

JACIEL BENEDITO DE OLIVEIRA

**AÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA TIPO A EM GLÂNDULA SUBMANDIBULAR DE
RATOS**

Recife, PE
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

JACIEL BENEDITO DE OLIVEIRA

Ação da Toxina Botulínica Tipo A em Glândula Submandibular de Ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal. Área de Concentração em Morfofisiologia Animal.

Orientador:

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto

Co-orientadora:

Profa. Dra. Liriane Baratella Evêncio

Recife, PE

2014

Ficha Catalográfica

O48a Oliveira, Jaciel Benedito de
Ação da toxina botulínica tipo A em glândula
submandibular de ratos / Jaciel Benedito de Oliveira. –
Recife, 2014.
105 f. : il.

Orientador: Joaquim Evêncio Neto.
Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento
de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2014.
Inclui referências, apêndice(s) e anexo(s).

1. Glândula submandibular 2. Toxina botulínica tipo A
3. Ratos Wistar 4. Sialorreia I. Evêncio Neto, Joaquim,
orientador II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

**AÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA TIPO A EM GLÂNDULA SUBMANDIBULAR DE
RATOS**

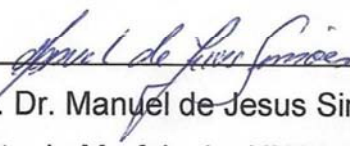
Dissertação elaborada por
JACIEL BENEDITO DE OLIVEIRA


Aprovado em 28 de Fevereiro de 2014.

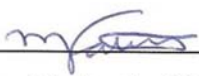
BANCA EXAMINADORA:


Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto (Orientador)

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE


Prof. Dr. Manuel de Jesus Simões
Departamento de Morfologia, UNIFESP-EPM / SP


Profa. Dra. Lígia Reis Moura Estevão
PNPD do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, UFRPE


Profa. Dra. Maria de Fátima Galdino da Silveira
Departamento de Anatomia, CCB, UFPE

Recife, PE

2014

Aos meus pais e avós pelo amor incondicional e dedicação.

Aos pacientes que sofrem com a sialorreia.

Aos animais de laboratório.

Aos meus mestres inspiradores.

Aos irmãos e amigos que sempre estiveram comigo.

Ao futuro melhor, com igualdade, inclusão social, justiça, sem preconceitos, com paz
e amor.

Aos meus futuros filhos.

Com todo o amor, dedico.

Jaciel Benedito de Oliveira

AGRADECIMENTOS

Ao meu bom Deus, que nos criou a sua imagem e semelhança. E nos possibilitou a tudo isso.

Aos meus pais, João Oliveira e Marinalva Ferreira, por todo amor e incentivo dado durante toda a minha vida. Obrigado pelo amor incondicional, pela força e segurança fazendo com que eu sempre acreditasse nos meus objetivos. Amo vocês! As minhas avós, Otilia Maria e Helena da Paz. As minhas irmãs Lucicleide, Janaina e Jaiana. Ao meu irmão Emerson. Também não posso esquecer de Nena e Toinha.

Aos meus orientadores, Joaquim Evêncio Neto e Liriane Baratella Evêncio, pela orientação dedicada, desde a época da graduação. Obrigado pela confiança e ensinamentos, que tem sido preciosos para minha formação acadêmica, profissional e pessoal. Muitos foram os conselhos e as reflexões.

Aos amigos que ficaram o tempo todo dando força e repetindo que sou capaz: Nathalia Alves, Taciana Rocha, Laíse Sousa, Cesário Júnior, Rair Menezes, Maria Edna Barros, Renata Félix, Danielle Dutra, Raquel Albuquerque, José de Castro, Marcele Walmsley, Luciana Regueira, Priscilla Suelen, Vanessa Leandro, Dianne Nobre, Mariana Rêgo, Gabriel Bezerra, Marilene Costa, Karina Lima, Tacila Nunes, Fabiana Maria, Seu João, Fernando Pacífico, Gilliene Costa, Cinthya Barbosa, Rita de Cássia, Juliana Cibele, Cristie Araújo, Amanda Sales, Fabiana Félix, Rafael Silva, Gerlane Nascimento, Ana Lizia, Cláudio Heliomar, Ítalo José. Em especial Nathy, Ceh, Rair, Rê, Renata, Edna, Luciana, Isis, Priscilla e Marcele, que labutaram comigo as 6:00 horas da manhã e no laboratório de histologia do DMFA.

Aos amigos do PPGBA: Maina Almeida, Giovana Anderlini, Ilka Dayanne, Alana Soares, Erick Galindo, Gabriela Fernandes e Francine França, além da Jéssica Santana e Alluanan, que iniciaram essa jornada comigo.

Aos amigos pontes: Fernanda Dias, Jéssica Santana, Alluanan Adelson e Thiago Pajeú. Aos bons amigos do “Especial”: Carolina Lima, Reisa Pinheiro, Line Portela, Sandrine Arruda e Mleudy Layenny. Sempre acreditaram! Aos amigos dos bons tempos de Ciências Biológicas: Carolzinha Costa, Iris Luna, Ana Carolina e Amanda Figueiredo. Aos amigos dalits: Ana Cláudia, Ilana Maciel, Aida Camila, Rayanne Melo, Thais Silva, Carla, Isis Melo, Nancy Rodrigues, Rosalvo Oliveira, Viviana Fiel, Tarsilla Menezes, Estela Dourado, Flávia Monteiro e Betania Ferreira.

Aos alunos das turmas de graduação em Odontologia, Medicina, Medicina Veterinária, Ciências Biológicas (Licenciatura, Bacharelado e Ciências Ambientais), Educação Física, Dança, Terapia Ocupacional, Nutrição, Biomedicina, Farmácia e Fonoaudiologia.

Aos professores que me apoiaram: Fernanda Villarouco, Renata Campina, Fátima Galdino, Carla Cabral, Graça Coriolano, Lígia Galindo, Elizabeth Neves, Carolina Peixoto, Manuela Lira, Vieira Sobrinho, Vanildo Lima, Sandra Lopes, Ademar Amorim e Ana Cristina.

A todos os professores e funcionários que fazem o PPGBA (Prof. Evêncio, Prof. Valdemiro Júnior, Profa. Ana Porto, Profa. Valéria, Prof. Álvaro, Prof. Romildo, Prof. Fabrício, Prof. José Vitor, Profa. Keila, Profa. Tatiana, Prof. Rinaldo, Prof. Lêucio, Profa. Taciana e Edna Cherias).

Aos animais de estimação da família: os cães Malú, Drica, Max e Alex; o papagaio Loro José; ao calopsita Apolinário; aos gatos Josué e Maitê; e as porquinhas da índia Madalena e Magdala, que sempre me recebem com maior alegria.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, na pessoa da reitora Profa. Dra. Maria José de Sena, e do vice-reitor, Prof. Dr. Marcelo Brito Carneiro Leão; a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, na pessoa da Profa. Maria Madalena Pessoa Guerra; ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal e ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, na pessoa do Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto, pela oportunidade e concessão do local para a realização deste trabalho. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Aos prezados membros da banca examinadora: Prof. Dr. Manuel Simões, Profa. Dra. Lígia Estevão e Profa. Dra. Fátima Galdino, por todas as contribuições.

“Em tempos em que quase ninguém se olha nos olhos, em que a maioria das pessoas pouco se interessa pelo que não lhe diz respeito, só mesmo agradecendo àqueles que percebem nossas descrenças, indecisões, suspeitas, tudo o que nos paralisa, e gastam um pouco da sua energia conosco, insistindo.” Martha Medeiros

Muito Obrigado, **Jaciel Oliveira.**

“Eu admiro aqueles que conseguem sorrir com os problemas, reunir forças na angústia, e ganhar coragem na reflexão. É coisa de pequenas mentes encolher-se, mas aquele cujo coração é firme, e cuja consciência aprova sua conduta, perseguirá seus princípios até a morte.”

Thomas Paine (1737-1809) – Político britânico e revolucionário.

“Somente quem passa pelo gelo da dor chega à inocência do amor.”

“Vivamos o momento presente com perfeição! No final de cada dia, e no final da vida, nos encontraremos com as mãos cheias de boas obras que realizamos... Renovar este pensamento a cada dia: não posso contentar-me em viver como vivi ontem, devo melhorar sempre...”

Chiara Lubich (1920-2008) – Fundadora do Movimento dos Focolares.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi observar os aspectos morfométricos, histométricos e histológicos das glândulas submandibulares de ratas tratadas com toxina botulínica tipo A (BTX-A) e com gelatina bovina. Foram utilizadas 80 glândulas submandibulares de ratas *Wistar* adultas e divididas em três grupos: grupo I controle (n = 14); grupo II (n = 34) submetidas a injeção intraglandular de gelatina bovina (0,25 mg); e grupo III (n = 32) tratadas com injeção intraglandular de toxina botulínica tipo A (2,5 U). Os grupos II e III foram divididos em 3 subgrupos de acordo com o dia de análise das glândulas (7, 15 e 28 dias após o tratamento), quando foram removidas, imediatamente pesadas e medidas para análise morfométrica. A seguir, foram fixadas em paraformaldeído 4% e processadas convencionalmente para microscopia de luz, coradas em H.E, P.A.S., alcian blue, tricrômico de Gomori e picrossirius red. Testes estatísticos dos resultados morfométricos e histométricos obtiveram o nível de significância de 0,05 (5%). Morfometricamente não foram observadas diferenças entre os subgrupos do grupo III, entretanto no grupo II houve diferença significativa entre os três subgrupos no comprimento longitudinal ($p = 0,030$) e comprimento transversal ($p = 0,025$), tendo a glândula se apresentado maior no 28º dia após o tratamento. Histometricamente, os ácinos serosos e mucosos do grupo III, apresentaram-se com diâmetro menor quando comparado com o ácinos dos subgrupos tratados com gelatina bovina (grupo II). A espessura da parede do ducto estriado do grupo III foi menor que nos demais. Histologicamente, observou-se a maior quantidade de vacuolizações citoplasmáticas no grupo III, além do maior espaçamento entre os ácinos. Dessa forma, concluímos que a toxina botulínica tipo A interfere na organização estrutural das glândulas submandibulares, promovendo uma diminuição no diâmetro dos ácinos serosos e na espessura da parede dos ductos estriados, mas que macroscopicamente tal diferença não se mostrou significativa.

