forças físicas podem ter reflexos no micro-ambiente de cada célula. Os autores sugerem ainda o envolvimento das integrinas neste processo, ao nível das adesões focais, que já vimos serem um ponto de ligação entre a matriz e as células (*Ingber, 2003a*). As integrinas parecem constituir a via primária para a transmissão de forças para dentro da célula e são vistas como candidatas a iniciadoras dos eventos mecano-sensíveis (*Huang et al., 2004*). *Munger et al. (1999)* demonstraram que a bleomicina, um conhecido agente fibrótico (*Thrall et al., 1979*), não provocava fibrose pulmonar em ratos deficientes em integrina $\alpha\beta6$, apesar de ser detectada intensa inflamação.

A mecanotransdução é o processo que converte estímulos físicos em sinais bioquímicos e integra esses sinais nas respostas celulares a nível molecular (*Ingber, 2004*). Apesar de

não se saber o suficiente acerca da mecanotransdução para prever respostas celulares, podemos presumir que as células em tecidos intactos reajam aos estímulos mecânicos com respostas moleculares que têm por objectivo proteger a integridade do tecido. A nível experimental, as forças sobre as células podem ser exercidas de inúmeros modos e todos eles, se de suficiente magnitude, são capazes de provocar uma resposta biológica na célula (*Huang et al., 2004*). Neste campo, a resposta das células endoteliais ao stress mecânico provocado por fluidos (*Malek et al., 1995*) é das mais estudadas. Sabe-se do contributo deste tipo de estímulo mecânico na indução de proliferação celular endotelial (*White et al., 2001*), como também se conhece que o nível crítico de força para iniciar várias respostas biológicas nas células é de aproximadamente 1 Pascal (*Helmke et al., 2001*).

Não querendo fazer uma comparação directa entre os mecanismos, que contribuem, por exemplo, para o processo aterosclerótico, ou até para as doenças relacionadas com a vibração, ou outros, com aqueles que são provocados pelo RBF de alta intensidade não podemos deixar de dar eco à afirmação de *Huang et al. (2004)*, que nos parece aplicável aos efeitos do RBF sobre os tecidos biológicos: apesar da aparente complexidade – do processo de mecanotransdução celular – é provável que células estimuladas de diferentes formas possam ser activadas por mecanismos similares a nível molecular.

Assim, pensamos, em resposta às questões que colocámos, que podemos propor o seguinte esquema (Fig. 80) para o aparecimento da fibrose provocada pelo RBF, num contexto mais amplo, mas que abre portas ao estudo dos mecanismos celulares de lesão pelo RBF.

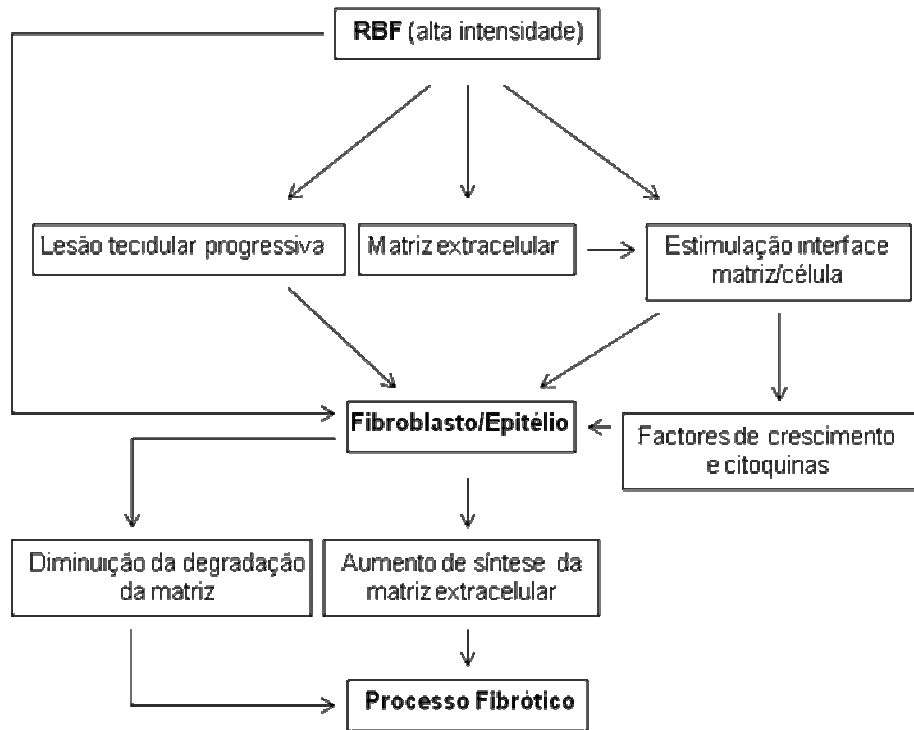


Fig. 80 – Diagrama proposto para as vias conducentes ao processo fibrótico associado a RBF.

iii) Os vasos são estruturas muito afectadas pelo RBF (*Castelo Branco et al., 1999a*), assim, o interesse de dedicarmos nesta discussão um capítulo aos vasos, quando os mesmos fazem parte do estroma, já discutido anteriormente, reside no facto de querermos tentar perceber até que ponto existe um compromisso vascular na glândula que possa contribuir e justificar algumas das lesões encontradas.

No nosso estudo identificámos proliferação endotelial nos vasos, com espessamento da parede e esboço de formações trombóticas que chegam em alguns casos a ocluir quase na totalidade o lume do vaso. As lesões que encontrámos são semelhantes às descritas na literatura, e associadas ao RBF, que se caracterizam por espessamento focal da íntima com ruptura da lâmina elástica interna e proliferação celular (*Martins dos Santos et al. 2002; Castelo Branco et al., 2004b*). O espessamento vascular descrito parece abranger o vaso em toda a sua extensão (*Martins dos Santos et al., 2005*), o que está de acordo com facto de o RBF atingir os corpos biológicos por inteiro, e com o facto de o mesmo ter um importante componente de matriz extracelular. Por este facto não nos surpreendem as lesões vasculares na glândula parótida.

As lesões vasculares que encontramos são semelhantes às descritas por da Fonseca, que efectuou uma análise quantitativa às artérias da parede gástrica, em animais expostos ao RBF, podendo comprovar um aumento do rácio parede/lume, com significância estatística, ao longo do tempo de exposição ao RBF (da Fonseca, 2006c). Esse aumento resultaria de proliferação celular na parede do vaso. Curiosamente os resultados obtidos por da Fonseca na avaliação das artérias, traduzem-se num gráfico que é de algum modo comparável ao obtido na glândula parótida na avaliação do TCPVD, na medida em que há um aparente período de estabilização no processo de lesão. Nos vasos da parede gástrica da 5ª para a 9ª semana de exposição ao RBF e no TCPVD da glândula parótida da 3ª para a 5ª semana de exposição (Gráfico 3 e 4).

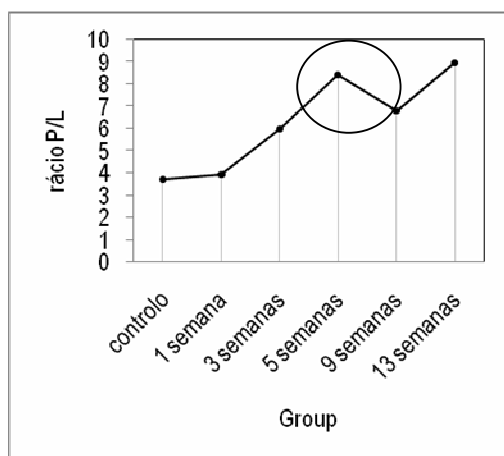


Gráfico 3 – adaptado de da Fonseca (2006c).

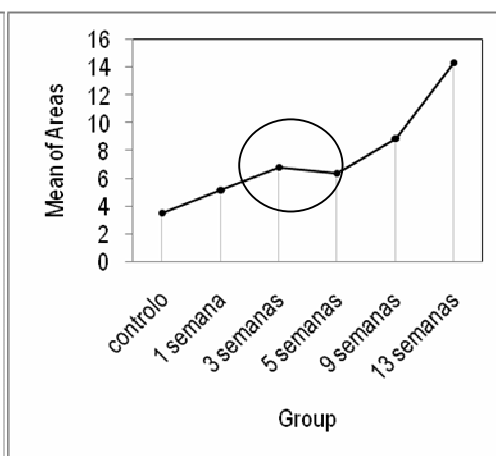


Gráfico 4 – evolução do TCPVD na glândula parótida

Tanto nas artérias como no TCPVD há um importante componente de matriz extracelular. A limitação da realização de um estudo como o nosso, com um intervalo de tempo tão grande entre a recolha de informação, poderá justificar, em parte, o facto de um possível período de estabilização das lesões aparecer em fases diferentes da exposição ao RBF. Por outro lado, não deverão ser estranhas a esta diferença nos resultados, as propriedades biológicas dos órgãos comparados. O facto de um órgão onde se realizou o estudo ser oco, o estômago, e o outro poder ser considerado maciço, a glândula parótida, e ainda o facto de um estar localizado na cabeça e o outro no abdómen, poderá ser razão suficiente para justificar a diferença, em virtude das propriedades físicas do agente agressor, o RBF.

Ainda assim, nos processos fibróticos a expressão de componentes da matriz extracelular, como colagénios, nos diferentes órgãos, não é necessariamente concomitante. Tome-se a exemplo o estudo de Teles-Grilo *et al.* (2005) com indução de fibrose pulmonar por bleomicina, um conhecido agente inflamatório, que estabelece períodos de expressão temporal diferentes para o aparecimento de dois tipos de colagénio, o I e o IV. O aparecimento inicial, significativo, do COL4A2, gene que marca a expressão de colagénio IV, que faz parte da membrana basal e é abundante nos vasos, precede o de colagénio I, parecendo indicar que o processo angiogénico é fundamental para a patogénese das doenças inflamatórias no pulmão (Teles-Grilo *et al.*, 2005).

Na glândula parótida encontramos colagénio IV localizado nas membranas basais de vasos e colectores. Este colagénio mantém-se estável na sua expressão com o tempo de exposição ao RBF.

Este resultado é, à primeira vista, desconcertante, conhecida que é a associação do processo de fibrose à angiogénese (Jackson *et al.*, 1997). No entanto, poderá não ser, se partirmos do princípio que o processo fibrótico associado ao RBF não é, em absoluto, igual à fibrose associada a um processo inflamatório. O mesmo pressuposto é usado por Selman *et al.* (2001) para justificar a surpreendente ausência de evidências de processo inflamatório na patogénese da fibrose pulmonar idiopática.

À luz deste resultado há dois pontos que nos parece essencial tentar esclarecer: a proliferação tecidual e de colagénio I, que cria condições para um ambiente hipóxico, não seria só por si um estímulo para desenvolvimento de novos vasos?; havendo referências que relacionam o estímulo mecânico com a angiogénese (Suhr *et al.*, 2004) porque é que não aumenta a expressão de colagénio IV na membrana basal?

A angiogénese é um processo muito complexo – ainda mais que a fibrose – que não pretendemos justificar com o nosso trabalho. Parece-nos no entanto essencial fazer um esforço para, pelo menos, tentar compreender o comportamento dos vasos da glândula parótida exposta ao RBF.

O processo de formação de um novo vaso é frequentemente referido como angiogénese (Simons, 2005). Nos vasos, o revestimento interior, é composto por células endoteliais, que formam o endotélio, e o exterior está revestido com uma membrana especializada de tecido conjuntivo, a membrana basal. O colagénio IV é o componente mais abundante da membrana basal (Kadler *et al.*, 2007), que também possui na sua constituição laminina,

proteoglicanos e entactinas (*Miner et al., 2004*). Ambos os revestimentos têm um papel fundamental em processos relacionados com a angiogénese (*Jakobsson et al., 2007*). Este termo – angiogénese – torna-se no entanto insuficiente se quisermos explorar todo o espectro de acontecimentos que envolvem o desenvolvimento de novos vasos. Os conceitos actuais dizem-nos que a neovascularização pode resultar de vários processos incluindo a angiogénese, a arteriogénese e a vasculogénese (*Simons, 2005*). O termo angiogénese é referido, essencialmente para descrever o desenvolvimento de novos capilares a partir de vénulas pós-capilares, e em adultos é estimulado fundamentalmente pela hipóxia tecidual por activação da expressão do *hypoxia-inducible factor* – HIF (*Carmeliet, 2003*). Em contraste, o termo arteriogénese refere-se ao processo de maturação (remodelação ou alargamento de canais vasculares pré-existent) de canais laterais (*Gimbrone et al., 1999*). Já o termo vasculogénese corresponde ao processo de formação in situ de vasos sanguíneos a partir de células-mãe endoteliais e de células-mãe vasculares (*Rhodes et al., 2007*).

De todos estes processos, aquele que pensamos ser mais provável acontecer nos vasos da glândula parótida exposta ao RBF é a arteriogénese. Utilizamos como suporte para esta suposição os vários exemplos, que documentámos, de lesões do tipo trombótico que protruem para o interior do vaso quase que obstruindo por completo o seu lume e a ausência de aumento de colagénio tipo IV.

O colagénio IV é essencial para a manutenção da integridade estrutural da matriz extracelular ao nível das membranas basais, mas não é crítico para o desenvolvimento dessas matrizes (*Pöschl et al., 2004*). As lamininas parecem, a esse nível, ter um papel preponderante (*Smyth et al., 1999*). Em modelo embrionário – onde a expressão de colagénio IV se faz na ausência de processo inflamatório – a deficiência de colagénio IV não afecta o desenvolvimento do sistema vascular, apesar de causar uma organização capilar aberrante (*Pöschl et al., 2004*). Assim, pensamos, que a reorganização vascular associada ao RBF na glândula parótida possa acontecer com manutenção do nível inicial de colagénio IV. O nosso resultado não é neste ponto coincidente com o de da Fonseca que, com um protocolo semelhante, obteve aumento desse mesmo colagénio associado aos vasos no duodeno. O facto de o tubo digestivo ser mais exposto a agressões exteriores e de o autor ter constatado a presença de um ligeiro infiltrado inflamatório (*da Fonseca et al., 2006a*) poderá justificar esta diferença, sabendo-se da potente capacidade de indução que estímulos inflamatórios têm na angiogénese e consequentemente sobre a expressão do colagénio IV (*Jackson et al., 1997*).