Palavras-Chave: glândula submandibular; toxina botulínica tipo A; ratos *Wistar*; sialorreia

ABSTRACT

The aim of this study was to observe the morphometric, histological and histométricos aspects of submandibular glands of rats treated with botulinum toxin type A (BTX-A) and with bovine gelatin. We used 80 submandibular glands of adult Wistar rats and divided into three groups: group I, control (n = 14); group II (n = 34) submitted the intraglandular injection of bovine gelatin (0.25 mg); and group III (n = 32) treated with intraglandular injection of botulinum toxin type A (2.5 U). The groups II and III were divided into 3 subgroups according to the day of analysis of glands (7, 15 and 28 days after treatment), when they were removed, heavy and measures immediately for morphometric analysis. Next, were fixed in paraformaldehyde 4 % and processed conventionally for light microscopy, stained in H.E., P.A.S., alcian blue, Gomori trichrome and picrosirius red. Morphometric differences were not observed between subgroups of group III, however in group II there was a significant difference between the three subgroups in the longitudinal length ($p = 0.030$) and transverse length ($p = 0.025$), having the gland has shown greater at day 28th after treatment. Histometrically, serous and mucous acini group III, were presented with a smaller diameter compared with the acini the subgroups treated with bovine gelatin (group II). The wall thickness of the striated duct Group III was lower than in other. Histologically, there was a greater amount of cytoplasmic vacuolization in group III. addition to the greater spacing between the acini. Thus, we conclude that botulinum toxin type A interferes with the structural organization of the submandibular glands, promoting a reduction in the diameter of serous acini and in wall thickness striated ducts, macroscopically but this difference was not significant.

Keywords: submandibular gland; botulinum toxin, type A; rats, Wistar; sialorrhea

SUMÁRIO

Resumo	I
Abstract	II
Sumário	III
Lista de Figuras	IV
Lista de Tabelas	V
Lista de Abreviaturas	VI
1. Introdução	15
2. Revisão da Literatura	18
2.1. Histologia da Glândula Submandibular de Ratos	18
2.2. Regulação e Secreção da Saliva	20
2.3. Sialorreia	24
2.4. Tratamentos da Sialorreia	29
2.5. Toxina Botulínica	32
2.6. Toxina Botulínica e Sialorreia	39
3. Objetivos	45
4. Hipóteses	45
5. Material e Métodos	46
5.1. Tipo, Caracterização e Localização do Estudo	46
5.2. Obtenção e Cuidados com os Animais	46
5.3. Definições dos Grupos de Estudo e Tratamento dos Animais	47
5.4. Colheita e Processamento do Material	48
5.5. Estudo Morfométrico das Glândulas Salivares	49
5.6. Confecção das Preparações Histológicas	40
5.7. Estudo Histométrico	50
5.8. Estudo Histoquímico para Fibras Colágenas e Material Glicoproteico ..	51
5.9. Análise de Fibras Colágenas em Microscopia de Polarização	51
5.10. Análise Estatística	51
6. Resultados e Discussão	52
7. Conclusão	78
Referências	79
Anexo I – Artigo Submetido: Ação da Toxina Botulínica em Glândula Salivar: Revisão Sistemática	94
Anexo II – Carta de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais	105

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Aspecto macroscópico da glândula submandibular de rato. Observar a porção serosa (s) e a porção mucosa (asterisco) 53
- Figura 2:** Fotomicrografias de porções de glândulas submandibulares de ratos do grupo I (controle), porção serosa (A e C) e porção mucosa (B e D). Barra em A e B = 341 μm . Barra em C e D = 36 μm . Coloração: HE 58
- Figura 3:** Fotomicrografias de porções de glândulas submandibulares de ratos do grupo III (tratado com toxina botulínica tipo A). BTX-A com 7 dias após a aplicação (A e B). BTX-A com 15 dias após a aplicação (C e D). BTX-A com 28 dias após a aplicação (E e F). Porções serosas (A, C e E) e porções mucosas (B, D e F). Barra = 36 μm . Coloração: HE 61
- Figura 4:** Fotomicrografias de porções de glândulas submandibulares de ratos do grupo II (tratado com gelatina de origem bovina). Grupo tratado com gelatina e analisado 7 dias após a aplicação (A e B). Grupo tratado com gelatina e analisado 15 dias após a aplicação (C e D). Grupo tratado com gelatina e analisado 28 dias após a aplicação (E e F). Porções serosas (A, C e E) e porções mucosas (B, D e F). Barra = 36 μm . Coloração: HE 62
- Figura 5:** Fotomicrografias de porções mucosas de glândulas submandibulares de ratos do grupo I ou controle (A), grupo III (BTX-A) com 7 dias (B), grupo III com 15 dias (C), grupo II (gelatina bovina) com 7 dias (D), grupo II com 15 dias (E) e grupo II com 28 dias (F). Barra = 36 μm . Coloração: P.A.S. 72
- Figura 6:** Fotomicrografias de porções mucosas de glândulas submandibulares de ratos do grupo I ou controle (A), grupo III (BTX-A) com 7 dias (B), grupo III com 15 dias (C), grupo III com 28 dias (D), grupo II (gelatina bovina) com 7 dias (E) e grupo II com 15 dias (F). Barra = 36 μm . Coloração: Alcian blue 73
- Figura 7:** Fotomicrografias de porções serosas: grupo I ou controle (A); grupo III (BTX-A) com 7 dias (B); grupo III com 15 dias (C); grupo III com 28 dias (D); grupo II (gelatina bovina) com 7 dias (E); grupo II com 28 dias (F). Barra = 36 μm . Coloração: Tricrômico de Gomori 74
- Figura 8:** Fotomicrografias de porções mucosas: grupo I ou controle (A);

grupo III (BTX-A) com 7 dias (B); grupo III com 15 dias (C); grupo III com 28 dias (D); grupo II (gelatina) com 7 dias (E); grupo II com 15 dias (F). Barra = 36 μ m. Coloração: Tricrômico de Gomori..... 74

Figura 9: Fotomicrografias de polarização de porções mucosas: grupo I ou controle (A); grupo III (BTX-A) com 7 dias (B); grupo III com 15 dias (C); grupo III com 28 dias (D); grupo II (gelatina) com 7 dias (E); grupo II com 28 dias (F). Barra = 288 μ m. Coloração: Picrossirius Red 76

Figura 10: Fotomicrografias de polarização de porções serosas: grupo I ou controle (A); grupo III (BTX-A) com 7 dias (B); grupo III com 15 dias (C); grupo III com 28 dias (D); grupo II (gelatina) com 7 dias (E); grupo II com 28 dias (F). Barra = 288 μ m. Coloração: Picrossirius Red 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Média e Desvio Padrão do Peso (g), Comprimento Longitudinal (mm) e Comprimento Transversal (mm) das Glândulas Submandibulares	54
Tabela 2: Comparação Morfométrica entre os Grupos I (Controle), III (BTX-A) e II (Gelatina Bovina) com 7, 15 e 28 dias após a administração da droga .	55
Tabela 3: Análise descritiva do diâmetro (em micrômetro – μm) dos ácinos e espessura dos ductos no grupo controle	64
Tabela 4: Média e desvio padrão do diâmetro do ácinos serosos (em micrômetro – μm) segundo o número de dias de análise e o tipo de tratamento utilizado	65
Tabela 5: Média e desvio padrão da espessura (em micrômetro – μm) da parede ductal dos ductos estriados da porção serosa da glândula submandibular, segundo o número de dias de análise e o tipo de tratamento utilizado	68
Tabela 6: Média e desvio padrão do diâmetro dos ácinos mucosos (em micrômetro – μm) segundo o número de dias de análise e o tipo de tratamento utilizado	69
Tabela 7: Média e desvio padrão da espessura (em micrômetro – μm) da parede ductal dos ductos estriados da porção mucosa da glândula submandibular, segundo o número de dias de análise e o tipo de tratamento utilizado	70
Tabela 1*: Estudos sobre a ação da toxina botulínica na glândula salivar de ratos, identificados por autor, ano, tipo e dose da toxina, glândula salivar e metodologia de estudo utilizados e principais resultados.	
*Presente no Anexo I, sessão “Artigo Submetido”	103

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh: Acetilcolina

AChE: Enzima acetilcolinesterase

AMPc: Monofosfato cíclico de adenosina

ATP: Adenosina trifosfato

AQP: Aquaporina / AQP5: Aquaporina 5

AVE: Acidente vascular encefálico

BoNT / BTX / TxB: Toxina botulínica / BTX-A: Toxina botulínica tipo A

Ca²⁺: Íon cálcio

Ca²⁺/CaM: Cálcio-calmodulina

cGMP: Monofosfato cíclico de guanosina

CLG: Comprimento longitudinal da glândula

CTG: Comprimento transversal da glândula

DAG: Diacilglicerol

DAB: Diaminobenzidina

VIP: Peptídeo intestinal vasoativo

FDA: *Food and Drug Administration*

g: Grama

GDP: Guanosina difosfato

Gs: Proteína G estimuladora

GTP: Guanosina trifosfato

HE: Coloração por hematoxilina e eosina

IP₃: Inositol trifosfato

JNG: Junções neuroglandular

JNM: Junção neuromusculares

K⁺: Íon potássio

kg: Quilograma

LIBP: *Lanzhou Institute of Biological Products*

M: Molar

mg: Miligramas

ml: Mililitros

mm: Milímetros

Na⁺: Íon sódio

ng: Nanograma

NO: Óxido nítrico

P.A.S.: Ácido periódico de Schiff

PBS: Solução tampão salina

PFA: Paraformaldeído

PG: Peso da glândula

pH: Potencial hidrogênio

PIP₂: Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato

RER: Retículo endoplasmático rugoso

SNA: Sistema Nervoso Autônomo

SNC: Sistema Nervoso Central

TG: Tricrômico de Gomori

µm: Micrômetro

U: Unidades internacionais

1. INTRODUÇÃO

A sialorreia ou hipersalivação consiste em um aumento excessivo no fluxo salivar ou acúmulo de saliva na cavidade oral, sendo um fenômeno comum em crianças durante o desenvolvimento do controle neuromuscular oral que vai dos 18 aos 24 meses. Todavia, após os 4 anos de idade a sialorreia é considerada anormal e, portanto, patológica (AUGUSTO e PEREZ, 2006; FAIRHURST e COCKERILL, 2011). Acompanha várias patologias de origem neurológica (retardo do desenvolvimento neuropsicomotor, paralisia cerebral, doença de Parkinson, miastemia gravis, entre outras), sendo um motivo de desconforto significativo para os pacientes afetados (ALREFAI, ABURAHMA, KHADER, 2009; ISAÍAS e DARÍO, 2009; ALTER, 2010).

A hipersalivação é comumente associada ao prejuízo do controle neuromuscular com disfunção da atividade motora oral ou à hipersecreção das glândulas salivares (aumento do fluxo de saliva) (YANG et al., 2006). Também pode ocorrer como efeito colateral de medicamentos. Entretanto, a maioria dos pacientes que apresentam a sialorreia tem controle neuromuscular oral deficiente (JONGERIUS et al., 2001).