No estudo macroscópico vascular pudémos encontrar imagens que acreditamos corresponderem a vascularização compensatória, através da recanalização de vasos pré-existentes, que se desenvolveriam a juzante da lesão de tipo oclusivo. A evidência sobre os estímulos que conduzem a recanalização de vasos pré-existentes em humanos é ainda pouco clara e objecto de controvérsia (*Simons, 2005*). Já em animais, os modelos demonstram claramente a remodelação de vasos pré-existentes em resposta a lesões oclusivas (*Pipp et al., 2004; Simons, 2005*). O aumento de stress mecânico, em consequência da redistribuição do fluxo sanguíneo (*Bergmann et al., 2006*) é, por si só, um estímulo suficiente para o desenvolvimento de circulação colateral arterial após uma lesão oclusiva (*Pipp et al., 2004; Helisch et al., 2003*).

Os vasos sanguíneos são essenciais para fazer chegar oxigénio e nutrientes aos tecidos (*Jakobsson et al., 2007*) e a hipoxia é um forte estímulo para a expressão de factores com influência no crescimento de capilares sanguíneos, que tem normalmente origem em estímulos inflamatórios associados a lesão tecidual focal isquémica (*Schaper et al., 2003*). Apesar de termos encontrado, principalmente no grupo mais exposto ao RBF, lesões de necrose celular, e de haver uma forte hialinização do conjuntivo, indicativa de trauma tecidual, não encontrámos áreas de necrose lobular, que pudéssemos atribuir a enfarte do lóbulo, e que criaria condições para o desenvolvimento da angiogénese. Outros dados que nos permitem reforçar esta linha de pensamento são: a ausência de células do processo inflamatório no parênquima e o facto de a arteriogénese ter uma capacidade 5 a 10 vezes superior à angiogénese para repor o fluxo sanguíneo e de ser efectivamente capaz de compensar uma oclusão vascular, o que não acontece com a angiogénese (*Schaper et al., 2003*).

Em todos estes processos há, no entanto, um facto que não conseguimos justificar. Na literatura que consultámos há constantes referências ao importante papel que os monócitos sanguíneos têm na arteriogénese (*Bergmann et al., 2006*). A activação monocitária conduz, normalmente à acumulação de macrófagos tecidulares. Não encontrámos estas células nas nossas observações apesar de Grande *et al.* (1999) terem descrito uma forma semelhante a um macrófago no parênquima do pulmão e Alves-Pereira *et al.* (2007) referirem um aumento destas células no pericárdio de doentes expostos ao RBF.

A acção do RBF sobre a componente vascular da glândula parótida talvez seja dos três pontos que nos propusémos analisar – alterações do parênquima e celulares, do estroma e vascular – aquele que nos levantou mais dificuldades. Aliás, o estudo de alguns

conceitos que aqui apresentámos são recentes – até à data encontrámos 118 referências de revisão para arteriogénese e 8040 relativas à angiogénese.

As lesões celulares no parênquima da glândula parótida exposta ao RBF são anteriores às lesões vasculares. As primeiras têm expressão a partir do primeiro grupo exposto ao RBF e as segundas são mais óbvias a partir do segundo grupo exposto ao RBF. É-nos difícil afirmar com convicção qual o contributo das lesões vasculares, que observámos no interstício da glândula, para as alterações encontradas na glândula parótida e atribuídas ao RBF. Acreditamos que, em virtude de ser um órgão muito vascularizado possa haver lugar a circulação lateral compensatória, e revascularização que corresponderia às imagens que observámos no estudo vascular macroscópico.

Gostaríamos ao terminar, de deixar uma nota que respeita a função da glândula parótida. Oliveira *et al.* (2007) puderam constatar uma diminuição significativa da secreção de amilase basal em ratos expostos ao RBF, sugerindo que as alterações morfológicas que encontrámos possuem uma clara correspondência funcional. Os mesmos autores utilizaram ainda a estimulação de campo eléctrico para verificar a secreção mediada por nervos na glândula parótida exposta ao RBF. Puderam verificar uma diminuição da secreção por este método, que seria atribuível a lesão dos nervos intrínsecos da glândula ou, em última análise, às células, o que se verifica no nosso estudo microscópico e ultraestrutural. Nos dados funcionais obtidos por Oliveira *et al.* (2007), os autores puderam ainda verificar, através da imersão de células num meio rico em acetilcolina (ACh), um indutor da actividade salivar, que a secreção mediada por ACh estava significativamente diminuída, indicando disfunção das células acinares, o que também está de acordo com as observações e com as considerações que efectuámos quanto à glândula parótida exposta ao RBF.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

O nosso estudo propôs-se observar as alterações induzidas pelo RBF na glândula parótida em três pontos distintos: as lesões do parênquima glandular e das células secretoras; a proliferação desordenada do tecido conjuntivo; o compromisso vascular.

Pudemos observar, na análise ultraestrutural, lesões de carácter degenerativo, que conduzem à morte celular, em que as células secretoras de saliva estão profundamente afectadas na sua estrutura. As lesões ultraestruturais são coincidentes com as observações em microscopia óptica, que também permitiu identificar alterações de carácter degenerativo no parênquima e nas células. Estas lesões são mais exuberantes nos grupos mais expostos e parecem aumentar com o tempo de exposição ao RBF.

Também no estroma encontramos lesões de carácter fibrótico que aumentam com o tempo de exposição ao RBF. Esse aumento é linear e significativo ($p < 0,001$) no TCPVD parecendo indicar que o tecido conjuntivo neoformado tem origem não só nos fibroblastos mas também nos epitélios. O estímulo mecânico provocado pelo RBF será suficiente para aumentar a produção de matrizes extracelulares, por activação directa das células que sintetizam esses componentes ou por activação das mesmas na interface matriz-célula. Estes estímulos mecânicos parecem ser comparáveis a outros que alteram a actividade das células nos seus mecanismos de regulação interna, indicando que para estímulos de natureza variada as células poderão ter respostas semelhantes.

As lesões vasculares identificáveis em microscopia óptica parecem ter tradução macroscópica, parecendo, também, originar fenómenos de revascularização nos pequenos vasos que permitem a manutenção de suprimento sanguíneo aos lóbulos da glândula. Este último ponto poderá corresponder a arteriogénese. Não pudemos comprovar até que ponto o compromisso vascular poderá contribuir para as lesões encontradas, ainda que a exuberância das alterações que descrevemos, de tipo obstrutivo, permita supôr de um subsídio significativo da componente vascular para as alterações degenerativas do parênquima e do estroma.

Outros estudos, relativos à secreção salivar, exposta ao RBF, comprovaram alterações funcionais na glândula parótida. Assim, as alterações morfológicas descritas têm uma correspondência funcional.

Podemos, com estes dados, e particularmente com o nosso estudo, concluir que a glândula parótida é um alvo para o RBF e que o RBF provoca alterações de carácter degenerativo na glândula parótida.

RESUMOS

RESUMO

O ruído é um importante problema ambiental para o homem e, por norma, indesejado.

Em Portugal, no final dos anos 70, vários sintomas, despertaram a atenção de um grupo de médicos e investigadores das Oficinas Gerais de Material Aeronáutico. A realização de numerosos estudos fez crescer a convicção de que os efeitos extra-auditivos do ruído poderiam constituir uma parte não negligenciável dos efeitos nocivos dos fenómenos acústicos. A caracterização dos ambientes sonoros em que estas alterações ocorriam permitiu a percepção de que os indivíduos estariam expostos a ruído de baixa frequência (RBF) de alta intensidade. O aprofundamento do estudo das várias alterações encontradas levou à definição da doença vibroacústica como resultado da exposição crónica a ambientes acústicos ricos em RBF.

O som e o ruído são, sob ponto de vista físico, a mesma entidade, uma onda acústica. O ruído de baixa frequência (RBF) corresponde a um espectro de frequências que se estende até aos 500Hz. O comportamento físico das baixas frequências faz com que estas frequentemente se associem a vibrações através de fenómenos de ressonância. No caso das vibrações originadas por ruído de baixa frequência através de fenómenos de ressonância a estimulação é aplicada sobre toda a superfície corporal (*"whole body exposure"*).

A maioria dos equipamentos utilizados para avaliação do ruído ambiental incorporam filtros de ponderação que procuram imitar a resposta do ouvido humano, de modo a que o nível sonoro medido corresponda ao nível de som ouvido, ou seja com mais sensibilidade para sons cujas frequências se encontrem entre os 1.000Hz e os 4.000Hz. Um dos filtros mais utilizados nas avaliações de ruído é o *"A weighting filter"*, que apresenta os resultados em dB (A) ou dBA. Se para o estudo dos efeitos auditivos do ruído, a avaliação com o filtro dBA está adequada e é aceite pela comunidade científica, para as baixas frequências uma medição em dBA torna-se, para além de inexacta, insuficiente. Assim, um estudo aprofundado dos efeitos específicos do RBF, componente importante do ruído ambiental, sobre o corpo humano justifica uma avaliação mais rigorosa e específica para o RBF.

Não existem ambientes puros no que diz respeito a ruído. *"Annoyance"* – *incómodo* em tradução literal – tem sido sistematicamente associado ao ruído ambiental. Apesar de

limitado sob ponto de vista clínico, este conceito teve importância vital, na mudança de mentalidades relativamente ao ruído ambiental e suas consequências no Homem.

Os efeitos clínicos do RBF, no Homem, estão descritos, desde os anos 50. Sobre o ponto de vista anátomo-patológico talvez seja em Portugal que melhor se conhecem os efeitos do RBF sobre os tecidos biológicos. A fibrose dos tecidos e a proliferação das matrizes extracelulares, bem como as alterações dos epitélios na ausência de processos inflamatórios, e as alterações celulares de tipo degenerativo, são os elementos mais frequentemente descritos.

Este trabalho tem por objectivo a caracterização morfológica dos efeitos do RBF sobre a glândula parótida nos seguintes pontos: estudo microscópico e ultraestrutural das lesões resultantes da exposição ao RBF na glândula parótida; caracterização imunohistoquímica das lesões microscópicas com o tempo exposição ao RBF; avaliação de lesões vasculares sob ponto de vista macroscópico; avaliação morfométrica das lesões de fibrose ao longo do tempo de exposição ao RBF.

Utilizámos 80 ratos albinos (*Mus norvegicus albinus*), linhagem Wistar, divididos em 6 grupos:

gC	grupo de controlo, 15 animais, que se mantiveram em condições semelhantes aos restantes mas à parte, em silêncio, para efeitos de controlo;
-----------	---

os restantes grupos de animais estiveram expostos ao RBF continuamente, por períodos crescentes:

g1	grupo 1, 10 animais, 168h de exposição ao RBF (1 semana RBF);
g2	grupo 2, 10 animais, 504h de exposição ao RBF (3 semanas RBF);
g3	grupo 3, 10 animais, 840h de exposição ao RBF (5 semanas RBF);
g4	grupo 4, 10 animais, 1512h de exposição ao RBF (9 semanas RBF);
g5	grupo 5, 15 animais, 2184h de exposição ao RBF (13 semanas RBF).

Após remoção cirúrgica, uma das parótidas dos animais foi fixada em formol tamponado a 10%. Efectuámos, colorações com hematoxilina-eosina (HE), ácido periódico de Schiff (PAS) e tricrómico de Masson. Efectuámos, ainda, em glândulas de animais dos grupos gC e g5, imunomarcagem para os colagénios I, IV e V. A outra glândula foi fixada em gluteraldeído e preparada para observação em microscopia eletrónica de transmissão.

Procedemos ainda, em alguns animais, à injeção com contraste e após remoção das glândulas parótidas, que diafanizamos pela técnica de Spalteholz, estudamos a árvore vascular.

Para o estudo morfométrico procedemos a uma análise de variância com um factor ordinal para averiguar se o tempo de exposição ao RBF (horas de exposição) teria um efeito significativo sobre a variável dependente – área de tecido conjuntivo. Efectuamos, para esse efeito, medições, para um valor ordinal absoluto, ao perímetro de tecido conjuntivo perivásculo-ductal (TCPVD), para quantificação da fibrose. As medições foram efectuadas com um software de análise de imagem (OPTIMAS).

Pudemos constatar em microscopia óptica que o aspecto geral do parênquima glandular, apresentava, em todas as lâminas estudadas, marcadas alterações, com distorção da arquitectura e anarquia acinar. Verificamos sinais de necrose isolada das células e presença de alterações degenerativas vacuolares generalizadas, de forma e tamanho irregular. Os vacúolos reagiram negativamente para a coloração PAS. Não encontramos células inflamatórias no parênquima. Ainda no parênquima, observamos corpos acidófilos de contorno arredondado e imagens de fragmentação nuclear, sugestivas de fenómenos apoptóticos ou de degeneração oncocítica e ocasionalmente áreas em que o parênquima está em grande parte substituído por tecido conjuntivo hialinizado perilobular. No tecido conjuntivo observa-se intensa fibrose no tecido conjuntivo peri-vásculo-ductal (TCPVD). O tecido conjuntivo interlobular e principalmente o perilobular também apresenta marcada fibrose com hialinização. Encontramos alterações nos vasos sanguíneos que consistem em espessamento focal das paredes, marcadamente hialino, que, em alguns casos, invade o lume do vaso com formações do tipo trombótico.

Em microscopia electrónica de transmissão pudemos observar autofagia iniciada pela delimitação de área de citoplasma por membranas concêntricas e formação de corpos residuais escuros (cheios de pigmento, por vezes com lipofuscina, e com cristalóides); vacuolização com um incremento progressivo do número de grandes vesículas citoplasmáticas delimitadas por membrana que parece, nos tempos mais precoces, derivar de dilatação focal do retículo endoplásmico; esteatose, acumulação de gotas lipídicas citoplasmáticas que são raras nos grupos de controlo.