Por causa da sialorreia, observam-se diariamente várias complicações clínicas em pacientes com alterações motoras orofaríngeas, que incluem, dentre outras, dermatite facial e perioral (YANG et al., 2006; BLOEM et al., 2009); aspiração e perda de fluidos e eletrólitos (YANG et al., 2006; JANKOVIC, 2008); riscos de infecções pulmonares (inclusive pneumonia) (ELLIES et al., 2002a; MANRIQUE e SATO, 2009; ALTER, 2010); além de dificuldade de sociabilização do paciente e seus familiares, levando ao isolamento social (ELLIES et al., 2002a). Tais consequências geram um grande impacto na vida dos pacientes e justificam o tratamento da sialorreia.

Várias abordagens terapêuticas da sialorreia já foram empregadas na prática médica. Os tratamentos propostos são o uso de medicação anticolinérgica, terapia oromotora e procedimentos cirúrgicos (SAVARESE et al., 2004), dentre outros. A terapêutica medicamentosa e os procedimentos cirúrgicos são medidas invasivas e

estressantes para o paciente, e muitas vezes associados à efeitos secundários indesejáveis (ELLIES et al., 1999; ALTER, 2010).

Nesses casos, o tratamento farmacológico local através da aplicação da toxina botulínica A (BTX-A) em glândulas salivares pode ser uma grande ajuda (SAVARESE et al., 2004). A aplicação intraglandular da toxina botulínica tipo A ou B, tem sido utilizada no tratamento da sialorreia (LAGALLA et al., 2009; INTISO, 2012), pois a mesma é capaz de deprimir a atividade secretora das glândulas salivares (ELLIES et al., 2004). Estudos clínicos apontam que o uso da toxina botulínica tipo A em injeções intraglandulares nas parótidas e submandibulares é eficaz e leva à diminuição da sialorreia (JEUNG, 2012; RON et al., 2012; ÇIFTÇ et al, 2013). A BTX-A está ganhando popularidade de maneira muito rápida, e pode tornar-se o tratamento de escolha para a sialorreia (LIM et al., 2006).

Existem no mercado internacional diferentes preparações comerciais de toxina botulínica do tipo A. Os relatos científicos das glândulas salivares se reportam ao uso da formulação da toxina botulínica americana, o *Botox*[®] (Allergan, Inc., Irvine, CA) (ELLIES et al., 2002b; JONGERIUS et al., 2004b; SAVARESE et al., 2004). Em 2003 foi lançada uma nova formulação de origem chinesa da toxina botulínica do sorotipo A, conhecida pelo nome comercial de *Prosigne*[®] (RIEDER et al., 2007), e liberada no Brasil para uso terapêutico pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Dentre os principais diferenciais do *Prosigne*[®] em relação às demais toxinas do mercado, destaca-se o fato de ser veiculada em uma gelatina de origem bovina em vez de albumina humana, como ocorre com outras marcas comerciais. A gelatina bovina se mostra como o veículo que oferece maior estabilidade à estrutura química da toxina, aumentando sua resistência à deformação e preservando sua toxicidade. Além disso, é a única com a certificação *prions free*, garantindo não veicular doenças transmitidas por príons (CRISTÁLIA, 2006; SPOSITO, 2010).

Além da injeção de BTX-A ser uma opção terapêutica menos invasiva para o paciente, os tratamentos com toxina botulínica tipo A tem enorme implicação econômica para o sistema de saúde, especialmente para os países em desenvolvimento, pois ainda é um tratamento muito oneroso para a população (BOTHWELL et al., 2002; WU et al., 2011). Determinar um papel mais preciso entre as diferentes formulações de BTX-A é extremamente importante.

Nesse sentido, a marca *Prosigne*[®] pode desempenhar um papel relevante, visto que os estudos clínicos a mostra como eficaz, segura e bem tolerada pelos pacientes, além do seu custo ser significativamente mais baixo (GOMES et al., 2007; WU et al., 2011). Entretanto, existem pontos fracos na literatura, fazendo com que haja a necessidade de novos estudos para determinar o uso da BTX-A na sialorreia (REDDIHOUGH et al., 2010).

A maioria dos estudos existentes com humanos restringem-se à ensaios clínicos (SHAN et al., 2013), porém são de baixa qualidade (ensaios clínicos não comparativos e não randomizados), apesar de seus resultados globais terem sido promissores (MAJID, 2010). Segundo Shan et al. (2013), ainda permanece desconhecido o mecanismo de ação da toxina botulínica na célula acinar.

A melhor compreensão dos mecanismos morfológicos, histológicos e histoquímicos das glândulas salivares sob a influência da toxina botulínica tipo A está diretamente relacionada com o entendimento dos profissionais que poderiam utilizá-la como recurso no tratamento da sialorreia, contribuindo diretamente para sua aplicação clínica e para a confiabilidade em recomendar e prescrever seu uso para os pacientes com hipersalivação.

Apesar de relevante, na literatura médica são escassos os estudos que estão voltados para o mecanismo de ação da toxina botulínica tipo A em glândulas salivares, bem como, sobre a eficácia do recente veículo da toxina (gelatina de origem bovina), existindo a carência de evidências sobre eficácia e segurança da BTX-A em tecido glandular salivar, com objetivo de diminuir a sialorreia. Esta escassez de artigos nos faz questionar sua aplicabilidade terapêutica, e nos leva a necessidade de uma avaliação estrutural deste tecido sob influência da BTX-A.

Dado ao exposto, o presente estudo teve o objetivo de analisar histologicamente a glândula submandibular de ratos sob ação da toxina botulínica tipo A e gelatina de origem bovina.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A presente revisão da literatura gerou um artigo de revisão sistemática em anexo (apêndice I).

2.1. Histologia da Glândula Submandibular de Ratos

As glândulas salivares são ramificações tubuloacinares compostas por células epiteliais, repousadas em uma membrana basal, envolvidas por um estroma de tecido conjuntivo intersticial, bem vascularizado (KONTTINEN et al., 2010). O parênquima das glândulas salivares é composto por dois sistemas básicos: os adenômeros ou ácinos, composto por células acinares serosas ou mucosas; e o sistema ductal, que é formado por diversas variedades de ductos (intercalados, granuloso, estriado e excretor) (MELVIN et al., 2005), estando dividida em lóbulos bem delimitados pelos septos de tecido conjuntivo fibroso (JACOBY e LEESON, 1959; CASTRO, CASTRO, MATHEUS, 1985; FONSECA, CASTRO, MATHEUS, 1989; UTRILLA et al., 1992). A glândula submandibular é revestida em sua própria cápsula conjuntiva, sendo delgada e constituída por tecido conjuntivo denso fibroso (FONSECA, CASTRO, MATHEUS, 1989).

As glândulas submandibulares com características de maturidade se apresentam constituídas por ácinos volumosos e condensados (CASTRO, CASTRO, MATHEUS, 1985). Estas glândulas são mistas, pois possuem os dois tipos de unidades secretoras, porém, os ácinos serosos, apesar de menores, são predominantes em relação aos mucosos (FONSECA, CASTRO, MATHEUS, 1989; KATCHBURIAN e ARANÃ-CHAVES, 2012).

Os ácinos serosos evidenciam grande diversificação de tamanho e possuem o formato esferoide e constituídos por células de formato piramidal, com grânulos acidófilos na região apical, e citoplasma espumoso que apresentam basofília ergastoplasmática no polo basal, em tecidos corados pela hematoxilina e eosina (HE). Seus núcleos esferoides são volumosos e com cromatina frouxa, com nucléolos evidentes na maioria das vezes e localizados no terço basal da célula.

Canais intercelulares podem ser detectados. Células mioepiteliais estão presentes abraçando as unidades secretoras terminais (LEESON, 1956; LEESON e JACOBY, 1957; CASTRO, CASTRO, MATHEUS, 1985; FONSECA, CASTRO, MATHEUS, 1989; UTRILLA et al., 1992; BARBOSA e TAGA, 1997). O ácino mucoso é formado por células volumosas com citoplasma claro quando corado por hematoxilina e eosina. Seus núcleos possuem cromatina densamente distribuída e estão situados na porção basal da célula (FONSECA, CASTRO, MATHEUS, 1989).

Vários ácinos estão ligados a uma ramificação de ductos intercalares, revestido por células epiteliais achatadas ou cúbicas (JACOBY e LEESON, 1959; BARBOSA e TAGA, 1997), de difícil visualização em glândulas adultas. O ducto intercalar torna-se contínuo, de forma abrupta, com o elemento seguinte, o ducto granuloso (JACOBY e LEESON, 1959; BARBOSA e TAGA, 1997).

Os ductos granulosos, também denominados de túbulos convolutos, serosos ou contornados, são bastante desenvolvidos e predominam sobre os demais. Apresentam-se sinuosos, com lume amplo e regular, são constituídos por células cilíndricas altas com núcleos grandes, elipsoides, vesiculosos e com cromatina frouxamente distribuída, dispostos no polo basal. O citoplasma apresenta, nos seus dois terços superiores, grande quantidade de grânulos acidófilos esféricos de secreção serosa e tamanhos variáveis; num mesmo ducto, variações de intensidade de coloração e de quantidade de granulações podem ser notadas. Estes grânulos têm sido interpretados como grânulos de secreção, e eles podem ser encontrados também dentro do lúmen, presumivelmente após a descarga das células. Abaixo do núcleo, curtas e acidófilas estriações basais às vezes podem ser discernidas. Este segmento é profundamente afetado por hormônios (JACOBY e LEESON, 1959; CASTRO, CASTRO, MATHEUS, 1985; FONSECA, CASTRO, MATHEUS, 1989; UTRILLA et al., 1992; BARBOSA e TAGA, 1997).

Os ductos estriados, continuação dos ductos granulosos, são de médio calibre, menores que o ducto anterior, e estão constituídos por células cilíndricas mais baixas que as células dos ductos granulosos. Possuem citoplasma acidófilo nitidamente estriado em seu terço basal; os núcleos esféricos ou alongados apresentam, no geral, cromatina frouxamente distribuída e situam-se na porção média da célula, mais ou menos centralizados ou mesmo localizados apicalmente. As estriações basais longitudinais são bastante pronunciadas, em contraste com os

dobramentos rudimentares dos ductos granulosos, sendo grandes e complexas estriações. Numerosas mitocôndrias são agregadas entre as invaginações basais. A região apical é clara e desprovida de grânulos de secreção. Estas células apresentam seu longo eixo orientado perpendicularmente à luz do ducto e muitas microvilosidades curtas às vezes estão presentes na superfície das células luminiais (JACOBY e LEESON, 1959; LEESON e JACOBY, 1966; FONSECA, CASTRO, MATHEUS, 1989; UTRILLA et al., 1992).