Na observação macroscópica observamos o que podemos supôr ser uma interrupção do fluxo de vasos, lesões de tipo obstrutivo que poderão corresponder à tradução macroscópica das claras lesões microscópicas que encontramos. Encontramos ainda

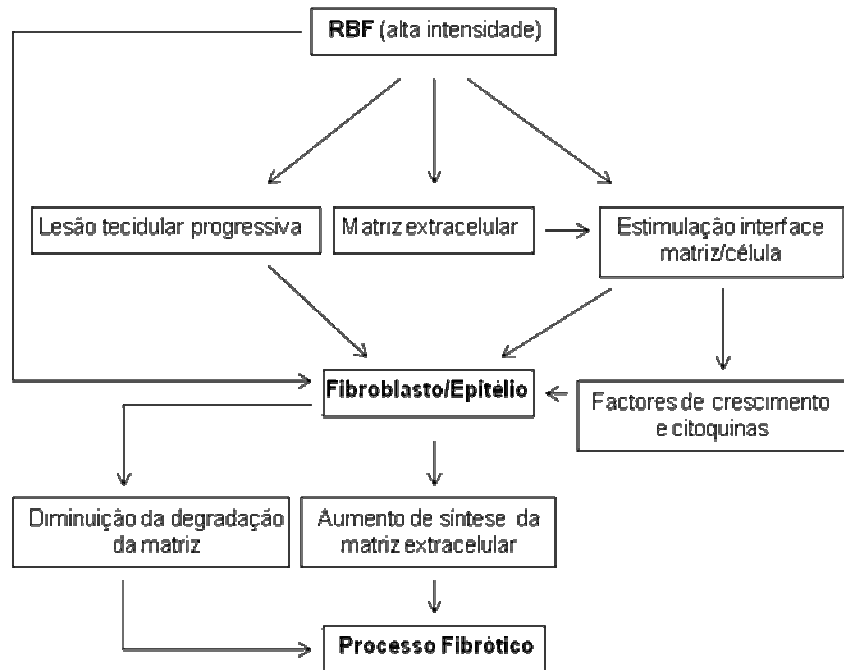
imagens de vasos que pensamos poderem ter reaberto em consequência da diminuição do fluxo, com obstrução a montante.

Na análise morfométrica pudémos verificar que as áreas de TCPVD apresentam uma variação crescente até ao g2, 3^a semana, diminuindo ligeiramente no grupo g3, 5^a semana, para voltarem a crescer até ao g5, 13 semanas. Verificou-se que o grupo gC, de controlo, possui diferenças significativas para os outros grupos, portanto o RBF produz lesões com efeitos significativos a partir da primeira semana de exposição. Pudémos também verificar diferenças significativas nos grupos expostos ao RBF, com excepção do g4, 9 semanas de exposição ao ruído, que só apresenta diferença significativa para o gC, grupo de controlo. O g5, 13 semanas de exposição ao RBF, é o que apresenta mais diferenças para os outros grupos expostos ao RBF, parecendo indicar uma tendência de maior aumento da área de TCPVD com a maior exposição ao RBF. Do grupo g2, 3^a semana de exposição ao RBF para o grupo g3, 5^a semana de exposição ao RBF, há uma estabilização na média das áreas de TCPVD ($p=1,000$). Os resultados demonstram que a tendência global das áreas de TCPVD é de aumento, e que a área média de TCPVD cresce linearmente e de forma significativa com o tempo de exposição ao RBF, com $p<0,001$.

No nosso estudo, pudémos comprovar um processo destrutivo do parênquima glandular, acompanhado de fibrose que aumenta linearmente com o tempo de exposição. Pensamos, à luz do que se conhece da relação RBF - stress, que este pode ter um papel não negligenciável na génese de algumas das alterações encontradas, p. e., na vacuolização. O nosso protocolo experimental expôs os animais a RBF de modo contínuo. Pomos assim a hipótese que o RBF possa ter tido uma acção como agente de stress mas limitada a um período inicial. Pudémos identificar ultraestruturalmente a presença de inclusões lipídicas no citoplasma das células secretoras. Esta e outras alterações ultraestruturais, como os grânulos de lipofuscina que também estão associados a processos de senescência celular, sugerem podermos estar perante um processo de carácter degenerativo da glândula parótida provocado pela acção do RBF. As células possuem uma organização morfo-funcional altamente desenvolvida que tem um papel vital na actividade metabólica normal e também na doença. Este aparelho celular forma um sistema de transdução químico-mecânico capaz de interpretar forças externas e de interferir nas vias de actividade intracelular. Assim, directamente, ou através da matriz extracelular, pensamos que possa existir uma acção negativa do RBF sobre as células, possivelmente através das vias de sinalização intracelular.

Encontrámos proliferação de tecido conjuntivo no estroma da glândula parótida. Através da análise morfométrica, pudémos comprovar, que a média das áreas de TCPVD avaliadas cresce linearmente e de forma significativa ($p < 0,001$) com o tempo de exposição ao RBF, com excepção do intervalo correspondente aos grupos g2 e g3, entre a 3ª e a 5ª semanas de exposição. Este fenómeno proliferativo é do tipo fibrótico. Os processos fisiopatológicos subjacentes à fibrose, nos vários órgãos, parecem ser semelhantes, o que tem importantes implicações para compreender globalmente o fenómeno. No caso da proliferação fibrótica, atribuída ao RBF, as descrições encontradas têm como denominador comum a ausência de sinais inflamatórios. Também no estudo da glândula parótida exposta ao RBF não indentificámos células do processo inflamatório. No nosso estudo pudémos verificar um aumento progressivo e significativo de colagénio I e V do grupo de controlo para os grupos expostos ao RBF. Sendo o colagénio I o maior componente da matriz extracelular e estando a proliferação da matriz extracelular associada à exposição crónica ao RBF podemos afirmar que este resultado era esperado, se não houve alteração estrutural do colagénio. Na glândula parótida, a produção maciça de colagénios poderá corresponder a um reforço estrutural com o objectivo de assimilar o stress vibratório anormal que seria conseguido à custa do aumento do TCPVD. O TCPVD acompanha as artérias, as veias e a árvore ductal e pensa-se que possa ter funções ao nível da estabilização mecânica do tecido glandular. O stress mecânico tem sido estudado como estímulo para a diferenciação celular e para a estimulação de células produtoras de componentes da matriz extracelular, nomeadamente colagénio. De algum modo o impacto mecânico causado pelo RBF ou pela vibração directa poderão ter pontos comuns, sob ponto de vista físico, com os que acontecem em algumas destas patologias em que estímulos mecânicos anormais são aplicados aos tecidos de forma cíclica. Assim, é provável que células estimuladas de diferentes formas possam ser activadas por mecanismos similares a nível molecular.

Na sequência do exposto, podemos apresentar o seguinte esquema como provável para o aparecimento da fibrose provocada pelo RBF:



Pudémos identificar proliferação endotelial nos vasos, com espessamento da parede e esboço de formações trombóticas que chegam em alguns casos a ocluir quase na totalidade o lume do vaso. As lesões são semelhantes às descritas na literatura, e associadas ao RBF, que se caracterizam por espessamento focal da íntima com ruptura da lâmina elástica interna e proliferação celular. Na glândula encontrámos colagénio IV localizado nas membranas basais de vasos e colectores. Este colagénio mantém-se estável na sua expressão com o tempo de exposição ao RBF. Pensamos que pode ocorrer arteriogénese nos vasos da glândula parótida exposta ao RBF. Utilizamos como suporte para esta suposição os vários exemplos, que documentámos, de lesões do tipo trombótico que protruem para o interior do vaso quase que obstruindo por completo o seu lume e a ausência de aumento de colagénio tipo IV. As lesões celulares no parênquima da glândula parótida exposta ao RBF são anteriores às lesões vasculares. As primeiras têm expressão a partir do primeiro grupo exposto ao RBF e as segundas são mais óbvias a partir do segundo grupo exposto ao RBF. É-nos difícil afirmar com convicção qual o contributo das lesões vasculares, que observámos no interstício da glândula, para as alterações encontradas na glândula parótida e atribuídas ao RBF. Acreditamos que, em virtude de ser um órgão muito vascularizado possa haver lugar a circulação lateral compensatória, e revascularização que corresponderia às imagens que observámos no estudo vascular macroscópico.

ABSTRACT

Noise is an important environmental issue, usually unwanted.

In the late 70s in Portugal, several symptoms in workers of the Oficinas Gerais de Material Aeronáutico drew the attention of doctors and investigators. After a great number of experiments it was accepted that non auditory effects of noise could not be neglected as noxious effects of the acoustic phenomena. The characterization of noisy environments in which these changes occurred allowed them to understand that the workers were exposed to high intensity low frequency noise (LFN). Further studies led to the definition of vibroacoustic disease, as the result of chronic exposure to acoustic environments rich in LFN.

Sound and noise are the same entity – an acoustic wave. Low frequency noise (LFN) frequencies go up to 500Hz. Low frequencies are frequently associated with vibration. In the case of LFN and its associated vibration we can speak of “*whole body exposure*”.

Most of the measuring noise equipments incorporate a weighting filter that reproduces the human hearing. The measurements correspond to the level of sound heard with higher sensitivity to frequencies from 1.000Hz to 4.000Hz. The “*A weighting filter*” is one of the most commonly used filters and its results are presented in dB (A) or dBA. In studies concerning hearing effects of noise an evaluation with the dBA filter is scientifically accepted. That does not happen in measurements of LFN to which dBA insufficient. Further studies made on the specific effects of LFN on the human body justify an accurate a specific evaluation for LFN.

There are no “pure” environments in what concerns noise. “Annoyance” has been associated to environmental noise. Despite its limited clinical importance this concept was vital in understanding environmental noise and its consequences.

LFN's clinical effects have been documented since the 50's. In pathology terms Portugal is one of the countries where LFN effects on biological tissues are best known. Some of the most frequently described lesions are fibrosis, proliferation of extracellular matrix, epithelial changes in the absence of inflammatory process and degenerative cellular changes.

The goal of our work was the morphological characterization of LFN effects on the parotid gland: microscopic and ultrastructural study of LFN exposure lesions on the parotid gland, macroscopic vascular lesions evaluation and the morphometric evaluation of fibrosis lesions related to time of exposure to LFN.

We used 80 Wistar rats (*Mus norvegicus albinus*) divided into 6 groups:

gC	Control group, 15 animals, kept in similar conditions as the others but in silence, for control purposes
-----------	--

the remaining groups were exposed to LFN continuously and for growing periods:

g1	group 1, 10 animals, 168h of exposition to LFN (1 week LFN);
g2	group 2, 10 animals, 504h of exposition to LFN (3 weeks LFN);
g3	group 3, 10 animals, 840h of exposition to LFN (5 weeks LFN);
g4	group 4, 10 animals, 1512h of exposition to LFN (9 weeks LFN);
g5	grupo 5, 15 animals, 2184h of exposition to LFN (13 weeks LFN).

After surgical removal, one of the parotid gland was fixated in formalin. Sections were stained with hematoxylin-eosin (HE), Periodic acid-Schiff (PAS) and Masson's trichrome. In some sections of groups gC and g5 was used an imunomarker for collagen I, IV and V. The other gland was fixated in glutaraldehyde and prepared for observation with transmission electron microscope (TEM).

In order to study the vascular tree we injected, in some animals, a contrast medium and diaphanized by the Spalteholz technic.

To proceed to the morphometric study we analysed the variance with an ordinal factor in order to evaluate whether the time of exposure (hours of exposure) would have a significant effect on the dependent variable – connective tissue area. We measured the perivascular-ductal connective tissue (PVDCT) to obtain an absolute ordinal value. This measurements were made with the support of an image analisis software (OPTIMAS).

With optic microscopy we observed several changes in the general aspect of the glandular parenchyma, marked alterations in the architecture and acinar anarchy. We observed signs of isolated necrosis and generalized degenerative vacuolar changes with irregular shape and size. Vacuoles were negative to PAS stain. We did not find inflammatory cells in the parenchyma. We also observed several round shaped acidophilic

bodies and nuclear fragmentation suggesting apoptosis or oncocytic degeneration in the parenchyma. We also found areas in which the parenchyma was replaced by perilobular hyalinized connective tissue. There was intense fibrosis of the PVDCT. Also interlobular connective tissue and mainly the perilobular presented fibrosis with hyalinization. We found changes in blood vessels such as focal thickening of walls, hyalinized and sometimes protruding into the lumen in thrombotic like lesions.

With transmission electron microscopy we were able to observe autophagy starting with surrounding of a cytoplasmic area by concentric membranes, dark residual bodies (full of pigment, lipofuscin or cristalloids) and vacuolization with an increasing number of cytoplasmic vesicles that appear to drift from the endoplasmic reticulum. We also found steatosis, an accumulation of cytoplasmic lipidic drops which were rare in control groups.

In macroscopical observation we found images of obstructive like lesions that might match the microscopic lesions found. We also found images of tortuous vessels that may have reopened following a flow reduction.

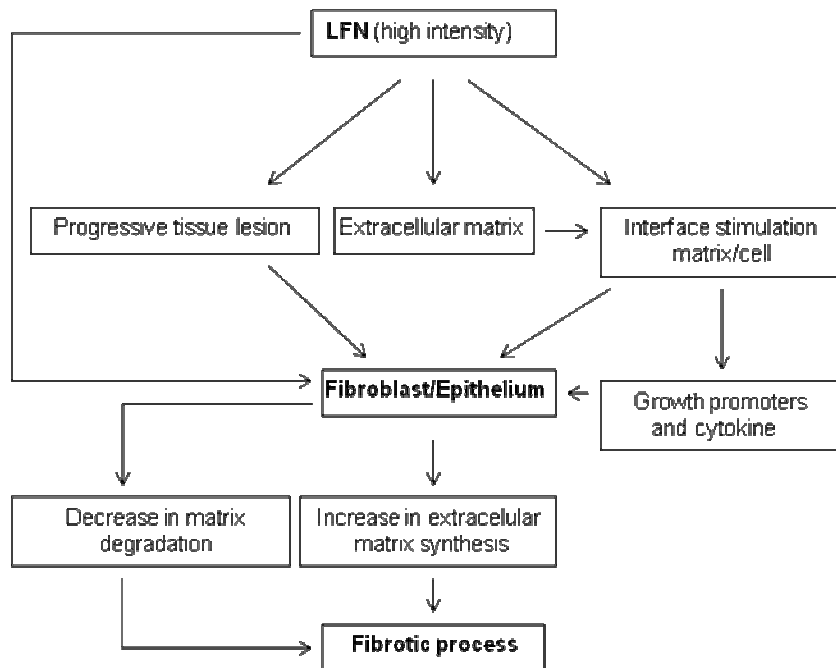
The morphometric analysis suggest that PVDCT areas increase until g2, 3rd week, those areas then decrease in group g3, 5th week to increase again until g5, 13th week. We also observed that our control group, gC presented significant differences when compared to the other groups therefore LFN causes lesions from the first week of exposition. Exposed groups also showed significant differences with an exception to g4, 9 weeks of exposure to LFN which only presents significant changes towards our control group. 13 weeks of exposure to LFN group, presents the most differences towards the other groups, what seems to indicate an increase of the perimeter of the PVDCT area with a growing time of exposure to LFN. Comparing groups g2, 3 weeks of exposure to LFN and g3, 5 weeks of exposure to LFN we can see that the average of the PVDCT area stabilizes ($p=1,000$). Our results show that the areas of PVDCT tend to increase and that the PVDCT areas average grows linearly with the time of exposure to LFN, with $p<0,001$.

In our study we were able to prove that the fibrotic destructive process of the glandular parenchyma increases linearly with time of exposure to LFN. Based on previous studies relating LFN with stress we believe that stress might have a non negligible role in the genesis of some of the changes we found, namely vacuolization. Our experimental protocol submitted the animals to LFN continuously. We cannot exclude the hypothesis that LFN might have acted as a stress agent even though for a limited period of time. We

identified ultra structural changes such as lipid inclusions in the cytoplasm of secretory cells and lipofuchsin granules which are generally associated to cellular senescence. These findings suggest that there may be a degenerative process of the parotid gland caused by exposure to LFN. Cells have a highly developed morphofunctional organization that plays a vital role in its metabolic activity as well as in sickness. This cellular apparatus forms a chemical-mechanical transduction system capable of interpreting external forces and interfering with intracellular activity. We believe that a negative action might act directly or through the extracellular matrix on these cells, possibly through intracellular signaling pathways.

We found connective tissue proliferation in the stroma of the parotid gland. With morphometric analysis we were able to verify that the average of the studied PVDCT areas studied increases linearly and significantly ($p < 0,001$) with the time of exposure to LFN. The one exception is interval correspondent to groups g2 and g3 between 3rd and 5th weeks of exposure to LFN. This is a fibrotic proliferative phenomena. The pathophysiology of fibrosis seems to be similar in different organs. This fact is very important in understanding these phenomena. Fibrotic proliferation caused by exposure to LFN has been described with a common denominator, absence of inflammatory process. In our study of the parotid gland we did not find inflammatory cells. We observed a progressive and significant increase of collagen I and V from the control group to all the other groups exposed to LFN. This result was not surprising as collagen I is the major component of extracellular matrix and extracellular matrix's proliferation is associated with chronic exposure to LFN. In the parotid gland this massive production of collagen might be understood as a structural strengthening to cope with an abnormal vibrational stress by increasing PVDCT. PVDCT surrounds arteries, veins and the ductal tree. It is thought to be a mechanical stabilizer in the glandular tissue. Mechanical stress has been studied as a stimulus to cell differentiation and stimulation of extracellular matrix synthesizing cells. In some ways the mechanical impact caused by LFN or direct vibration may have some common points in a physics point of view with what happens in several diseases caused by cyclic mechanical stimulus to tissues. It is likely that cells stimulated in different ways may be activated by similar molecular mechanisms.

As a result of the above, we present the following scheme as the most likely for the onset of fibrosis as a result of LFN.



In what concerns vascular lesions we were able to identify endothelial proliferation in vessels as well as thickening of the walls and thrombotic formations protruding into the lumen, that in some cases leads to occlusion of the vessel. Lesions are similar to the ones described as associated to LFN and are characterized by focal thickening of the intima with rupture of the internal elastic lamina and cellular proliferation. In the parotid gland vessels we found collagen IV in basal membrane of vessels and collectors. This collagen remains stable in its expression with time of exposure to LFN. We believe that arteriogenesis might occur in vessels in the parotid gland exposed to LFN. We supported our assumptions in the thrombotic like lesions observed in microscopy and the absence of increase of collagen IV.

When exposed to LFN, cellular lesions in the parotid gland parenchyma come prior to vascular lesions. Cellular lesions are expressed as early as the first exposed group. Vascular lesions are obvious from the second group on. We can not clearly say to which extent the vascular lesions contribute to the lesions found in the parotid gland.

As the parotid gland is a highly vascularized organ, we believe that compensatory lateral circulation is possible as well as revascularization which could correspond to our macroscopical vascular study images.

RÉSUMÉ

Le bruit est un important problème environnemental pour l'homme et, d'une façon générale, il est indésirable.

Au Portugal, à la fin des années 70, plusieurs symptômes ont attiré l'attention d'un groupe de médecins et chercheurs des «Oficinas Gerais de Material Aeronáutico». La réalisation de nombreuses études a renforcé la conviction selon laquelle les effets extra-auditifs du bruit constitueraient une partie non négligeable des effets nocifs des phénomènes acoustiques. La caractérisation des environnements sonores dans lesquelles avaient lieu ces altérations a permis la perception selon laquelle les individus seraient exposés à un bruit de basse fréquence (BBF) de haute densité. L'étude approfondie sur les différentes altérations vérifiées a abouti à la définition de la maladie vibro-acoustique, comme le résultat de l'exposition chronique à des environnements acoustiques riches en BBF.

Le son et le bruit sont, selon le point de vue physique, la même entité, une vague acoustique. Le bruit de basse fréquence (BBF) correspond à un spectre de fréquences qui s'étend jusqu'aux 500Hz. Le comportement physique des basses fréquences fait que celles-ci s'associent très souvent à des vibrations à travers des phénomènes de résonance. Dans le cas des vibrations provoquées par le bruit de basse fréquence à travers des phénomènes de résonance, la stimulation est appliquée sur toute la superficie corporelle («whole body exposure»)

La majorité des équipements utilisés pour l'évaluation du bruit environnemental incorpore des filtres de pondération qui cherchent à imiter la réponse de l'oreille humaine, de façon à ce que le niveau sonore mesuré corresponde au niveau de son écouté, c'est-à-dire avec plus de sensibilité pour les sons dont les fréquences se trouvent entre les 1.000Hz et les 4.000Hz. Un des filtres le plus utilisé dans les évaluations de bruit est le «A weighting filter» qui présente des résultats en dB (A) ou dBA. Si pour l'étude des effets auditifs du bruit, l'évaluation avec le filtre dBA est adéquate et acceptée par la communauté scientifique, pour les basses fréquences une médiation en dBA devient, non seulement inexacte mais aussi insuffisante. Ainsi, une étude approfondie des effets spécifiques du BBF, composante importante du bruit environnemental sur le corps humain, justifie une évaluation plus rigoureuse et spécifique pour le BBF.

Il n'existe pas des environnements purs en ce qui concerne le bruit. L' « annoyance » - niveau acoustique de gêne – a été systématiquement associé au bruit environnemental. Malgré qu'il soit limité du point de vue clinique, ce concept revêt une importance vitale dans le changement des mentalités liées au bruit environnemental et ses conséquences sur l'Homme.

Les effets cliniques du BBF, sur l'Homme, sont décrits depuis les années 50. Du point de vue anatomo-pathologique, c'est peut-être au Portugal qu'on connaît mieux les effets du BBF sur les tissus biologiques. La fibrose des tissus et la prolifération des matrices extracellulaires ainsi que les altérations des épithéliums en absence de processus inflammatoires et les altérations cellulaires de type dégénératif sont les éléments le plus fréquemment décrits.

Ce travail a pour objectif la caractérisation morphologique des effets du BBF sur la glandule parotide dans les points suivants: étude microscopique et ultra structurel des lésions dues à l'exposition au BBF sur la glandule parotide; caractérisation immuno-histochimique des lésions microscopiques avec la durée d'exposition au BBF; évaluation des lésions vasculaires du point de vue macroscopique; évaluation morfométrique des lésions de fibrose dans la durée d'exposition au BBF.

Nous avons effectué une expérience sur 80 rats albains (*Mus norvegicus albinus*), lignage Wistar, divisés en 6 groupes:

gC	Groupe de contrôle, 15 animaux, maintenus dans des conditions semblables aux autres mis à part, en silence, aux fins de contrôle.
-----------	---

Les autres groupes d'animaux ont été exposés au BBF en continu, durant des périodes croissantes:

g1	Groupe 1, 10 animaux, 168h d'exposition au BBF (1 semaine BBF) ;
g2	Groupe 2, 10 animaux, 504h d'exposition au BBF (3 semaines BBF) ;
g3	Groupe 3, 10 animaux, 840h d'exposition au BBF (5 semaines BBF) ;
g4	Groupe 4, 10 animaux, 1512h d'exposition au BBF(9 semaines BBF) ;
g5	Groupe 5, 15 animaux,2184h d'exposition au BBF (13semaines BBF) ;

Après excision chirurgicale, une des parotides des animaux a été fixée au formol tamponné à 10%. Nous avons effectué des colorations avec hématoxyline-éosine (HE) et acide périodique de Schiff (PAS). Nous avons effectué, aussi, sur les glandules d'animaux

des groupes gC et g5, l'immuno-marquage pour les collagènes I, IV e V. L'autre glandule a été fixée en glutéaldéide et préparée pour observation en microscopie électronique de transmission.

Nous avons aussi effectué, sur d'autres animaux, l'injection avec contraste et après excision des glandules parotides que nous avons diaphanéisé selon la technique de Spalteholz, nous avons étudié l'arbre vasculaire de la glandule.

Pour l'étude morpho métrique nous avons effectué une analyse de variance avec un facteur ordinal afin de vérifier si la durée d'exposition au BBF (heures d'exposition) avait un effet significatif sur la variante dépendante – la zone du tissu conjonctif. A cet effet, nous avons effectué des mesures, pour une valeur ordinale absolue, au périmètre du tissu conjonctif périvasculaire- ductal (TCPVD), afin de quantifier la fibrose. Les mesures ont été faites avec un software d'analyse d'image (OPTIMAS).

Nous avons pu constater en microscopie optique, que l'aspect général du parenchyme glandulaire présentait, dans toutes les lames étudiées, des altérations remarquables, avec distorsion de l'architecture et anarchie acinar. Nous avons constaté des signes de nécrose isolée des cellules et une présence d'altérations dégénératives vacuolaires généralisées, de forme et de taille irrégulières. Les vacuoles ont réagi négativement à la coloration PAS. Nous n'avons pas trouvé des cellules inflammatoires au parenchyme. Toujours au parenchyme nous avons observé des corps acidophiles avec des contours arrondis et des images de fragmentation nucléaire suggestives de phénomènes apoptotiques ou de dégénération oncocytaire et par endroits, des zones dans lesquelles le parenchyme est en grande partie remplacé par tissu conjonctif hyalinisé. Dans le tissu conjonctif on peut observer une fibrose intense au niveau du tissu conjonctif périvasculaire-ductal (TCPVD). Le tissu conjonctif inter lobulaire et principalement le péri lobulaire présente aussi une fibrose remarquable avec hyalinisation. Nous avons relevé des altérations importantes dans les vaisseaux sanguins caractérisées par un épaississement focal des murs, notamment hyalin, lequel, dans quelques cas, envahit le lumen du vaisseau avec des formations de type thrombotique. Nous avons aussi observé des aspects de tuméfaction et de prolifération endothéliale.

En microscopie électronique de transmission nous avons pu observer une autophagie initiée par la délimitation de la zone du cytoplasme par des membranes concentriques et la formation de corps résiduels foncés (plein de pigments, parfois avec lipofuscine et avec des cristoïdes); une vacuolisation avec une croissance progressive du nombre de

grandes vésicules cytoplasmiques délimitées par une membrane qui semble, pour le moment, dériver de la dilatation focale du réticule endoplasmique ; une stéatose, cumulation de gouttes lipidiques cytoplasmiques qui sont rares dans les groupes de contrôle.

Dans l'observation macroscopique nous avons remarqué ce que nous supposons être des lésions de type obstructif qui pourraient correspondre à la traduction macroscopique des lésions évidentes microscopiques que nous avons trouvées. Nous avons observé aussi des images de vaisseaux qui seraient dus, en conséquence à la diminution du flux, avec obstruction en amont.

Dans l'analyse morphométrique, nous avons remarqué que les zones de TCPVD présentent une variation croissante jusqu'au g2, 3^{ème} semaine, en légère baisse dans le groupe g3, 5^{ème} semaine, et en augmentation jusqu'au g5, 13 semaines. On a remarqué que le groupe gC de contrôle, possède des changements significatifs pour les autres groupes, donc, le BBF produit des lésions avec des effets significatifs à partir de la première semaine d'exposition. Nous avons pu également constater des différences significatives dans les groupes exposés au BBF, à l'exception du g4, 9 semaines d'exposition au bruit, qui ne présente qu'une différence significative pour le gC, groupe de contrôle. Le g5, 13 semaines d'exposition au BBF est celui qui présente le plus de différences par rapport aux autres groupes exposés au BBF, ce qui semble indiquer une tendance à une augmentation plus importante du périmètre de la zone de TCPVD avec une plus grande exposition au BBF. Du groupe g2, 3^{ème} semaine d'exposition au BBF pour le groupe g3, 5^{ème} semaine d'exposition au BBF, on peut vérifier une stabilisation dans la moyenne des zones de TCPVD ($p=1,000$). Les résultats démontrent que la tendance globale pour le périmètre des zones de TCPVD est en augmentation et que la zone moyenne de TCPVD augmente linéairement de façon significative avec la durée d'exposition au BBF, avec $p<0,001$.