Os ductos excretores, de lúmen amplo e regular, são revestidos por epitélio biestratificado cúbico (UTRILLA et al., 1992). Os ductos excretores que estão localizados no interior dos lóbulos glandulares, se apresentam constituídos por epitélio do tipo cúbico estratificado, com células apresentando núcleo localizado na região central e citoplasma acidófilo (FONSECA, CASTRO, MATHEUS, 1989).

Os ácinos e ductos estriados estão revestidos pela lâmina basal esponjosa e uma rede tecido conjuntivo, com vasos sanguíneos e feixes de fibras colágenas de vários diâmetros (WATANABE et al., 2007). Os espaços interparenquimatosos são preenchidos por tecido conjuntivo frouxo, com poucas fibras colágenas e muitos capilares sanguíneos (UTRILLA et al., 1992).

2.2. Regulação e Secreção da Saliva

O sistema nervoso autônomo (SNA), com suas duas divisões, controla o fluxo salivar. De acordo com o modelo bem estabelecido de inervação das glândulas salivares, tanto componentes simpáticos (adrenérgicos) como componentes parassimpáticos (colinérgicos), influenciam na secreção salivar. O SNA também controla o fluxo sanguíneo através das glândulas salivares, sendo importante na regulação da taxa de fluxo salivar (AVERY, 2005).

A divisão colinérgica controla, principalmente, a secreção de água e eletrólitos inorgânicos, uma saliva altamente aquosa (secreção vesicular sem armazenamento de grânulos, regulada pela acetilcolina nos receptores muscarínicos); enquanto que a divisão adrenérgica (β -adrenérgica) é a principal responsável pela secreção de proteínas e outros constituintes salivares, como substâncias mucosas e mucoproteínas da secreção orgânica (via exocitose, regulada pela ação da

norepinefrina em β -receptores) (RICE, 1984; ELLIES et al., 1999; AVERY, 2005; ELLIES et al., 2006b; GUYTON e HALL, 2011).

A divisão parassimpática produz vasodilatação e aumentam a produção de saliva (AVERY, 2005). A estimulação simpática modifica a composição da saliva (aumento do conteúdo proteínáceo), mas tem pouca relevância no volume salivar. A divisão parassimpática desempenha o papel mais proeminente. (BARRETT et al., 2014).

A secreção salivar envolve duas fases que envolvem tanto os adenômeros das glândulas salivares (ácinos), quanto o seu sistema ductal. A primeira fase é realizado pelos ácinos e produz a saliva primária, isotônica quando comparada com a tonicidade do plasma sanguíneo; e a segunda fase, compreende as modificações sofridas pela saliva, tornando-a hipotônica e ocorre no sistema ductal (CATALÁN, NAKAMOTO, MELVIN, 2009), entre a luz do ducto estriado e a rede capilar periacinar (KONTTINEN et al., 2010). As células acinares, juntamente com a primeira porção do sistema ductal, os ductos intercalares, são responsáveis pela secreção da saliva primária (BOYCE e BAKHEET, 2005).

A saliva é secretada como resultado da estimulação basal (saliva não estimulada) ou estimulação reflexa dos ramos simpáticos e parassimpáticos do sistema nervoso autônomo sobre os adenômeros (saliva estimulada). O SNA também regula a atividade responsável pela modificação que ocorre na segunda fase (afeta também as células do ducto), onde a composição mineral de concentração e o pH da saliva primária são modificados (KONTTINEN et al., 2010), pois as células do ducto estriado estão envolvidas no transporte ativo de eletrólitos (RICE, 1984).

Nas células acinares estão presentes receptores adrenérgicos (alfa – α e beta – β) e colinérgicos (muscarínicos). A secreção fluída e rica em eletrólitos se dá pela estimulação dos receptores muscarínicos. Já a secreção rica em proteínas, através da exocitose, ocorre não só pela estimulação dos receptores β -adrenérgicos (β -receptores), mas também pelos receptores muscarínicos e α_1 (AVERY, 2005). A interação da acetilcolina (Ach) com receptores muscarínicos M3 regulam o fluído glandular e a secreção iônica (NAKAMURA et al., 2004; PROCTOR, 2006).

Os receptores β -adrenérgicos estão localizados na superfície basolateral das células acinares e agem através da rota da adenosina monofosfato cíclico (AMPc), um segundo mensageiro que aumenta a sua concentração no meio intracelular, fazendo aumentar a síntese proteica. O fator principal para a liberação de grânulos por exocitose nas células acinares é a liberação de norepinefrina, que funciona como primeiro mensageiro (AVERY, 2005).

Os β -receptores estão ligados a uma proteína G na face citosólica da membrana plasmática. Quando a catecolamina se combina com o receptor β -adrenérgico, o sítio de ligação à proteína G fica exposto, capaz de ligar guanosina trifosfato (GTP) em troca de guanosina difosfato (GDP), ativando-a. Uma vez ativa, a enzima adenilato ciclase é também ativada, e catalisa a conversão de adenosina trifosfato (ATP) para o segundo mensageiro intracelular, o AMPc. Este, por sua vez, promove a fosforilação da proteína quinase A que estimula a exocitose, a ativação de fatores regulatórios nucleares e a indução da expressão gênica. A ativação termina quando a proteína G hidrolisa GTP em GDP e outro ciclo pode iniciar (FUJITA-YOSHIGAKI, 1998; AVERY, 2005).

Já a estimulação dos receptores muscarínicos pela acetilcolina promove o aumento da concentração citosólica livre de cálcio (Ca^{2+}), envolvendo o ciclo fosfoinositídeo, promovendo a secreção de fluídos, e induz a uma liberação relativamente limitada de amilase (ELLIES et al., 1999; YOSHIMURA et al., 2002; ELLIES et al., 2003a; AVERY, 2005; ELLIES et al., 2006b). O aumento do cálcio intracelular citosólico livre estimula o transporte de aquaporina (AQP) para a membrana citoplasmática apical e o movimento rápido de água (AVERY, 2005; MELVIN et al., 2005; CATALÁN, NAKAMOTO, MELVIN, 2009). Aquaporinas são proteínas integrais de membrana que formam poros na membrana celular das células biológicas. Nas glândulas salivares de ratos foi identificada a aquaporina 5 (AQP5) (CHEIDDE e SCHOR, 1999; MELVIN et al., 2005).

A combinação de ligantes a esses receptores específicos ativam outras proteínas G (G_q) que ativam a fosfolipase C com especificidade para fosfoinositídeo e catalisa a formação de diacilglicerol (DAG) e de inositol trifosfato (IP_3) do substrato fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2). O DAG ativa a proteína quinase C que, em troca, fosforilisa proteínas citosólicas e pode aumentar a transcrição de genes específicos. O IP_3 liga-se aos receptores nas membranas intracelulares, resultando

na mobilização de cálcio intracelular por abrir os portões de canal de Ca^{2+} . A estimulação parassimpática causa um aumento imediato na síntese e secreção de proteína, apesar de o mecanismo secretor parecer envolver secreção vesicular sem armazenamento de grânulos (AVERY, 2005).

Dessa forma, temos uma secreção serosa de saliva (com a enzima ptialina ou α -amilase) e outra mucosa (rica em mucina). Estes constituintes orgânicos estão dissolvidos em fluido que possui composição semelhante ao do plasma sanguíneo (alta concentração de íons potássio e bicarbonato e baixa concentração de íons sódio e cloreto), ou seja, isotônica em relação ao plasma (CATALÁN, NAKAMOTO, MELVIN, 2009; GUYTON e HALL, 2011).

A partir daí a saliva é transportada por um sistema de ductos onde a mesma é modificada, na passagem pelo ducto estriado. Estes ductos são relativamente impermeáveis à água e ocorre a reabsorção de íons sódio (Na^+) e cloreto (Cl^-), além da secreção de íons potássio (K^+) e bicarbonato (HCO_3^-), tornando a saliva secundária hipotônica em relação à tonicidade anterior, pois a quantidade de solutos removidos excede a quantidade adicionada (CATALÁN, NAKAMOTO, MELVIN, 2009; GUYTON e HALL, 2011; BARRETT et al., 2014). A tonicidade de saliva está diretamente relacionada ao fluxo salivar; pois quanto maior o fluxo, maior a tonicidade em relação ao plasma (BOYCE e BAKHEET, 2005). A estimulação de receptores colinérgicos ativam os transportadores de íons em células ductais (TURNER e SUGIYA, 2002). Lembrando que a rica vascularização das glândulas salivares se dilata quando a secreção salivar é iniciada (BARRETT et al., 2014).

A acetilcolina (ACh) logo após exercer sua ação, sofre hidrólise pelas colinesterases (dentre elas, a enzima acetilcolinesterase – AChE), liberando ácido acético e colina. Nesta hidrólise, que ocorre na fenda sináptica (como na junção neuroglandular), cerca de 50% da colina produzida é recaptada pelo terminal axônico, e, posteriormente, é reutilizada para a biossíntese de acetilcolina (SILVA, 1998; COUSIN et al., 2005). A atividade da enzima acetilcolinesterase depende da concentração de seu substrato acetilcolina, e ambos variam de acordo com o grau de inervação colinérgica das glândulas exócrinas (ELLIES et al., 1999).

Outras moléculas podem estar envolvidas no processo de regulação secretória. O óxido nítrico (NO) age como um possível neuromodulador vascular na

regulação de processos secretores específicos no trato aerodigestivo superior (TAKAI et al, 1999; ELLIES et al., 2006a; ELLIES et al., 2006b).

2.3. Sialorreia

Uma criança produz cerca de 750 a 900 ml de saliva por dia, mas esse número passa para cerca de 1 até 1,5 litros na fase adulta (HUMPHREY e WILLIAMSON, 2001; PORTA et al., 2001). A glândula submandibular contribuindo com aproximadamente 70% desse total (HORNIBROOK e COCHRANE, 2012), apesar de as glândulas submandibulares possuírem cerca da metade da massa e volume das glândulas parótidas (PEDERSEN et al., 2002). Outros autores afirmam que a produção diária de saliva fica em torno de 0,5 a 1 litro (MELVIN et al., 2005) ou cerca de 1,2 litros por dia (HORNIBROOK e COCHRANE, 2012).

A saliva é uma secreção exócrina, formado por um líquido aquoso rico em eletrólitos e proteínas, ou, dependendo do tipo de saliva, em mucinas, resultante da secreção de glândulas salivares maiores e menores, além do fluido gengival, estando presente no interior da cavidade oral (WILKEN, ASLAMI, BACKES, 2008; KATCHBURIAN e ARANA-CHAVEZ, 2012), tendo um papel importante na manutenção da saúde oral e dental e na digestão de alimentos. A composição final da saliva varia dependendo da origem da estimulação do sistema nervoso autônomo ou vegetativo (simpático e parassimpático) e do tipo de glândula salivar considerada (MELVIN et al., 2005).