Dans notre étude, nous avons pu prouver un processus destructif du parenchyme glandulaire, accompagné de fibrose en augmentation linéaire avec la durée d'exposition. Nous estimons, à la lumière de ce qu'on connaît de la relation BBF-stress, que celui-ci peut jouer un rôle non négligeable dans la genèse de certaines des altérations trouvées, par exemple, dans la vacuolisation. Notre protocole expérimental au cours duquel nous avons exposé les animaux au BBF d'une façon continue, a conduit à des phénomènes d'adaptation des mécanismes régulateurs neuroendocrines. Nous considérons ainsi

l'hypothèse selon laquelle le BBF aurait pu avoir une action en tant qu'agent de stress, mais limitée à une période initiale.

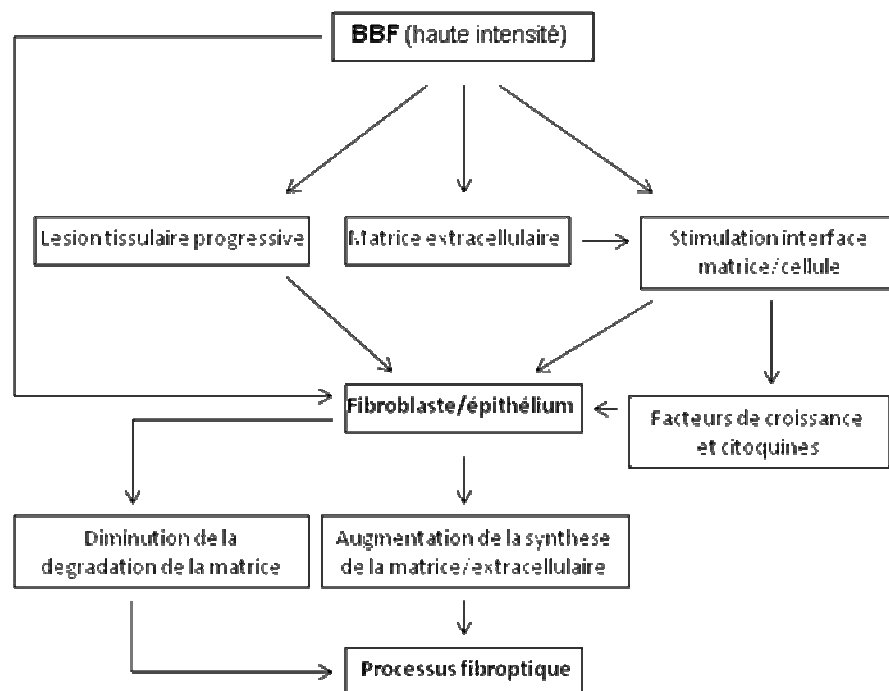
Nous avons pu identifier ultra structurellement la présence d'inclusions lipidiques dans le cytoplasme des cellules sécrétrices. Celles-ci ainsi que d'autres altérations ultra structurelles, comme les granulations de lipofuscine qui sont également associées à des processus de sénescence cellulaire, suggèrent que nous serions devant un processus de caractère dégénératif dans la glandule parotide provoqué par l'action du BBF.

Les cellules ont une organisation morpho-fonctionnelle hautement développée qui jouent un rôle vital dans l'activité métabolique normale et aussi dans la maladie. Cet appareil cellulaire forme un système de transduction chimique-mécanique capable d'interpréter des forces extérieures et d'interférer sur les voies d'activité intracellulaire. A cet effet, directement ou à travers la matrice extracellulaire, nous pensons qu'il peut exister une action négative du BBF, une stimulation mécanique sur les cellules, probablement à travers les voies de signalisation intracellulaire. Nous avons trouvé une prolifération du tissu conjonctif dans le stroma de la glandule parotide. A travers l'analyse morphométrique, nous avons constaté que la moyenne des zones de TCPVD évaluées, augmente linéairement et de façon significative ($p < 0,001$) avec la durée d'exposition au BBF, à l'exception de l'intervalle correspondant aux groupes g2 et g3, entre la 3^{ème} et la 5^{ème} semaines d'exposition. Ce phénomène prolifératif est du type fibroptique.

Les processus physiopathologiques sous-jacents à la fibrose, dans les différents organes, semblent similaires, d'où des implications importantes pour comprendre globalement le phénomène. Dans le cas de la prolifération fibroptique, attribuée au BBF, les descriptions trouvées ont pour dénominateur commun l'absence de signes inflammatoires. Aussi, dans l'étude de la glandule parotide exposée au BBF nous n'avons pas identifié la présence de cellules du processus inflammatoire. Dans notre étude nous avons observé une augmentation progressive et significative de collagène I et V du groupe de contrôle par rapport aux groupes exposés au BBF. Puisque le collagène I est la plus grande composante de la matrice extracellulaire et puisque la prolifération de la matrice extracellulaire est associée à l'exposition chronique du BBF, nous pouvons affirmer que ce résultat était attendu. Dans la glandule parotide la production massive de collagènes peut correspondre à un renforcement structurel avec l'objectif d'assimiler le stress vibratoire anormal qui serait fait aux dépens de l'augmentation du TCPVD. Le TCPVD accompagne les artères, les vaisseaux et l'arbre ductal et l'on croit qu'il pourrait avoir d'autres fonctions au niveau de la stabilisation mécanique du tissu glandulaire.

Le stress mécanique a été étudié comme stimulation pour la différenciation cellulaire et pour la stimulation de cellules productrices des composantes de la matrice extracellulaire, notamment le collagène. De toute façon, l'impact mécanique provoqué par le BBF ou par la vibration directe pourrait avoir des liens communs, du point de vue physique, comme on peut le vérifier dans certaines pathologies où des stimulations mécaniques anormales sont appliquées aux tissus de façon cyclique. Ainsi, il est probable que des cellules stimulées de différentes façons puissent être activées par des mécanismes similaires au niveau moléculaire.

Face à cet exposé, nous estimons pouvoir présenter le schéma suivant comme probable dans l'apparition de la fibrose provoquée par le BBF.



Nous avons identifié une prolifération endothéliale dans les vaisseaux, avec épaissement du mur et un ébauche de formations thrombotiques qui, dans certains cas, pourrait mener à l'occlusion presque totale du lumen du vaisseau. Les lésions sont semblables à celles décrites dans la littérature et associées au BBF, qui se caractérisent par l'épaississement focal de l'intima avec rupture de la lame élastique intérieure et la prolifération cellulaire. Dans les vaisseaux de la glandule parotide nous avons localisé du collagène IV localisé dans les membranes basales des vaisseaux et des collecteurs. Ce collagène se maintient stable dans son expression pendant la durée d'exposition au BBF. Nous estimons qu'il peut y avoir une artériogénèse dans les vaisseaux de la glandule

parotide exposée au BBF. Nous avons utilisé comme support pour aboutir à cette conclusion, les différents exemples, que nous avons exposé, de lésions de type thrombotique qui vont vers l'intérieur du vaisseau provoquant une quasi totale obstruction de son lumen et une absence d'augmentation du collagène type IV.

Les lésions cellulaires dans le parenchyme de la glandule parotide exposée au BBF sont antérieures aux lésions vasculaires. Les premières sont visibles à partir dans le premier groupe exposé au BBF et les deuxièmes sont plus évidentes à dans le deuxième groupe exposé au BBF. Il nous est difficile d'affirmer avec conviction comment lésions vasculaires que nous avons observé au niveau de l'interstice de la glandule ont contribué aux altérations observées dans la glandule parotide et attribuées au BBF.

Vu qu'il s'agit d'un organe très vascularisé, nous estimons qu'il pourrait exister une circulation latérale compensatoire et une revascularisation qui correspondent aux images observées dans l'étude vasculaire macroscopique.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel WN, Mason RM (2004) Connective tissue growth factor and renal diseases: some answers, more questions. *Curr Opin Nephrol Hypertens*; 13, 53–58.

Águas AP, Esaguy N, Grande NR, Castro AP, Castelo Branco NA (1999a) Effect of low frequency noise exposure on BALB/c mice splenic lymphocytes. *Aviat Space Environ Med*; 70 (3, Suppl): A128-31.

Águas AP, Esaguy N, Grande NR, Castro AP, Castelo Branco NA (1999b) Acceleration of lupus erythematosus-like processes by low frequency noise in the hybrid NZB/W mouse model. *Aviat Space Environ Med*; 70(3, Suppl): A132-6.

Águas AP, Grande NR, Carvalho E (1991) Inflammatory macrophages in the dog contain high amounts of intravesicular ferritin and are associated with pouches of connective tissue fibers. *Am J Anat*; Jan;190(1):89-96.

Albuquerque e Sousa J, Dinis da Gama A, Macedo M, Cássi I, Pimenta FM, Castelo Branco NAA (1991) Carotid angiodynographic studies in individuals with the whole-body vibration disease. *Rev Port Med Militar*; 39: 63-65.

Alekseev SV, Glinchikov VV, Usenko VR (1987) Reaction of liver cells to infrasound. *Noise Vibration Bull*; 131-132.

Alekseev SV, Glinchikov VV, Usenko VR (1986) Myocardial ischemia in rats exposed to infrasound. (abstract) *Gig Tr Prof Zabol*; (6): 30-33.

Altman GH, Horan RL, Martin I, Farhadi J, Stark PR, Volloch V, Richmond JC, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL (2002) Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB J*; Feb;16(2):270-2.

Altura BM, Altura BT, Gebrewold A, Ising H, Günther T (1992) Noise-induced hypertension and magnesium in rats: relationship to microcirculation and calcium. *J Appl Physiol*; Jan;72(1):194-202.

Alves-Pereira M, Castelo Branco NAA (2007) Vibroacoustic Disease: biological effects of infrasound an low frequency noise explained by mechanotransduction cellular signaling. *Prog Biophys Mol Biol*; Jan-Apr; 93(1-3):256-79.

Alves-Pereira, M Fragata J, Monteiro M, Silva DS, Castelo Branco NAA (2005) The pericardium in vibroacoustic disease III – a new structure. *Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration*.

Alves-Pereira M, Joanaz de Melo J, Marques MC, Castelo Branco NAA (2004) Vibroacoustic disease – the response of biological tissue to low frequency noise. *Proceedings of the Eleventh International Meeting on Low Frequency Noise and Vibration and its Control*; 295-308.

Alves-Pereira M (1999) Noise-induced extra-aural pathology: a review and commentary. *Aviat Space Environ Med*; 70: A7-A21.

Andrew W (1949) Age changes in the parotid glands of Wistar Institute rats with special reference to the occurrence of oncocytes in senility. *Am J Anat*; 85: 157-197.

Araújo A, Carranca J, Alves-Pereira M, Castelo Branco NAA (2005) Echocardiography in vibroacoustic disease. *Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration*.

Araújo A, Ribeiro CS, Correia MJF, Pais F, Castelo Branco NAA (1989) Echocardiographic appearances in patients with the Whole-Body Noise and Vibration Disease. *Medicef-Direct Information*; 2: 101-2

Babisch W, Beule B, Schust M, Kersten N, Ising H (2005) Traffic noise and risk of myocardial infarction. *Epidemiology*; Jan;16(1):33-40.

Babisch W (2000) Traffic noise and cardiovascular disease: epidemiological review and synthesis. *Noise & Health*; 2: 9-32.

Banderas JA, Gaitan LA, Portilla J, Aguirre A (1992) Effects of chronic etanol consumption on the rat parotid gland. *Arch Oral Biol*; 37: 69-72.

Barrett AM, Stockham MA (1963) The effect of housing conditions and simple experimental procedures upon the corticosterone level in the plasma of rats. *J Endocrinol*; Mar; 26:97-105.

Batanov GV (1995) Characteristics of etiology of immediate hypersensitivity in conditions of exposure to infrasound. (abstract) *Radiats Biol Radioecol*; Jan-Feb 35 (1): 78-82.

Bento Coelho JL, Ferreira A, Serrano J, Castelo Branco NAA (1999) Noise assessment during aircraft run-up procedures *Aviat Space Environ Med*; 70: A22-A26.

Bento Coelho JL, Ferreira A, Serrano J (1994) Noise exposure in the aeronautical industry. Yokohama, Japan: Inter-Noise, 741-5.

Berglund B, Lindvall T, Schwela DH Goh KT (2000) Guidelines for Community Noise. WHO.

Berglund B, Lindvall T, Schwela DH (1999) Guidelines for Community Noise. WHO – chapter 4.

Berglund B, Nilsson ME (1997) Empirical issues concerning annoyance models for combined community noise. *Inter Noise*; vol 2; 1053-58.

Berglund B, Lindvall T (1995) Community Noise. Document prepared for the World Health Organization. Archives of the center for sensory research (WHO); 2: 1-195.

Bergmann CE, Hoefler IE, Meder B, Roth H, van Royen N, Breit SM, Jost MM, Aharinejad S, Hartmann S, Buschmann IR (2006) Arteriogenesis depends on circulating monocytes and macrophage accumulation and is severely depressed in op/op mice. *J Leukoc Biol*; Jul;80(1):59-65.

Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ (2004) Anatomia, Embriologia e Histologia Bucal. Artmed, 3ª edição.

Borredon P, Nathi J (1973) Physiological reactions of human subjects exposed to infrasounds. *Rev Med Aeronaut Spat*; 12(46): 276-279.

Bourgier C, Haydont V, Milliat F, François A, Holler V, Lasser P, Bourhis J, Mathé D, Vozenin-Brotans MC (2005) Inhibition of Rho kinase modulates radiation induced fibrogenic phenotype in intestinal smooth muscle cells through alteration of the cytoskeleton and connective tissue growth factor expression. *Gut*; Mar, 54(3): 336-43.

Bovenzi M, Griffin MJ, Ruffell CM (1995) Vascular responses to acute vibration in the fingers of normal subjects. *Centr Eur J Pub Health*; 3: 15-18.

Bradley JS (1994) On dose response curves of annoyance to aircraft noise. *Inter Noise*; vol 1; 235-38.

Broner N (1978) The effects of low frequency noise on people – a review. *J Sound Vib*; 58(4):483-500.

Brown JE, Thompson RN, Folk ED (1975) Certain non-auditory physiological responses to noise. *Am Ind Hyg Assoc J*; 36:285-91.

Brunk, U, Ericsson JLE (1972) Electron microscopic studies on rat brain neurons. Localization of acid phosphatase and mode of formation of lipofuscin bodies. *J Ultrastruct Res*; 38:1-15.

Burt T (1996) Sick building syndrome. The acoustic environment. Proceedings of the 7th International Conference on Indoor Air Quality and Climate - Nagoya, Japan; vol 1, 1025-1030.

Carda C, Gomez DE, Ferraris ME, Arriaga A, Carranza M, Peydró A (2004) Sialosis parotídea alcohólica: estudio estructural y ultraestructural. *Med Oral*; 9:24-32.

Carlson OG, Zackrisson K (1977) Marginal alveolar bone loss in flying personnel: a radiographical followup study. *Aviat Space Environ Med*; Sep;48(9):805-7.

Carmeliet P (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*; Jun;9(6):653-60.

Castelo Branco NAA, Monteiro E, Costa e Silva A, Martins dos Santos J, Reis Ferreira JM, Alves-Pereira M (2004a) O parênquima pulmonar do rato wistar exposto a ruído de baixa frequência. *Rev Port Pneumol*; 10: 77-85.

Castelo Branco NAA, Alves-Pereira M (2004b) Vibroacoustic Disease. *Noise & Health*; 6(23): 3-20.

Castelo Branco NAA, Alves-Pereira M, Martins dos Santos J, Monteiro E (2003a). SEM and TEM study of rat respiratory epithelia exposed to low frequency noise. in: Mendez Vilas A (Ed). Science and Technology Education In Microscopy: An Overview. Formatex, Badajoz, Spain. Vol.II: 505-533.

Castelo Branco NAA, Monteiro E, Costa e Silva A, Reis Ferreira J, Alves-Pereira M (2003b) Respiratory epithelia in Wistar rats. *Rev Port Pneumol*; IX-5: 381-388.

Castelo Branco NAA, Águas AP, Sousa Pereira A, Monteiro E, Fragata FIG, Tavares F, Grande NR (1999a) The Human Pericardium In Vibroacoustic Disease. *Aviat Space Environ Med*; 70: A54-A62 .

Castelo Branco NAA, Rodriguez E, Alves-Pereira M, Jones DR. (1999b) Vibroacoustic Disease: some forensic aspects. *Aviat Space Environ Med*; 70: A145-A151.

Castelo Branco NAA (1999c) A unique case of vibroacoustic disease. A tribute to an extraordinary patient. *Aviat Space Environ Med*; 70: A27-A31.

Castelo Branco NAA (1999d) The clinical stages vibroacoustic disease. *Aviat Space Environ Med*; 70: A32-A39.

Castelo Branco NAA (1999e) The Vibroacoustic Disease – an emerging pathology. *Aviat Space Environ Med*; 70: A1-A6.

Castelo Branco NAA, Entrudo A, Manaças JE, Martinho Pimenta AJF, Marvão JH, Santinho Martins A (1984a) Epilepsia sintomática de etiologia vascular, manifestação da síndrome das vibrações. *Rev Port Med Mil*; 32(1):5-9.

Castelo Branco NAA, Entrudo A, Marvão JH, (1984b) As vibrações e o ruído na origem da hipo e da hipersensibilidade acústicas numa população fabril. *Rev Port Med Mil*; 32(1):17-20.

Castro AP, Águas AP, Grande NR, Monteiro E, Castelo Branco NA (1999) Increase in CD8+ and CD4+ T lymphocytes in patients with vibroacoustic disease. *Aviat Space Environ Med*; Mar;70(3 Pt 2):A141-4.

Chaqour B, Goppelt-Struebe M (2006) Mechanical Regulation of the Cyr61/Ccn1 and Ctgf/Ccn2 proteins. *FEBS J*; Aug; 273(16): 3639-49.

Cheyne VD (1939) A description of the salivary glands of the rat and a procedure for their extirpation. *J Dent Res*; 18(5): 457-468,

Coelho Leal S; de Toledo OA; Barreto Bezerra AC. (2003) Morphological alterations of the parotid gland of rats maintained on a liquid diet. *Bra Dent J*; 14:172-176

Cohen A (1976) The influence of a company hearing conservation program on extra-auditory problems in workers. *Journal of Safety Research*; 8: 146-62.

Coppes RP, Zeilstra LJW, Kampinga HH, Konings AWT (2001) Early to late spare of radiation damage to the parotid gland by adrenergic and muscarinic receptor agonists. *Brit J Cancer*, 85: 1055-1063.

Cortez-Pimentel JAB, Castelo Branco NAA (1988) As vibrações e a estrutura dento-alveolar. *Rev Port Med Militar*; 36(2-3): 123-127.

Crespo F, Ferreira ACN, Castelo Branco MSNNA, Castelo Branco NAA (1988) Doença sistémica das vibrações. Estudo da coagulação e hemostase em doentes com a DSV. *Rev Port Med Militar*; 36(2-3): 86-89.

Cruz Maurício J, Martinho Pimenta AJF, Castelo Branco NAA (1988) Imagens do SNC pela ressonância magnética. *Rev Port Med Militar*; 36(2-3): 90-96.

Danielsson A, Landstrom U (1985) Blood pressure changes in man during infrasonic exposure. An experimental study. *Acta Med Scand*; 217(5): 531-535.

Dardick I (1998) Mounting evidence against current histogenetic concepts for salivary gland tumorigenesis. *Eur J Morphol*; Aug;36 suppl:257-61.

Davies HW, Teschke K, Kennedy SM, Hodgson MR, Hertzman C, Demers PA (2005) Occupational exposure to noise and mortality from acute myocardial infarction. *Epidemiology*; Jan;16(1):25-32.

Davis H, Morgan CT, Hawkins JE Jr, Galambos R, Smith FW (1950) Temporary deafness following exposure to loud tones and noise. *Acta Otolaryngol*; suppl. 88:1-56; citado por: de Almeida SIC, Albernaz PLM, Zaia PA, Xavier OG, Karazawa EHI (2000) Natural history of noise induced hearing loss. *Rev. Assoc. Med. Bras*; vol. 46(2), pp. 143-158.

Denny PC, Ball WD, Redman RS (1997) Salivary glands: a paradigm for diversity of gland development. *Crit Rev Oral Biol Med*; 8(1):51-75.

Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK (2005) Health benefits of saliva: a review. *J Dent*; Mar;33(3):223-33.

Domon M, Kurabayashi T, Shiga Y (1988) Sialographic images of pathological changes in the mouse parotid gland. *J Dent Res* 67(1):37-43.

Edgar WM (1992) Saliva: its secretion composition and functions. *Brit Dent J*; 172: 305-12.

Faustino SES, Stipp ACM (2003) Effects of chronic alcoholism and alcoholic detoxication on the rat sub mandibular gland, a morphometric study. *J Appl Oral Sci*; 11: 21-26.

Fidell S, Barber, DS, Schultz TJ (1991) Updating a dosage-effect relationship for the prevalence of annoyance due to general transportation noise. *Journal of the acoustical society of America*; 89: 221-233.

Fields JM, de Jong RG, Brown AL, Flindell IH, Gjestland T, Job RFS, Kurra S, Lercher P, Schuemer-Kors A, Vallet M, Yano M (1997) Guidelines for reporting core information from community noise reaction surveys. *Journal of sound and vibration*; 206: 685-695.

da Fonseca J, Martins dos Santos J, Castelo Branco N, Alves-Pereira M, Grande NR, Oliveira P (2006a) Noise-Induced Duodenal Lesions. *Eur J Anat*; 9: 29-33.

da Fonseca J, dos Santos JM, Branco NC, Alves-Pereira M, Grande NR, Oliveira P, Martins AP (2006b) Noise-induced gastric lesions: a light and scanning electron microscopy study of the alterations of the rat gastric mucosa induced by low frequency noise. *Cent Eur J Public Health*; Mar;14(1):35-8.

da Fonseca (2006c) Alterações morfológicas da estômago e do duodeno expostos ao ruído de baixa frequência. Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Ciências Médicas, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar – Universidade do Porto.

da Fonseca J, Mirones J, Martins dos Santos J, Oliveira P, Alves-Pereira M, Castelo Branco NAA (2005) Gastrointestinal problems in vibroacoustic disease. Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration.

de Freitas V, da Silva Porto P, Assunção M, Cadete-Leite A, Andrade JP, Paula-Barbosa MM (2004) Alcohol flavonoids from grape seeds prevent increased alcohol-induced neuronal lipofuscin formation *Alcohol*; Jul-Aug;39(4):303-11.

Friedrich RE, Bartel-Friedrich S, Röser K, Lautenschläger C (2003) The expression pattern of collagen I in irradiated mandibular salivary glands of rats. *Anticancer Res*. Mar-Apr;23(2A):927-30.

Friedrich RE, Bartel-Friedrich S, Holzhausen HJ, Lautenschläger C (2002) The effect of external fractionated irradiation on the distribution pattern of extracellular matrix proteins in submandibular salivary glands of the rat. *J Craniomaxillofac Surg*. Aug;30(4):246-54.

Gazda MJ, Schultheiss TE, Stephens LC, Ang KK, Peters LJ (1992) The relationship between apoptosis and atrophy in the irradiated lacrimal gland. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 1992;24(4):693-7.

Ghosh AK (2002) Factors involved in the regulation of type I collagen gene expression: implication in fibrosis. *Exp Biol Med*; May;227(5):301-14.

Gimbrone MA, Jr, Anderson KR, Topper JN, Langille BL, Clowes AW, Berce S, Davies MG, Stenmark KR, Frid MG, Weiser-Evans MC, Aldashev AA, Nemenoff RA, Majesky MW, Landerholm TE, Lu J, Ito WD, Arras M, Scholz D, Imhof B, Aurrand-Lions M, Schaper W, Nagel TE, Resnick N, Dewey CF, Davies PF (1999) Special communication the critical role of mechanical forces in blood vessel development, physiology and pathology. *J Vasc Surg*; 29:1104–1151.

Gomes LMP, Pimenta AJFM, Castelo Branco NAA (1999) Effects of occupational exposure to low frequency noise on cognition. *Aviat Space Environ Med*; 70 (3, suppl): A115-A118.

Gordelaze AS, Glinchikov VV, Usenko VR (1986) Experimental myocardial ischemia caused by infrasound. (abstract) *Gig. Tr. Prof. Zabol*; (6):30-33.

Grande NR, Águas AP, Sousa Pereira A, Monteiro E, Castelo Branco NAA (1999) Morphological changes in the rat lung parenchyma exposed to low frequency noise. *Aviat Space Environ Med*; 70 (3, suppl): A70-A77.

Grande NR, Castelo Branco NAA, Oliveira P, Zagalo C, Martins dos Santos J (2001) Lymphatic lesions and vibroacoustic disease. *Eur J Lymphol*; 9: 20.

Gray H, Williams PI, Warwick R, Dyson M, Bannister LH (1995) *Gray Anatomy*., Guanabara-Koogan, 37ª edição.

Griefahn, B., Deppe, C., Mehnert, P., Moog, R., Mohler, U, Schuemer, R (1998) What night times are adequate to prevent noise effects on sleep? *Noise as a Public Health Problem - Noise Effects*; Vol. 2, pp. 445-450.

Grinnell F (2003) Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol*; 13, 264–269.

Guski R., Schuemer R., Felscher-Suhr U (1999) The concept of noise annoyance: how international experts see it. *J. Sound Vibr*; 223: 516-527.

Habermann, J (1890) Ueber Die Schwerhörigkeit Der Kesselschmiede. *Archiv Für Ohrenheilkunde*, 30:1-25; citado por: de Almeida SIC, Albernaz PLM, Zaia PA, Xavier OG,

Karazawa EHI (2000) Natural history of noise induced hearing loss. *Rev. Assoc. Med. Bras*; vol. 46(2), pp. 143-158.

Hand AR, Ho B (1981) Liquid-diet-induced alterations of rat parotid acinar cells studied by electron microscopy and enzyme cytochemistry. *Archs Oral Biol*; 26:369-380.

Hall HD, Scheneyr CA (1964) Salivary gland atrophy in rat induced by liquid diet. *Proc Soc Exp Biol Med*; 117:789-793.

Hall FL, Taylor SM, Birnie SE (1985) Activity interference and noise annoyance. *Journal of Sound and Vibration*; 103: 237-252.

Haskell BS (1975) Association of aircraft noise stress to periodontal disease in aircrew members. *Aviat Space Environ Med*; Aug;46(8):1041-3.

Helisch A, Schaper W (2003) Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries. *Microcirculation*;10:83–97.

Helmke BP, Thakker DB, Goldman RD, Davies PF (2001) Spatiotemporal analysis of flow-induced intermediate filament displacement in living endothelial cells. *Biophys J*; 80: 184–194.

Hill MA, Davis MJ, Meininger GA, Potocnik SJ, Murphy TV (2006) Arteriolar myogenic signaling mechanisms: implications for local vascular function. *Clin Hemorheol Microcirc*; 34, 67–79

Hosoyamada Y, Sakai T (2003) The ultrastructure of periductal connective tissue and distinctive populations of collagen fibrils associated with ductal epithelia of exocrine glands. *Arch Histol Cytol*; Dec; 66(5):407-18.

Hosoyamada Y, Kurihara H, Sakai T (2000) Ultrastructural localisation and size distribution of collagen fibrils in Glisson's sheath of rat liver: implications for mechanical environment and possible producing cells. *J Anat*; Apr;196 (Pt 3):327-40.

Huang H, Kamm RD, Lee RT (2004) Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology. *Am J Physiol Cell Physiol*; Jul;287(1):C1-11.

Humphrey SP, Williamson RT. (2001). A review of saliva: normal composition, flow and function. *J Prosthet Dent*; 85:162-9.

Imamura Y, Morishita T, Kawakami M, Tsuda G, Fukuda M (2004) Sclerosing polycystic adenosis of the left parotid gland: report of a case with fine needle aspiration cytology. *Acta Cytol*; Jul-Aug;48(4):569-73.

Inaba R, Furuno T, Okada A. (1988) Effects of low- and high-frequency local vibration on the occurrence of intimal thickening of the peripheral arteries of rats. *Scand J Work Environ Health*; 14(5): 312-6.