A saliva não estimulada é produzida continuamente para ajudar na maturação do esmalte dental, proteção dos dentes contra ácidos e bactérias orais, lubrificar a mucosa oral, da faringe e do esôfago (PEDERSEN et al., 2002; MELVIN et al., 2005), limpar a cavidade bucal, e, regular seu pH, além de apresentar enzimas digestivas. Já salivagem estimulada ocorre durante algum estímulo digestório (WILKEN, ASLAMI, BACKES, 2008). A salivagem é um processo altamente regulado. A saliva não estimulada ocorre em taxas relativamente lentas, e durante o sono, quase nenhuma saliva é secretada. Já a saliva estimulada compreende cerca de 80 a 90% da saliva produzida diariamente (MELVIN et al., 2005).

O ato salivatório é automático. Com o desenvolvimento do controle neurológico da língua e da musculatura, começa a ocorrer uma continência salivar, pois a habilidade de manejar a saliva na boca para a deglutição depende de movimentos voluntários da musculatura oral, que se desenvolve normalmente entre os 15 e 18 meses de idade. Mas um elevado número de crianças com desenvolvimento típico continua a babar até a idade de 3 anos, especialmente durante os momentos das refeições e lanches. A capacidade de controlar a saliva se desenvolve juntamente com a alimentação normal e controle motor oral até cerca dos 4 anos de idade (FAIRHURST e COCKERILL, 2011).

A hipersalivação ou sialorreia é comum em crianças durante o desenvolvimento do controle neuromuscular oral normal (AUGUSTO e PEREZ, 2006), geralmente mais presente em meninos (HORNIBROOK e COCHRANE, 2012). Após os 4 anos de idade, os problemas com o controle de saliva, ou sialorreia, é considerado anormal ou patológica (AUGUSTO e PEREZ, 2006; FAIRHURST e COCKERILL, 2011). Os termos “*drooling*”, babação, hipersialorreia, ptialismo, incontinência salivar, “*dribbling*” e “*drivelling*” são utilizados como sinônimos para a sialorreia (BHATIA, MÜNCHAU, BROWN, 1999; HORNIBROOK e COCHRANE, 2012; REZENDE, 2012).

A sialorreia consiste em um aumento excessivo no fluxo salivar ou acúmulo de saliva na cavidade oral (JONGERIUS et al., 2004a; AUGUSTO e PEREZ, 2006), que ultrapassa a margem da boca (escape de saliva por cima do lábio inferior), de forma involuntária e passiva (AUGUSTO e PEREZ, 2006; MENINGAUD et al., 2006; SILVESTRE-RANGIL et al., 2011), acompanhando várias patologias.

2.3.1. Etiologia da Sialorreia

Existem duas formas de sialorreia: 1 – a sialorreia reativa resultante de distúrbios na fase de deglutição da saliva, comum nas sequelas neurológicas, particularmente naquelas associadas a distúrbios do movimento, que cursam com a redução do reflexo de deglutição e que apresentam paralisia da musculatura da língua, faringe e laringe; e 2 – a sialorreia absoluta, resultante de uma alteração neurogênica na inervação da glândula salivar (ELLIES et al., 2002b; SPOSITO,

2004), pela hipersecreção ou disfunção sensorial (WILKEN, ASLAMI, BACKES, 2008). A hipersalivação é comumente associada ao prejuízo do controle neuromuscular com disfunção da atividade motora oral e ao aumento do fluxo de saliva (YANG et al., 2006).

A sialorreia é um achado frequente em doenças neurológicas crônicas (MARINA et al., 2008), devido às alterações sensório-motoras causadas pela doença de base, representando cerca de 10 a 38% dos pacientes com paralisia cerebral (PC) (JONGERIUS et al., 2004a; AUGUSTO e PEREZ, 2006; BERWECK et al., 2007) e 75% dos pacientes com doença de Parkinson (JANKOVIC, 2008; JANKOVIC, 2009). Estas patologias são caracterizadas por apresentam este sintoma devido à insuficiência dos mecanismos de coordenação orofacial, da musculatura do palato, da cabeça e do pescoço, resultando num *pool* excessivo de saliva na porção anterior da cavidade bucal e incontinência da mesma no interior desta cavidade. Agravando este quadro, contribuem as baixas habilidades cognitivas e mentais destes pacientes (JONGERIUS et al., 2004a; MENINGAUD et al., 2006; MARINA et al., 2008).

Este quadro de salivação excessiva é estigmatizante, e a prevalência em muitas doenças neurológicas (neuropsicomotoras e neurodegenerativas) é elevada (MENDES et al., 2010; MØLLER et al., 2011). É uma condição incomum que tem várias causas (NEVILLE et al., 2009) e está presente em várias patologias, como: paralisia facial e cerebral (BREHERET et al., 2011; JEUNG et al., 2012; RODWEL et al., 2012); Doença de Parkinson ou doença do neurônio motor (ELLIES et al., 1999; BHATIA, MÜNCHAU, BROWN, 1999; BREHERET et al., 2011); retardo do desenvolvimento neuropsicomuscular, miastemia gravis, acidente vascular encefálico (AVE), esclerose lateral amiotrófica, encefalopatias crônicas progressivas ou não progressivas (ELLIES et al., 2000; ELLIES et al., 2002a; JONGERIUS et al., 2004a; ALREFAI, ABURAHMA, KHADER, 2009; ALTER, 2010; MØLLER et al., 2011); síndrome de Down (LIMBROCK, HOYER, SCHEYING, 1990); distúrbios orofaríngeos e esofágicos (BOYCE e BAKHEET, 2005); entre outras.

A sialorreia leve pode estar relacionada com irritações locais, como as úlceras aftosas ou próteses dentárias mal adaptadas, ou pode ocorrer como um sistema tampão protetor para neutralizar o ácido estomacal em indivíduos com doença de

refluxo gastroesofageano. Também é bem conhecida como característica clínica da raiva e envenenamento por metais pesados (NEVILLE et al., 2009).

O excesso de saliva também está relacionado ao carcinoma de cabeça e pescoço (COSKUN et al., 2007; TEYMOORTASH et al., 2007; MARCHESE et al., 2008; JANKOVIC, 2009; ALTER, 2010). Após laringectomia total em pacientes com câncer de laringe (YUAN, HOU, WEN, 2004) ou em pacientes que tenham sido submetidos à ressecção cirúrgica da mandíbula, frequentemente há excessiva secreção das glândulas salivares (NEVILLE et al., 2009).

Também pode ocorrer como efeito colateral de medicamentos que atuam aumentando a atividade dos receptores específicos da via secretomotora, resultando em hipersecreção (JONGERIUS et al., 2001; AUGUSTO e PEREZ, 2006), como o lítio e os agonistas colinérgicos (NEVILLE et al., 2009). Em pacientes geriátricos, por exemplo, os medicamentos antipsicóticos, em sua maior parte, induzem a sialorreia, afetando principalmente a vida social do paciente (AFFONSO e CRUZ, 2013).

Como causas indiretas da sialorreia, encontram-se obstrução nasal, postura de cabeça, posição do paciente, estado emocional (AUGUSTO e PEREZ, 2006) e má oclusão (AUGUSTO e PEREZ, 2006; TIIGIMÄE-SAAR et al., 2012). A sialorreia também pode ser por hipersalivação idiopática (JANKOVIC, 2009), e a macroglossia pode contribuir para este quadro (MARINA et al., 2008).

A sialorreia quase nunca é causada pela produção excessiva de saliva (ALTER, 2010), ao contrário do que frequentemente se interpreta, mas, na maioria das vezes, na dificuldade, inabilidade ou deficiência de deglutição da mesma (SILVESTRE-RANGIL et al., 2011). Este sinal clínico é conhecido como disfagia, o qual se caracteriza pela dificuldade de condução do conteúdo da cavidade bucal até o estômago (MARCHESAN, 1999).

Este distúrbio reflete uma perturbação da fase oral de deglutição (primeira fase da deglutição) que é associada com ineficiência na fase faríngea (segunda fase da deglutição) e falta de coordenação do fechamento labial, indicando uma falha neurogênica na coordenação dos músculos (MANRIQUE, 2005a; AUGUSTO e PEREZ, 2006). Este fenômeno pode estar associado a um aumento do tônus da musculatura que abre a boca e dessa forma os pacientes apresentam dificuldade em

administrar o fluxo salivar normal (AUGUSTO e PEREZ, 2006), somado ao baixo controle da cabeça (MARINA et al., 2008).

Realizamos o ato de engolir cerca de 500 a 2.000 vezes por dia, e a forma como deglutimos envolve um processo complexo de coordenação motora, regido por um sistema reflexo bastante complexo e desenvolvido no nascimento (HEINEN, 2008). Quando a produção e a secreção de saliva excede a habilidade do indivíduo de transportá-la até o estômago, ocorre a estase da saliva dentro da cavidade bucal, o escape extraoral e pode ocorrer aspiração para as vias aéreas superiores, além de concomitante dificuldade na mastigação e articulação (MENDES et al., 2010).

2.3.2. Consequências da Sialorreia

O excesso de saliva traz impactos negativos sobre funções psicossociais, educacionais e físicas (HASSIN-BAER et al., 2005), sendo um importante problema clínico, social e emocional para crianças e adultos (ALREFAI, ABURAHMA, KHADER, 2009). Como consequência da sialorreia inclui-se dermatite facial e perioral (YANG et al., 2006; WILKEN, ASLAMI, BACKES, 2008; BLOEM et al., 2009), com aumento das infecções periorais e orais, maceração da pele, halitose, dificuldade de higiene, riscos de aspiração (ELLIES et al., 2002a; HEINEN, 2008; JANKOVIC, 2008; WILKEN, ASLAMI, BACKES, 2008; HORNIBROOK e COCHRANE, 2012). A maceração da pele pode está ao redor da boca, queixo e pescoço e podem infectar-se secundariamente por bactérias (MARINA et al., 2008; NEVILLE et al., 2009) e por fungos, como *Candida albicans* (MENINGAUD et al., 2006).

Pode causar também asfixia (BHATIA, MÜNCHAU, BROWN, 1999); desidratação por perda de fluidos, eletrólitos e proteínas (MENINGAUD et al., 2006; ALREFAI, ABURAHMA, KHADER, 2009); alterações nutricionais (MARINA et al., 2008); dificuldades para falar (MENINGAUD et al., 2006; ALTER, 2010); infecção do trato aéreo superior (ALTER, 2010); afogamento por causa das aspirações recorrentes (ISAÍAS e DARÍO, 2009); e riscos de infecções pulmonares, inclusive pneumonia aspirativa (BHATIA, MÜNCHAU, BROWN, 1999; ELLIES et al., 2002a; HEINEN, 2008; WILKEN, ASLAMI, BACKES, 2008; ISAÍAS e DARÍO, 2009;

MANRIQUE e SATO, 2009; ALTER, 2010). Aspira o pulmonar cr nica tem uma considerável morbidade, principalmente pelas recorrentes infec es secundárias do trato respiratório inferior (VIJAYASEKARAN et al., 2007). Sialorreia persistente pode colocar uma pessoa em risco de vida (MARINA et al., 2008).