Ingber DE (2004) The mechanochemical basis of cell and tissue regulation. *Mech Chem Biosyst*. Mar;1(1):53-68.

Ingber DE (2003a) Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *J Cell Sci*; Apr 15;116(Pt 8):1397-408.

Ingber DE (2003b) Mechanobiology and diseases of mechanotransduction. *Ann Med*; 35(8):564-77.

Ingber DE (2002) Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. *Circ Res*; 91, 877–887.

Inukai Y, Nakamura N, Taya H (2000) Unpleasantness and acceptable limits of low frequency noise. *Jnl Low Freq Noise Vibn*. 19 (3), 135-140.

Ising H, Lange-Asschenfeldt H, Moriske HJ, Born J, Eilts M (2004) Low frequency noise and stress: bronchitis and cortisol in children exposed chronically to traffic noise and exhaust fumes. *Noise Health*; Apr-Jun;6(23):21-8.

Ising H, Ising M (2002) Chronic cortisol increases in the first half of the night caused by road traffic noise. *Noise & Health*; 4 (16) 13-21.

Ising H (1981) Interaction of noise-induced stress and Mg decrease. *Artery*; 9(3):205-11.

Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD (1997) The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J*; May; 11(6):457-65.

Jakobsson L, Kreuger J, Claesson-Welsh L (2007) Building blood vessels-stem cell models in vascular biology. *J Cell Biol*; Jun 4;177(5):751-5.

Janhunen, HK (1984) Infrasound at working places in Finland. In: Combined effects of occupational exposures. Proceedings of the Fourth Finnish-Soviet Joint Symposium. Institute of Occupational Health, Helsinki, Finland. pp. 134-139.

Janmey PA, Weitz DA (2004) Dealing with mechanics: mechanisms of force transduction in cells. *Trends Biochem Sci*; 29, 364–370.

Job RFS (1993) Psychological factors of community reaction to noise. M. Vallet (Ed.) Noise as a public health problem, Vol. 3, Pp. 48-59.

Jones MT, Gillham B (1988) Factors involved in the regulation of adrenocorticotrophic hormone/beta-lipotrophic. *Physiol. Rev*; 68: 743-818.

Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP (2007) Collagens at a glance. *J Cell Sci*; Jun 15;120(pt 12):1955-8.

Kant GJ, Leu JR, Anderson SM, Mougey EH (1987) Effects of chronic stress on plasma corticosterone, ACTH and prolactin. *Physiol Behav*; 40(6):775-9.

Karpova NI, Alekseev SV, Erokhin VN, Kadyskina EN, Reutov OV (1970) Early response of the organism to low-frequency acoustic oscillations. *Noise Vib Bull*; 11(65): 100-103.

Kassan SS, Moutsopoulos HM (2004) Clinical manifestations and early diagnosis of Sjögren syndrome. *Arch Intern Med*; Jun 28;164(12):1275-84.

Katchburian E, Arana V (2004) Histologia e Embriologia Oral. Guanabara Koogan, 2ª edição.

Kim SK (1984) Changes in the secretory acinar cells of the rat parotid gland during aging. *The Anat Rec*; 209:345-354.

Kisseleva T, Brenner DA (2008) Mechanisms of fibrogenesis. *Exp Biol Med*; Feb;233(2):109-22.

Koelega HS (1987) (Ed.) Elsevier; Environmental annoyance: characterization, measurement, and control.

Krinke, GJ (2000) The handbook of experimental animals. The laboratory rat. Academic Press.

Krivolesova SA., Svidovyi VI, Lobov GI, Dadali VA (2001) Effects of infrasound and noise on contractility of lymphatic vessels (an experimental study). (abstract) *Med. Trud. Prom. Ekol*; (2):16-20.

Kui-Cheng Z, Makoto A (2007) Modulations of immune functions and oxidative status induced by noise stress. *Journal of occupational health*; vol. 49 (2007) , No. 1 32-38

Lafrenie RM, Yamada KM (1998) Integrins and matrix molecules in salivary gland cell adhesion, signaling, and gene expression. *Annals of the New York academy of sciences*; 842:42-48

Larsen, B (1946) Investigations on noise in certain factories. *Acta Otolaryngol*; 34:71-77.

Lazowski KW, Mertz PM, Redman RS, Kousvelari E (1994) Temporal and spatial expression of laminin, collagen types IV and I and alpha 6/beta 1 integrin receptor in the developing rat parotid gland. *Differentiation*; Apr;56 (1-2):75-82.

Leventhall HG (2004) Low frequency noise and annoyance. *Noise & Health*; 6(23): 59-72.

Lidstrom IM (1978) The effects of ultrasounds on humans. (abstract) Invest. Rep. (Umea University, Sweden) 33:1-42.

Lindvall T, Radford EP (1973) Measurement of annoyance due to exposure to environmental factors. *Environ Res*; 6:1-36.

Llena-Puy C (2006) The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*; Aug;11(5): e449-55.

Loreti A, Sturla M, Gentileschi S, Bracaglia R, Prat Y, Fadda G, Farallo E (2002) Diffuse hyperplastic oncocytosis of the parotid gland. *Br J Plast Surg*; Mar;55(2):151-2.

Maier H, Mayer B, Adler D, Mall G, Born IA (1990) Lipomatous atrophy of the parotid gland in chronic alcohol consumption. *Laryngorhinootologie*; 69:600-4.

Malek AM Izumo S (1995) Control of endothelial cell gene expression by flow. *J Biomech* 28: 1515–1528.

Mandel ID (1989). The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *J Am Dent Assoc*; 119:298-304.

Marciniak W, Rodriguez E, Olszowska K, Atkov O, Botvin I, Araujo A, Pais F, Soares Ribeiro C, Bordalo A, Loureiro J, Prazeres De Sá E, Ferreira D, Castelo Branco MS, Castelo Branco NA (1999) Echocardiographic evaluation in 485 aeronautical workers exposed to different noise environments. *Aviat Space Environ Med*; Mar;70(3 Pt 2):A46-53.

Martinho Pimenta AJF, Castelo Branco MSNA, Castelo Branco NAA (1999a) The palmo-mental reflex in vibroacoustic disease. *Aviat Space Environ Med*; 70 (3, Suppl), A100-6.

Martinho Pimenta AJF, Castelo Branco MSNA, Castelo Branco NAA (1999b) Balance disturbances in individuals with vibroacoustic disease. *Aviat Space Environ Med*; 70 (3, Suppl), A96-9.

Martinho Pimenta AJF, Castelo Branco NAA (1999c) Neurological aspects of vibroacoustic disease. *Aviat Space Environ Med*; 70 (3, Suppl), A91-5.

Martinho Pimenta AJF, Castelo Branco NAA (1999d) Facial dyskinesia induced by auditory stimulation. A report of four cases. *Aviat Space Environ Med*; 70 (3, Suppl), A119-21.

Martinho Pimenta AJF, Castelo Branco NAA, Manaças JE (1988) Doença Sistémica das vibrações ii: elementos clínicos. *Rev Port Med Mil*; 1988; 36: 72-85.

Martins dos Santos J, Albuquerque e Sousa J, Marques MC, Monteiro E, Alves-Pereira M, Castelo Branco NAA (2005) Urinary system in vibroacoustic disease – current findings and ongoing studies. Proceedings Twelfth International Congress on Sound and Vibration.

Martins dos Santos J, Grande NR, Castelo Branco NAA, Zagalo C, Oliveira P, Alves-Pereira M (2004) Lymphatic lesions and vibroacoustic disease. *Eur J Lymphol*; 12: 17-20.

Martins dos Santos J, Grande NR, Castelo Branco NAA, Zagalo C, Oliveira P (2002) Vascular lesions and vibroacoustic disease. *Eur J Anat*; 6: 17-21.

Mbassa G, Elger M, Kriz W (1988) The ultrastructural organization of the basement membrane of Bowman's capsule in the rat renal corpuscle. *Cell Tissue Res*; Jul;253(1):151-63.

Mendes J, Martins dos Santos J, Oliveira P, Castelo Branco NAA (2007) Low frequency noise effects on the periodontium of the wistar rat – a light microscopy study. *Eur J Anat*; 11 (1): 27-30.

Miedema, HME, Vos, H (1998) Exposure-response relationships for transportation noise. *J. Acoust. Soc. Am*; 104: 3432-3445.

Minami M, Tanioka H, Oyama K, Itai Y, Eguchi M, Yoshikawa K, Murakami T, Sasaki Y (1993) Warthin tumor of the parotid gland: MR-pathologic correlation. *Am J Neuroradiol*; Jan-Feb;14(1):209-14.

Miner JH, Yurchenco PD (2004) Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 20:255–84.

Mohr GC, Cole Guild E, Gierke HE (1965) Effects of low frequency and infrasonic noise on man. *Aerosp Med*; 36(9): 817-824.

Moller H (1987) Annoyance of audible infrasound. *Jnl Low Freq Noise Vbn*; 6, 1-17.

Moniz Botelho J, Martinho Pimenta AJF, Castelo Branco NAA (1988) TEC e P300 na DSV. *Rev Port Med Militar*; 36(2-3): 97-115.

Montalvão Silva J, Castelo Branco NAA (1988) Alguns elementos sobre a física das vibrações. *Rev Port Med Militar* 36 (2-3): 134 – 142.

Monteiro M, Reis Ferreira J, Mendes CP, Serrano I, Tavares F, Alves-Pereira M, Castelo Branco NAA (2005) Respiratory pathology in vibroacoustic disease II – specific morphological changes. Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration.

Mourouzis C, Saranteas T, Tsamouris M, Tesseromatis C (2003) Morphological changes of parotid glands following adjuvant arthritis and ibuprofen treatment in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*; Feb;32(1):69-73.

Mukunyadzi P, Bardales RH, Palmer HE, Stanley MW (2000) Tissue effects of salivary gland fine-needle aspiration. Does this procedure preclude accurate histologic diagnosis? *Am J Clin Pathol*; Nov;114(5):741-5.

Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB, Sheppard D (1999) The integrin $\alpha V\beta 6$ binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell*; Feb 5;96(3):319-28.

Nakamura N, Inukai Y (1998) Proposal of models which indicate unpleasantness of low frequency noise using exploratory factor analysis and structural covariance analysis. *Jnl Low Freq Vibn.* 17, 127-132.

Nakamura H, Katoh A, Nohara S, Nakamura H, Okada A (1992) Experimental studies on the pathogenesis of the gastric mucosal lesions induced by whole-body vibration. *Environ Res*; 58: 220-229.

Naruse K, Miyauchi A, Itoman M, Mikuni-Takagaki Y (2003) Distinct anabolic response of osteoblast to low-intensity pulsed ultrasound. *J Bone Miner Res*; Feb;18(2):360-9.

Nekorosshev AS, Glinchinov VV (1991) Morphofunctional changes in the myocardium under exposure to infrasound. (abstract) *Gig Sanit*; 12:56-58.

Nishimura K (1988). The effects of infrasound on pituitary adrenocortical response and gastric microcirculation in rats. *J Low Freq Noise Vib*; 7(1):20-33.

Okada A, Inaba R, Furuno T (1987a) Occurrence of intimal thickening of the peripheral arteries in response to local vibration. *Br J In Med*; 44 (7) 470-475.

Okada A, Inaba R, Furuno T, Nohara S, Ariizumi M (1987b) Usefulness of blood parameters, especially viscosity, for the diagnosis and elucidation of pathogenic mechanisms of the hand-arm vibration syndrome. *Scand J Work Environ Health*; 13(4): 358-362.

Oliveira MJR, Pereira AS, Ferreira PG, Guimarães L, Freitas D, Carvalho AP, Grande NR, Águas AP (2005) Arrest in ciliated cell expansion on the bronchial lining of adult rats caused by chronic exposure to industrial noise. *Environ Res*; Mar;97(3):282-6.

Oliveira MJR, de Sousa Pereira A, Ferreira PG, Grande NR, Águas AP, Guimarães L, Freitas D, Carvalho APO (2003) Reduction of rat pleural microvilli caused by noise pollution. *Experimental Lung Research*; 29: 445-454.

Oliveira MJR, Pereira AS, Castelo Branco NAA, Grande NR, Águas AP (2002a) In utero and postnatal exposure of wistar rats to low frequency/high intensity noise depletes the tracheal epithelium of ciliated cells. *Lung*; 179: 225-232.

Oliveira MJR, Pereira AS, Guimarães L, Freitas D, Carvalho APO, Grande NR, Águas AP (2002b) Chronic exposure of rats to cotton-mill-room noise changes the cell composition of tracheal epithelium. *J Occup Environ Med*; 44: 1135-1142.

Oliveira MJR, De Sousa Pereira A, Águas AP, Grande NR, Monteiro E, Serrano I, Castelo Branco NA (1999) Effects of low frequency noise upon the reaction of pleural milky spots to mycobacterial infection. *Aviat Space Environ Med*; Mar;70(3 Pt 2):A137-40.

Oliveira PM, Pereira da Mata AD, Martins dos Santos JA, da Silva Marques DN, Branco NC, Silveira JM, Correia da Fonseca JC (2007) Low-frequency noise effects on the parotid gland of the Wistar rat. *Oral Dis*; Sep;13(5):468-73.

Omon M, Shiga Y (1986) Sialographic investigations on the anatomy of mouse parotid glands. *Anat Rec*; Feb;214(2):165-7.

Paulsen R, Kastka J (1995) Effects of combined noise and vibration on annoyance. *J Sound Vibn*; 181: 295-314.

Passchier-Vermeer W, Passchier WF (2000) Noise exposure and public health. *Environmental Health Perspectives*; 108 (suppl. 1): 123-131.

Passchier-Vermeer W (1993) Noise and Health. The Hague: Health Council of The Netherlands. (Publication No A93/02e)

Pawłaczyk-Luszczynska M, Dudarewicz A, Waszkowska M, Sliwińska-Kowalska M (2003) Assessment of annoyance from low frequency and broadband noises. *Int J Occup Med Environ Health*; 16(4):337-43.

Persson K, Björkman M, Rylander R (1985) An experimental evaluation of annoyance due to low frequency noise. *Jnl Low Freq Noise Vibn*; 4, 145-153.

Persson K, Björkman M, Rylander R (1990) Loudness, annoyance and the dBA in evaluating low frequency sounds. *Jnl Low Freq Noise Vibn*; 9, 32-45.

Persson-Waye K, Rylander R (2001) The prevalence of annoyance and effects after long-term exposure to low frequency noise. *Jnl Sound Vibn*; 240(3): 483-97.

Persson-Waye K, Bengtsson J, Rylander R, Hucklebridge F, Evans P, Clow A (2002) Low frequency noise enhances cortisol among noise sensitive subjects during work performance. *Life Sci*; Jan 4;70(7):745-58.

Petersen OH, Gallacher, DV. (1998) Electrophysiology of pancreatic and salivary acinar cells. *Ann Rev Physiol*; 50: 65-80.

Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. (2005). The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bulletin of the World Health Organization*; 83:661-669.

Pimenta MG, Martinho Pimenta AJ, Castelo Branco MS, Silva Simões JM, Castelo Branco NAA (1999) ERP P300 and brain magnetic resonance imaging in patients with vibroacoustic disease. *Aviat Space Environ Med*; Mar;70(3 Pt 2):A107-14.

Piorr, D, Wietlake, KH (1989) Assessment of low frequency noise in the vicinity of industrial noise sources. Proceedings of the 5th International Conference on Low Frequency Noise and Vibration; p.61 - 67.

Pipp F, Boehm S, Cai WJ, Adili F, Ziegler B, Karanovic G, Ritter R, Balzer J, Scheler C, Schaper W, Schmitz-Rixen T (2004) Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth and gene expression in the pig hind limb. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; Sep;24(9):1664-8.

Pitman DL, Ottenweller JE, Natelson BH (1988) Plasma corticosterone levels during repeated presentation of two intensities of restraint stress: chronic stress and habituation. *Physiol Behav*; 43(1):47-55.

Plínio-o-Velho. *Naturalis Historia*; 6.29; 5.54: citado por: Rosen G (1974) A backward glance at noise pollution. *Am J Public Health*; May;64(5):514-7.

Pöschl E, Schlötzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Saito K, Ninomiya Y, Mayer U (2004) Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development*; Apr;131(7):1619-28.

Poulsen T, Mortensen FR (2002) Laboratory evaluation of annoyance of low frequency noise. *Working report no.1* Danish Environmental Protection Agency.

Reis Ferreira J, Sousa JA, Foreid P, Antunes M, Cardoso S, Alves-Pereira M, Castelo Branco NAA (2006) Drive respiratório anormal na doença vibroacústica. *Rev Port Pneumol*; jul., vol.12, no.4, p.369-374.

Reis Ferreira J, Mendes CP, Castelo Branco NAA, Monteiro E, Alves-Pereira M (2003a) The human trachea in vibroacoustic disease. Proceedings of the Eight International Congress of Noise as a Public Health Problem; p. 388-389.

Reis Ferreira J, Mendes CP, Castelo Branco NAA, Monteiro E, Alves-Pereira M (2003b) The human lung and pleura in vibroacoustic disease. Proceedings of the Eight International Congress of Noise as a Public Health Problem. p. 386-387.

van der Rest M, Garrone R (1991) Collagen family of proteins. *Faseb J*; Oct;5(13):2814-23.

Rhodes JM, Simons M (2007) The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold. *J. Cell. Mol. Med*; Vol 11, No 2, pp. 176-205.

Ribeiro LC, Crespo FF, Freire I, Afonso I, Castelo Branco SN, Marques MC, Alves-Pereira M, Castelo Branco NAA (2005) Haemostasis and coagulation changes in vibroacoustic disease. Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration

Samuel CS (2005) Relaxin: antifibrotic properties and effects in models of disease. *Clin Med Res*; Nov;3(4):241-9.

Santiago MMG, Marquez AMS, Fernández PB (2004) Incidence of barodontalgias and their relation to oral dental condition in personnel with responsibility in military flight. *Med Oral*; 9:92-105.

Schaper W, Scholz D (2003) Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; Jul 1;23(7):1143-51. Epub 2003 Apr 3.

Schulz TJ (1978) Synthesis of social surveys on noise annoyance. *Journal of the Acoustical Society of America*; 64: 377-405.

Selman M, King TE, Pardo A; American Thoracic Society; European Respiratory Society; American College of Chest Physicians (2001) Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med*; Jan 16;134(2):136-51.

Silva MJ, Dias A, Barreta A, Nogueira PJ, Castelo-Branco NA, Boavida MG (2002) Low frequency noise and whole-body vibration cause increased levels of sister chromatid exchange in splenocytes of exposed mice. *Teratog Carcinog Mutagen*; ;22(3):195-203.

Silva MJ, Carothers A, Castelo Branco N, Dias A, Boavida MG (1999a) Increased levels of sister chromatid exchanges in military aircraft pilots. *Mutat Res*; Apr 26;441(1):129-34.

Silva MJ, Carothers A, Castelo Branco NA, Dias A, Boavida MG (1999b) Sister chromatid exchange analysis in workers exposed to noise and vibration. *Aviat Space Environ Med*; Mar;70(3 Pt 2):A40-5.

Silva MJ, Carothers A, Branco NC, Dias A, Boavida MG (1996) Sister chromatid exchange analysis in workers exposed to noise and vibration. *Mutat Res*; Jul 10;369(1-2):113-21.

Silver FH, Devore D, Siperko LM (2003) Role of mechanophysiology in aging of ecm: effects of changes in mechanochemical transduction. *J Appl Physiol*; 95, 2134–2141.

Simons M (2005) Angiogenesis: Where do we stand now? *Circulation*; 111;1556-1566.

Skepper JN, Navaratnam V (1987) Lipofuscin formation in the myocardium of juvenile golden hamsters: an ultrastructural study including staining for acid phosphatase. *J Anat*; Feb;150:155-67.

Slarve RN, Johnson DL (1975) Human whole-body exposure to infrasound. *Aviat Space Environ Med*; 46(4):428-431.

Slomiany BL, Murty VL, Piotrowski J, Slomiany (1996) A Salivary mucins in oral mucosal defense. *Gen Pharmacol*. Jul;27(5):761-71.

Small JV, Rottner K Kaverina I (1999) Functional design in the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*; Feb;11(1):54-60.

Smyth N, Vatansever HS, Murray P, Meyer M, Frie C, Paulsson M, Edgar D (1999) Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *J Cell Biol*; Jan 11;144(1):151-60.

Som PM, Biller HF (1989) High-grade malignancies of the parotid gland: identification with MR imaging. *Radiology*; Dec;173(3):823-6.

de Sousa Pereira A, Águas AP, Grande NR, Mirones J, Monteiro E, Castelo Branco NAA (1999a) The effect of chronic exposure to low frequency noise on rat tracheal epithelia. *Aviat Space Environ Med*; 70: A186-A190.

de Sousa Pereira A, Grande NR, Monteiro E, Castelo Branco MS, Castelo Branco NA (1999b) Morphofunctional study of rat pleural mesothelial cells exposed to low frequency noise. *Aviat Space Environ Med*; Mar;70(3 Pt 2):A78-85.

Sreebny LM, Johnson DA (1971) Effect of food consistency and decreased food intake in rat parotid and pancreas. *Am J Physiol*; 215:3879-3884.

Stansfeld SA, Gallacher J, Babisch W, Shipley S (1996) Road traffic noise and psychiatric disorder: prospective findings from the caerphilly study. *Brit Med J*; 313: 266- 267.

Steinberg LM, Odusola F, Mandel ID (1992) Remineralizing potential, antiplaque and antigingivitis effects of xylitol and sorbitol sweetened chewing gums. *Clin Prev Dent*; 14:31-4

Stephens LC, Schultheiss TE, Price RE, Ang KK, Peters LJ (1991) Radiation apoptosis of serous acinar cells of salivary and lacrimal glands. *Cancer*; Mar 15;67(6):1539-43.

Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL (2006) The Laboratory Rat. Academic Press. 93-127.

Suhr F, Brixius K, de Marées M, Bölck B, Kleinöder H, Achtzehn S, Bloch W, Mester J (2007) Effects of short-term vibration and hypoxia during high-intensity cycling exercise on circulating levels of angiogenic regulators in humans. *J Appl Physiol*; Aug;103(2):474-83.

Svidovyj VI (1987a) Mechanism of perception and effect on infrasound on the bodies of experimental animals and man. (abstract) *Gig Sanit*; (3): 88-89.

Svidovyi VI, Glinchikov VV (1987b) Action of infrasound on the lung structure. (abstract) *Gig Tr. Prof. Zabol*; (1): 34-37.

Svidovyi VI, Kuklina OI (1985) State of the hemolymph circulatory bed of the conjunctiva as affected by infrasound. (abstract) *Gig Tr. Prof. Zabol*; (6):51-52.

Swynghedauw B (1999) Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev*; Jan; 79(1):215-62.

Takashima S, Takeuchi N, Morimoto S, Tomiyama N, Ikezoe J, Shogen K, Kozuka T, Okumura T (1991) MR Imaging of Sjögren syndrome: correlation with sialography and pathology. *J Comput Assist Tomogr*; May-Jun; 15(3):393-400.

Takeuchi T, Futatsuka M, Imanishi H, Yamada S (1986) Pathological changes observed in the finger biopsy of patients with vibration-induced white finger. *Scand J Work Environ Health*; Aug;12(4 spec no.):280-3.

Takeuchi T, Imanishi H (1984) Histopathological observations in finger biopsy from thirty patients with raynaud's phenomenon of occupational origin. *J Kumamoto Med Soc*, 58: 56-70.

Tandler B (1966) Fine structure of oncocytes in human salivary glands. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med*. Dec 14;341(4):317-26.

Teles-Grilo ML, Leite-Almeida H, Martins dos Santos J, Oliveira C, Boaventura P, Grande NR (2005) Differential expression of collagens type I and type IV in lymphangiogenesis during the angiogenic process associated with bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rat. *Lymphology*; Sep;38(3):130-5.

Testut L, Latarjet A (1976) *Tratado de Anatomia Humana*, tomo IV Salvat editores.

Thompson ME (1933) Notes on the Salivary Glands of the Albino Rat. *Transactions of the Kansas Academy of Science*; Apr. 13-15, pp. 323-327.

Thrall RS, McCormick JR, Jack RM, McReynolds RA, Ward PA (1979) Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat: inhibition by indomethacin. *Am J Pathol*. Apr;95(1):117-30.

Tian B, Han L, Kleidon J, Henke C (2003) An hsv-tk transgenic mouse model to evaluate elimination of fibroblasts for fibrosis. *Therapy. Am J Pathol*; 2003 Aug;163(2):789-801.

Tirapelli LF, Tirapelli DPC, Schimming BC. (2001) ultrastructural alterations of the parotid glands of rats (*rattus norvegicus*) submitted to experimental chronic alcoholism. *Rev Chil Anat*; 19: 175-182.

Tishler M, Yaron I, Shirazi I, Levartovsky D, Yaron M (1999) Salivary and serum soluble interleukin-2 receptor in primary Sjögren's syndrome. *Arch Oral Biol*; Apr;44(4):305-8.

Vercammen MLS (1989) Setting limits or low frequency noise. *Jnl Low Freq Noise Vibn.* 8 105-109.

Verrecchia F, Mauviel A (2007) Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol*; Jun 14;13(22):3056-62.

Verrecchia F, Mauviel A (2004) TGF-Beta and TNF-alpha: antagonistic cytokines controlling type I collagen gene expression. *Cell Signal*; Aug;16(8):873-80.

Verrecchia F, Mauviel A (2002) Control of connective tissue gene expression by TGF beta: role of smad proteins in fibrosis. *Curr Rheumatol Rep*; Apr;4(2):143-9.

Vozenin-Brotons MC, Milliat F, Sabourin JC, de Gouville AC, Francois A, Lasser P, Morice P, Haie-Meder C, Lusinchi A, Antoun S, Bourhis J, Mathe D, Girinsky T, Aigueperse J (2003) Fibrogenic signals in patients with radiation enteritis are associated with increased connective tissue growth factor expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 56, 561–572.

Wang N, Butler JP, Ingber DE (1993) Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*; vol 260, Issue 5111, 1124-1127.

Wenstrup RJ, Florer JB, Brunskill EW, Bell SM, Chervoneva I, Birk DE (2004a) Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly. *J Biol Chem*; Dec 17;279(51):53331-7.

Wenstrup RJ, Florer JB, Cole WG, Willing MC, Birk DE (2004b) Reduced type I collagen utilization: a pathogenic mechanism in COL5A1 haplo-insufficient Ehlers-Danlos syndrome. *J Cell Biochem*; May 1;92(1):113-24.

Wescott WB, Shannon IL (1974) Anatomy of Salivary Glands in C3H Mice. *J Dent Res*; March-April, Vol 53 No. 2, 499.

White CR, Haidekker M, Bao X, Frangos JA (2001) Temporal gradients in shear, but not spatial gradients, stimulate endothelial cell proliferation..*Circulation*; 103: 2508–2513.

WHO (1980). Glossary on air pollution. WHO Regional Office of Europe, Series No. 9, World Health Organization, Copenhagen, Denmark.

Winiarski, M (1983) The danger of silent noise. (abstract) *Arbetsmiljo*; (6):31-34.

Wittmack, D (1907) Über schädigung des gehörs durch schalleinwirkung. *Z.Ohrenheilkunde*; 54:37-80; citado por: de Almeida SIC, Albernaz PLM, Zaia PA, Xavier OG, Karazawa EHI (2000) Natural history of noise induced hearing loss. *Rev. Assoc. Med. Bras*; vol. 46(2), pp. 143-158.

van Zeller P, Tavares C, Freitas AM, Oliveira FC, Castelo Branco NAA (1991) Estudo fluorangiográfico do fundo ocular na doença sistémica das vibrações (DSV). *Rev Port Med Mil*; 39 (2-4): 67-70.

van Zeller P, Oliveira FC, Tavares C, Freitas AM, Castelo Branco NAA (1988) Doença sistémica das vibrações. Angiografia dos doentes com DSV. *Rev Port Med Mil*; 36 (2-3): 116-122.