A constante perda de fluídos através do excesso de saliva pode originar uma urina mais concentrada, além de constipa o (obstipa o) (HEINEN, 2008). Deve-se relatar também e imersão por saliva de roupa de cama, roupas, brinquedos, livros escolares, e, em indivíduos com menos comprometimento cognitivo, a autoconsciência e a depressão (MANRIQUE, 2005b; MENINGAUD et al., 2006; HORNIBROOK e COCHRANE, 2012); limita es de atividades (M LLER et al., 2011); perdas na fun o mastigatória (MENINGAUD et al., 2006), além de estresse ao cuidador (M LLER et al., 2011). Tudo isso deteriora ainda mais o quadro clínico, aumentando a morbidade e mortalidade destes pacientes, gerando um grande impacto na vida dos pacientes, levando ao isolamento social do mesmo e de seus familiares (ELLIES et al., 2002a). Todos estes sinais e sintomas associados   sialorreia convergem para qualidade de vida e a prática dos cuidados paliativos destes pacientes (HEINEN, 2008).

2.4. Tratamentos da Sialorreia

Algumas causas de sialorreia são transitórias ou leves e não necessitam de tratamento. Já o tratamento da sialorreia em pacientes com desordens neurológicas se faz necessário pelos riscos de agravo que a mesma oferece ao paciente. Os tratamentos mais comuns propostos são o uso de medica o anticolinérgica, terapia oromotora e procedimentos cirúrgicos (SAVARESE et al., 2004).

Na literatura existem várias formas de tratamento para a sialorreia, a qual envolve uma abordagem multidisciplinar para trabalhar a fala, postura, consciência oromotora e sensorial (HORNIBROOK e COCHRANE, 2012). Os tratamentos convencionais incluem a fonoterapia (CRYSDALE, 1980); fisioterapia motora orofacial e terapia de comportamento (AUGUSTO e PEREZ, 2006; FAIRHURST e COCKERILL, 2011); o tratamento cirúrgico (MANRIQUE, BRASIL, RAMOS, 2007; FAIRHURST e COCKERILL, 2011; BAVIKATTE, SIT, HASSOON, 2012); e o

tratamento farmacológico incluem drogas anticolinérgicas, agentes anti-histamínicos (ALTER, 2010; MENDES et al., 2010; FAIRHURST e COCKERILL, 2011; BAVIKATTE, SIT, HASSOON, 2012); β -bloqueadores, agentes antirrefluxo (TSCHENG, 2002;); drogas antiparkison para pacientes com parkinsonismo (MANRIQUE, 2005b); e adesivos transdérmicos de escopolamina (MESSNER, 2009). Atualmente, até um tratamento esclerosante com oleato de etanolamina foi proposto (ABBAS et al., 2013).

Outros tratamentos menos convencionais incluem a radioterapia das glândulas salivares (BORG e HIRST, 1998; CORSO et al., 2011; BAVIKATTE, SIT, HASSOON, 2012); aparelhos ortopédicos intraorais (COSKUM et al., 2007; FAIRHURST e COCKERILL, 2011); aparelhos eletrônicos como o “ISMAR” – *Innsbruck Sensorimotor Activator and Regulator* (JOHNSON et al., 2004); e até tratamento de acupuntura (WONG, SUN, WONG, 2001). O tratamento da hipersalivação é de grande importância e faz parte do atendimento multidisciplinar desses pacientes (CRYSDALE et al., 2006; ALREFAI, ABURAHMA, KHADER, 2009). Mas nem sempre todas as formas de tratamento estão ao alcance dos pacientes ou são tão eficientes.

Os tratamentos para hipersalivação incluem terapêuticas comportamentais, farmacológicas sistêmicas e cirúrgicas, mas não são tão eficientes, e carecem de evidências que comparem diretamente as diferentes modalidades de tratamento (HASSIN-BAER et al., 2005). Em terapias de fisioterapia oromotora, o tratamento é de valor limitado em crianças severamente retardadas ou que babam profusamente. Em relação aos aparelhos ortopédicos, poucos profissionais são experientes na sua aplicação e não existem dados claros de quais pacientes se beneficiariam de tais dispositivos (AUGUSTO e PEREZ, 2006).

No tratamento com radiação, não há relatos de problema de pele (BORG e HIRST, 1998), mas a xerostomia é um dos efeitos colaterais conhecidos (AUGUSTO e PEREZ, 2006), assim como pode induzir malignidade, mucosite e retardo de crescimento em crianças, não sendo indicado para as mesmas (TRUONG e BHIDAYASIRI, 2008), e nem sempre está disponível.

As substâncias farmacêuticas anticolinérgicas, tais como a atropina, benzotropina, escopolamina, cloridrato benzexol e cloridrato de glicopirrolato, são opções de tratamento, reduzindo o volume de saliva na cavidade oral, inibindo a

produção de saliva obtendo resultados positivos, pois bloqueiam a ação do sistema nervoso autônomo parassimpático sobre os receptores de acetilcolina das glândulas salivares (ELLIES et al., 2006a; AUGUSTO e PEREZ, 2006; COSKUM et al., 2007; REDDIHOUGH, REID, PLOVER, 2011; BAVIKATTE, SIT, HASSOON, 2012; HORNIBROOK e COCHRANE, 2012).

O uso de anticolinérgicos traz muitos efeitos colaterais sistêmicos, como boca seca, visão turva e retenção urinária (ELLIES et al., 2002b; HEINEN, 2008; TRUONG e BHIDAYASIRI, 2008; ALTER, 2010; HORNIBROOK e COCHRANE, 2012); constipação, diminuição da sudorese e rubor da pele e irritabilidade ou outras alterações comportamentais (BLASCO, 2002); comprometimento cognitivo e sedação (ALTER, 2010); distúrbio de memória (TRUONG e BHIDAYASIRI, 2008), hipotensão ortostática, tontura e confusão mental, especialmente em idosos (BHATIA, MÜNCHAU, BROWN, 1999). A boca seca pode agravar os problemas dentais (SRISKANDAN, MOODY, HOWLETT, 2010). Ainda há aqueles que interferem no sistema cardiovascular (ELLIES et al., 2006b), tais como atropina que pode causar possíveis efeitos secundários graves sobre o coração (COSKUM et al., 2007). Os pacientes frequentemente interrompem estes medicamentos orais (ALTER, 2010), e por isso são raramente indicados. Além disso, a taxa de resposta é variável e imprevisível (HORNIBROOK e COCHRANE, 2012). Muitos pacientes apresentam intolerância aos efeitos adversos das drogas utilizadas, ou apresentam condições clínicas muito avançadas e graves da doença neurológica para que sejam submetidos ao tratamento cirúrgico (MENDES et al., 2010).

Em relação aos tratamentos cirúrgicos realizados, os mais conhecidos são a ablação das glândulas salivares, a neurectomia timpânica, a transposição ou retroposicionamento de ductos excretores e a ligadura dos ductos excretores (ELLIES et al., 2002a; SAVARESE et al., 2004; MANRIQUE, BRASIL, RAMOS, 2007; FAIRHURST e COCKERILL, 2011; BAVIKATTE, SIT, HASSOON, 2012). Entretanto, tais procedimentos cirúrgicos são muito invasivos e estressantes para o paciente, com relato de complicações em 35% dos casos, como o aumento da cárie dental, afecções gengivais, parotidite, cistos e fístulas pós-operatórias (ELLIES et al., 2002b; SAVARESE et al., 2004), além de irreversíveis (HEINEN, 2008). No caso de neurectomia timpânica bilateral com secção do nervo corda do tímpano, por exemplo, destroem a inervação parassimpática da glândula, reduzindo a secreção

salivar, mas produz uma perda do paladar nos dois terços anteriores da língua (NEVILLE et al., 2009). Claro que se deve levar em consideração que atualmente novas técnicas cirúrgicas diminuem estes efeitos adversos (HORNIBROOK e COCHRANE, 2012). Este tratamento cirúrgico também não é adequado para a passagem de estados de hipersalivação temporárias, devido as suas consequências permanentes, como as encontradas no decorrer do tratamento de alguns tumores de cabeça e pescoço (ELLIES et al., 1999; ELLIES et al., 2006a).

Estudos demonstram que a redução do fluxo salivar em pacientes com sialorreia tem significativos efeitos positivos na vida diária. A redução do fluxo salivar não deve ser o único alvo em si no tratamento da sialorreia, mas os diversos métodos de tratamentos também devem ser avaliados em relação ao impacto de vida diária do paciente (BURG et al., 2006).

Na verdade, as indicações para tratamentos mais invasivos, só devem existir em caso de persistência da salivação após 6 meses de tratamento invasivo, ou quando a sialorreia é considerada de nível moderado ou severo, ou então para pacientes cuja função cognitiva impede a sua participação em terapias funcionais (AUGUSTO e PEREZ, 2006). A escolha da intervenção para tratar a hipersalivação deve levar em consideração a facilidade de acessibilidade e risco de efeitos adversos. Diante disso, atualmente a toxina botulínica tem sido utilizada no tratamento da sialorreia (SAVARESE et al., 2004; LAGALLA et al., 2009; INTISO, 2012), através da aplicação local da droga por injeção intraglandular.

2.5. Toxina Botulínica

Historicamente, há mais de 100 anos, a toxina botulínica esteve associada apenas à paralisia muscular secundária à intoxicação alimentar, produzindo uma doença com risco de vida neurológico chamada “botulismo”, caracterizada por uma grave paralisia muscular generalizada e bloqueio autonômico colinérgica (INTISO, 2012). Esta toxina tornou-se foco de interesse para fins terapêuticos na década de 1920, mas somente na década de 50 o primeiro lote de toxina botulínica cristalizada foi produzida (CARRUTHERS e CARRUTHERS, 2005). Desde a década de 70, quando houve a introdução da toxina botulínica como uma ferramenta terapêutica,

seu uso aumentou exponencialmente (ZALVAN et al., 2004; MAJID, 2010), para fins estéticos e médicos (YOUNIS et al., 2013). Foi a primeira toxina bacteriana utilizada como um medicamento (MAJID, 2010).

Em 1997, a formulação da toxina botulínica (BTX, TxB ou BoNT) tornou-se familiar (CARRUTHERS e CARRUTHERS, 2005; BHAYANI e SUSKIND, 2008). Ao longo de um período de menos 100 anos, a neurotoxina botulínica (BoNT ou BTX) evoluiu de um veneno para uma ferramenta clínica versátil com uma crescente variedade de usos (TSUI, 1996; MARCHESE et al., 2008). A sua aplicabilidade tem como grandes vantagens o fato de seus efeitos serem transitórios, não destrutivos, dependente da dose e localização da área alvo, com o mínimo de efeitos secundários sistêmicos (MARCHESE et al., 2008).

Inicialmente um sorotipo da toxina botulínica (tipo A) foi aprovada e regulamentada pelos Estados Unidos e Canadá, provocando enorme expansão e aceitação do seu uso, mas cientificamente baseado em experiência clínica, demonstrando eficácia (CARRUTHERS e CARRUTHERS, 2005).

As neurotoxinas são produzidas pela *Clostridium botulinum*, uma bactéria gram-positiva anaeróbia, que produz vários tipos sorológicos de toxina (A, B, C1, D, E, F e G), como uma mistura complexa de polipeptídicos neurotóxicos e componentes não tóxicos de proteínas, sendo as do tipo A e B que estão disponíveis para uso médico e são comercializadas (SPOSITO, 2004; POULAIN et al., 2008; SPOSITO, 2009), com um claro predomínio de sorotipo A. O tipo A é o mais poderoso dos 7 tipos e foi o primeiro a ser desenvolvido para uso clínico. O sorotipo F também têm demonstrado efeitos benéficos nos seres humanos (CARRUTHERS e CARRUTHERS, 2004; COBO et al., 2009). Existem ainda alguns autores que citam um oitavo sorotipo da toxina botulínica, o C2 (BHAYANI e SUSKIND, 2008). Os sorotipos podem ser abreviados de BTX-A a BTX-G.

Outras espécies de bactérias menos conhecidas também produzem a toxina botulínica, como as bactérias *Clostridium butyricum*, *Clostridium argentinense* e *Clostridium baratii* (POULAIN et al., 2008).

Embora todos os sorotipos de neurotoxina botulínica inibam a liberação de acetilcolina (atuam como agentes anticolinérgicos), compartilhando a capacidade de bloquear a neurotransmissão na junção neuromuscular, eles atuam através de

diferentes alvos de proteínas intracelulares, exibem diferentes durações de efeito e tem diferentes potências (CARRUTHERS e CARRUTHERS, 2004; JONGERIUS et al., 2004b; SPOSITO, 2004). Esses sorotipos de neurotoxina botulínica diferem na sua biossíntese, em seus mecanismos celulares de ação e no tamanho do complexo de neurotoxina, no entanto, eles não são intercambiáveis e seus perfis clínicos variam (CARRUTHERS, 2002; CARRUTHERS e CARRUTHERS, 2004).

Como recurso terapêutico, a toxina botulínica foi liberada para administração em paciente pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 1989 para estrabismo (SPOSITO, 2004; INTISO, 2012), classificando-a como droga segura e eficaz para o tratamento dos distúrbios do movimento. Em 1990, o consenso do *National Institutes of Health* inclui a toxina botulínica tipo A na lista dos medicamentos seguros e eficientes (SPOSITO, 2004).

Atualmente, existem no mercado internacional, diferentes preparações comerciais de toxina botulínica do tipo A: *Botox*[®] (Allergan Pharmaceuticals, Inc., Irvine, CA), *Dysport*[®] (Speywood Pharmaceuticals Ltd, Maidenhead, United Kingdom), *Prosigne*[®] (Lanzou Institute of Biological Products, Gansu, China) e *Xeomin*[®] (Mertz Pharmaceuticals GmbH, Frankfurt, Germany). Todas elas são produtos biológicos, tem diferentes formulações e potências requerendo diferentes dosagens (SIMPSON et al., 2008; MAJID, 2010; PAGAN e HARRISON, 2012). Do sorotipo B existem as marcas Americana, a *Myobloc*[®] (Solstice Neurosciences, San Francisco, CA) e *Neurobloc*[®] (Eisai, Tokyo, Japan) (CARRUTHERS e CARRUTHERS, 2004; BHAYANI e SUSKIND, 2008; MAJID, 2010).

A formulação americana é a mais antiga e utilizada como padrão, servindo de base de comparação para as novas formulações que surgem no mercado farmacêutico, devido a seu perfil de segurança e sua eficácia (RIEDER et al., 2007). A mesma utiliza como diluente de liofilização estabilizante, a albumina humana (SPOSITO, 2004).

A *Prosigne*[®] é uma recente formulação lançada no Brasil, produzida por empresa farmacêutica estatal chinesa (*Lanzhou Institute of Biological Products – LIBP*), e possui o diferencial de utilizar na liofilização a gelatina bovina, prometendo alta pureza e estabilidade e baixa toxicidade. A gelatina utilizada com um estabilizador durante liofilização da BTX-A tem como vantagem oferecer maior estabilidade à estrutura química da toxina; aumentar sua resistência à deformação e

preservar sua toxicidade; evitar risco de infecção sanguínea; aumentar a estabilidade da toxina, com menor poder de difusão; aumentar a segurança da droga; e pouca reação alérgica. É a única com a certificação *prions free* (SPOSITO, 2004; CRISTÁLIA, 2006; SPOSITO, 2010). Também está relacionado com uma possível maior toxicidade (TANG e WAN, 2000), 1U = DL₅₀ de 0,04 ng (SPOSITO, 2010). Em cada frasco de *Prosigne*[®] de 50 ou 100 U teremos 5 mg de gelatina, 25 mg de sacarose e 25 mg de dextrana (SPOSITO, 2010). No Brasil, a ANVISA liberou a BTX-A da marca *Prosigne*[®] em 2003 para uso clínico, sendo este produto também comercializado em outros países como a Coreia, Hong Kong, Índia, Ucrânia, Kuwait, Peru, Indonésia e Filipinas (FERREIRA et al., 2009).

Além do mais, a marca *Prosigne*[®] tem um custo 8 a 10 vezes menor que a marca considerada padrão ouro, o *Botox*[®] (TANG e WAN, 2000). Os estudos de Rieder et al. (2007) e Wu et al. (2011), compararam a toxina botulínica padrão ouro (*Botox*[®]) com a toxina botulínica tipo A de origem chinesa (*Prosigne*[®]), usadas para blefaroespasma e espasmo hemifacial, e concluíram que os resultados de ambas são parecidos e eficientes. Como o tratamento com BTX-A possui um alto custo, o uso da toxina de origem chinesa é interessante também de um ponto de vista da “farmacoeconômico”. Ainda segundo Rieder et al. (2007), existe a necessidade de futuros estudos para explorar ainda mais a comparabilidade das duas diferentes formulações.

Em relação à imunogenicidade, a toxina botulínica é capaz de suscitar uma resposta imune, uma vez que são proteínas estranhas ao organismo, podendo resultar no desenvolvimento de anticorpos que bloqueiam os efeitos terapêuticos da droga (anticorpos neutralizantes) (CARRUTHERS, 2002; INTISO, 2012). O risco de desenvolver os anticorpos neutralizantes parece ser reduzido com as atuais apresentações da droga (COBO et al., 2009).

O uso da toxina botulínica ampliou-se, tendo mais de 50 aplicações, que inclui o uso cosmético, gastroenterológico, otolaringológico, geniturinário, neurológico e dermatológico (VERHEYDEN, BLITZER, BRIN, 2001; ZALVAN et al., 2004; NAUMANN et al., 2012), para alívio de dores (AMANTÉA et al., 2003; GALVÃO, 2009; BRASIL, 2012; EMARA et al., 2013), ou ajudar na cicatrização, como as que ocorre na fissura anal (AMARO e DUARTE, 2009).

Em glândulas salivares, pode ser utilizada não só com a finalidade de diminuir a sialorreia, mas como meio radioprotetor das glândulas salivares em casos de radioterapia de cânceres localizados na cabeça e no pescoço (LEÓN, LEÓN, BRAVO, 2011), em rânulas (CHOW, CHAN, LAM, 2008); sialocele (LEÓN, LEÓN, BRAVO, 2011); fístulas salivares (ELLIES et al., 2001; CAPACCIO et al., 2007; LEÓN, LEÓN, BRAVO, 2011); sialectasia (GUNTINAS-LICHIUS e JUNGEHÜLSING, 2002); parotidite crônica e recorrente (ELLIES et al., 2004); estenose do ducto salivar (KRUEGEL et al., 2010); sialorreia em atresia de esôfago (THEVASAGAYAM, GAN, EKSTEEN, 2008); para tratamento de complicações cirúrgicas de glândulas salivares (MARCHESE-RAGONA et al., 2005); além de síndromes que possuem entre seus sinais clínicos a hipersalivação, como a síndrome de Frey ou sudorese gustatória (CANTARELLA et al., 2010), síndrome de Charge (BLAKE, MacCUSPIE, CORSTEN, 2012).

Dessa forma, o uso da toxina botulínica abre um amplo campo de possibilidade de aplicações terapêuticas em várias patologias, graças ao aumento do conhecimento das propriedades dessa droga (LEÓN, LEÓN, BRAVO, 2011), e dessa forma sua aplicação na sialorreia.

2.5.1. Gelatina Bovina como Veículo para a BTX-A

A gelatina de origem animal é um produto obtido da hidrólise parcial da proteína colágeno, sendo a maior e a principal proteína estrutural no tecido conjuntivo da pele e dos ossos. Está contida em inúmeros produtos que usamos em nossa vida diária. Para medicamentos, a mesma possui a vantagem de baixíssimo potencial alergênico, alto grau de biodisponibilidade e afinidade com o tecido das células (GELITA DO BRASIL, 2013). A fonte para o processo de obtenção da gelatina de origem animal pode ser a pele suína (gelatina tipo A) ou originar-se a partir da pele e do osso bovino (gelatina tipo B) (SEGTMAN et al., 2003). Desperta grande interesse por ser uma matéria-prima abundante e de custo relativamente baixo para obtenção e produção (MORAES et al., 2008).

Como veículo para a toxina botulínica tipo A, a gelatina de origem bovina promove à droga um menor poder de difusão, conferindo maior segurança, em

relação às drogas que utilizam a albumina humana, já que esta última possui um grande poder de difusão tecidual. Em relação ao poder alergênico da gelatina, não existe nenhum estudo que comprove que a associação gelatina-toxina botulínica produz maior efeito adverso, não se podendo afirmar que há maior grau de alergia à gelatina. Também não é capaz de transmitir doenças infectocontagiosas, como doenças sexualmente transmissíveis, HIV, HTVL, Hepatite B e C, ou seja, não tem capacidade de transmitir doenças priônicas, pois a gelatina é certificada como “*prion free*” (CRISTÁLIA, 2006).

2.5.2. Mecanismo de Ação da Toxina Botulínica

As toxinas produzidas pela bactéria *Clostridium Botulinum* são uma mistura de proteínas contendo a toxina botulínica e várias proteínas não-tóxicas. A neurotoxina botulínica consiste em um polipeptídeo de cadeia dupla, com uma cadeia pesada e uma cadeia leve unidas por uma ligação covalente dissulfídica, protease-sensível, e por ligações não covalentes, com massa molecular de aproximadamente 150kD, sendo ativada quando a cadeia polipeptídica é proteoliticamente quebrada nas cadeias pesada (100kD) e leve (50kD). A cadeia pesada é responsável pela ligação da molécula ao terminal simpático; já a cadeia leve desempenha ação bloqueadora da acetilcolina, pois a mesma atua como uma enzima (protease), que quebra uma das proteínas de fusão da vesícula que contem acetilcolina à membrana pré-sináptica no terminal nervoso (SPOSITO, 2004).

Para que ocorra a exocitose da acetilcolina, existe uma cadeia de transportes das vesículas contendo este neurotransmissor nos terminais nervosos. As proteínas SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor* [NSF] – o fator solúvel N-etilmaleimida-sensitivo anexado ao complexo proteico receptor), são componentes essenciais desta maquinaria de exocitose, onde três proteínas SNARE estão envolvidas: proteínas associadas a membrana plasmática sintaxina, proteína SNAP-25 e a proteína vesicular sinaptobrevina (VAMP – vesicle-associated membrane protein) (ZALVAN et al., 2004; ALTER, 2010).

Quando a BTX-A é injetada na glândula, a cadeia pesada liga-se às glicoproteínas encontrada especificamente em terminais nervosos colinérgicos (é

razão da elevada seletividade da toxina botulínica) (SPOSITO, 2004). A toxina botulínica tipo A, por ser uma protease dependente de zinco, atua através da desativação das SNAP-25, proteínas citoplasmáticas de fusão das vesículas sinápticas que contém acetilcolina com a membrana plasmática (BLITZER e SULICA, 2001; ELLIES et al., 2003b). Por ser uma enzima, existe uma elevada especificidade da BTX-A para a proteína SNAP-25 (SPOSITO, 2004). A sequência da sua ação inclui: difusão, neurotropismo, ligação, internalização e toxicidade intracelular que é exercida pela alta afinidade da toxina com os receptores específicos do terminal pré-sináptico (JANKOVIC, 2004; SPOSITO, 2004).

Esse processo produz uma “desnervação” química funcional localizada, por bloqueio da liberação de acetilcolina das terminações nervosas de neurônios motores, sem que haja efeitos sistêmicos (SPOSITO, 2004; CARVALHO, SHIMAOKA, ANDRADE, 2011). Todas as toxinas botulínicas produzidas promovem bloqueio pré-sináptico temporário de terminais nervosos colinérgicos, bloqueando a liberação de acetilcolina (ACh) na fenda pré-sináptica de junções neuromusculares (JNM) e junções neuroglandular (JNG) (ALTER, 2010). Desta forma, não permite a despolarização do terminal pós-sináptico, pois impede a passagem do impulso nervoso. A toxina age seletivamente no terminal nervoso periférico colinérgico, inibindo a liberação de acetilcolina (SPOSITO, 2004).

Após a ligação do terminal nervoso com receptores proteicos chamados SV2, localizados na membrana plasmática da parte não mielinizada do terminal nervoso (COBO et al., 2009), evidencia-se a internalização depois de 20 minutos, tornando-se máxima após 90 minutos (GÖSCHEL et al., 1997).

Os efeitos clínicos podem ocorrer em um período de 1 a 7 dias após a administração, sendo comumente notados entre 1 e 3 dias. Segue-se um período que varia entre 1 a 2 semanas de efeito máximo (CARVALHO, SHIMAOKA, ANDRADE, 2011), ou pico máximo por volta da 4ª semana após a aplicação (ALTER, 2010), e então os níveis atingem um patamar moderado até a recuperação completa do neurônio, voltando a capacidade de secretar neurotransmissor em torno de um mês (BLITZER e SULICA, 2001; COBO et al., 2009). Tornar-se totalmente funcional em um período de 3 a 6 meses (MISRA, 2002; SPOSITO, 2004; CARVALHO, SHIMAOKA, ANDRADE, 2011), variando de acordo com o paciente (ALTER, 2010).

O processo de recuperação funcional do terminal nervoso após a injeção de toxina não é totalmente compreendido, sugerindo-se brotamento colateral de novos terminais, ao lado do terminal nervoso principal (SPOSITO, 2004; CARRUTHERS e CARRUTHERS, 2005). Mas pode ser que esses novos terminais sejam apenas transitórios e a neurotransmissão seja restaurada ao estado anterior (CARRUTHERS e CARRUTHERS, 2005).

Alguns autores afirmam que por volta do 28º dia após a aplicação, o principal terminal nervoso começa lentamente a recuperar sua capacidade de liberar neurotransmissores (BLITZER e SULICA, 2001), provavelmente através da síntese de nova proteína SNAP-25, e pela involução dos brotamentos (SPOSITO, 2004). Já outros autores afirmam que o brotamento de novas terminações nervosas inicia-se no prazo de 2 meses (MØLLER et al., 2011), ou que o crescimento de novos axônios terminais seja iniciado dias após o bloqueio, até a constituição de novas sinapses, levando em torno 5ª e a 10ª semanas para se completar, e, permitindo assim, a recuperação da transmissão colinérgica, o que justifica a temporalidade da proposta clínica (COBO et al., 2009). Em alguns estudos experimentais com ratos, após a aplicação da droga, a mesma atingiria seu auge no 12º dia, tendo o término do feito por volta do 35º dia (WEN, YUAN e HOU, 2009). Lembrando que a toxina botulínica tipo A não afeta diretamente a síntese, o armazenamento da acetilcolina ou a condução de sinais elétricos ao longo da fibra nervosa (SPOSITO, 2004).

Em suma, a ação da toxina botulínica envolve quatro etapas: a – ligação específica pela cadeia pesada à receptores na membrana pré-sináptica dos nervos colinérgicos; b – endocitose, internalização dependente de energia; c – translocação da cadeia leve, do endossomo ácido para o citosol; e d – clivagem enzimática, pela cadeia leve, de proteínas específicas que são críticas para a fusão entre a vesícula pré-sináptica da acetilcolina com a membrana pré-sináptica (JANKOVIC, 2004).

2.6. Toxina Botulínica e Sialorreia

Recentemente, a toxina botulínica tipo A começou a ser experimentada, com bons resultados, em novas indicações clínicas. Algumas delas já estão regulamentadas em alguns países, outras em fase de aprovação e outras ainda são

experimentações em nível de pesquisa científica. As indicações do tratamento com BTX-A dividem-se em três grandes grupos, musculoesquelético, sistema nervoso autônomo e sensorial, de acordo com o órgão alvo de ação do produto (GAMA, 2010). O uso terapêutico da toxina botulínica tem se expandido consideravelmente, sendo utilizada em várias especialidades médicas.

Os primeiros estudos sobre o uso terapêutico da toxina botulínica datam de 1973. No início da década de 80, iniciaram-se os estudos em humanos (AMANTÉA et al., 2003). O uso da toxina na sialorreia baseou-se numa publicação que datava de 1923, onde Dickson e Shevsky observaram que o nervo timpânico, o qual estimula a salivação, era bloqueado em gatas infectadas pelo *Clostridium botulinum* (DICKSON e SHEVSKY, 1923; ELLIES et al., 1999; SAVARESE et al., 2004). Atualmente, as toxinas botulínicas se tornaram bem estabelecidas como agentes terapêuticos eficazes para o tratamento de numerosas doenças, como distonia, dor crônica entre outras (INTISO, 2012). O tratamento da sialorreia é feito por razões estéticas, sociais e médicas (TRUONG e JOST, 2006; BAVIKATTE, SIT, HASSOON, 2012).

Diante das complicações apresentadas com os procedimentos cirúrgicos e medicação anticolinérgica para o tratamento da sialorreia, o tratamento farmacológico através da aplicação da toxina botulínica tipo A ou B em glândulas salivares pode ser uma grande ajuda (SAVARESE et al., 2004; LAGALLA et al., 2009; INTISO, 2012). A BTX-A é capaz de deprimir a atividade secretora das glândulas salivares (ELLIES et al., 2004), como uma paralisia neurosecretora das glândulas (BOTHWELL et al., 2002).

Desde 1997, a toxina botulínica tipo A passou a ser descrita como método eficaz de tratamento da sialorreia em pacientes adultos com distúrbios neurológicos, sob a forma de injeção intraglandular, e este recurso terapêutico foi instituído para sialorreia em nove pacientes com doença de Parkinson apresentando redução da secreção de saliva em 89% dos casos. A partir destes dados, foram realizados estudos com objetivo de tratar tais sintomas em crianças com paralisia cerebral e outras distúrbios neurológicos (SAVARESE et al., 2004). A eficácia da ação da BTX-A para sialorreia foi constatado por dados objetivos, como a diminuição do número de babadores usados para higienização do paciente, escala de aspiração de saliva ou mesmo por dados subjetivos relatados pelo cuidador do paciente

(SAVARESE et al., 2004). Desta forma, ficou claro que a toxina funciona para redução do fluxo de saliva (LIM et al., 2006; TIIGIMÄE-SAAR et al., 2012), muito embora, tais dados sejam apenas clínicos.

Muitos autores afirmam que o uso da toxina botulínica tipo A para sialorreia é seguro e eficaz (ELLIES et al., 2002a; ELLIES et al., 2002b). A *Academia Europeia de Neurologia* afirmou que a toxina botulínica deve ser considerada uma opção de tratamento (ALTER, 2010). Dessa forma, o uso da toxina botulínica é cada vez mais indicado, pois é eficaz e os resultados são menos demorados do que a terapia comportamental, também possui menos efeitos colaterais sistêmicos do que medicações anticolinérgicas, além de não possuir os riscos dos tratamentos cirúrgicos. Entretanto, seu uso ainda é pequeno, pois essa droga apresenta alto custo, e o tratamento, muitas vezes, requer injeções repetidas (BOTHWELL et al., 2002), ou aumento das doses (GOK et al., 2013). A toxina botulínica pode ser utilizada em pacientes que apresentam evidências crônicas de sialorreia, sem resposta à terapia comportamental ou médica (BHAYANI e SUSKIND, 2008).

Não há provas claras que o tipo A seja clinicamente mais eficiente que a toxina botulínica tipo B, ou em qual das duas glândulas (parótida e submandibular) pode ser mais vantajosa (LIM et al., 2006). Embora, alguns autores afirmarem que a aplicação na glândula submandibular seja mais eficiente (KALF et al., 2007). A glândula sublingual é raramente injetada (TRUONG e JOST, 2006).

São vários os estudos clínicos, com ou sem placebo, guiados ou não por ultrassonografia, que apontam a melhora dos sinais e sintomas da sialorreia, em injeções percutâneas intraglandulares nas parótidas e submandibulares (SAVARESE et al., 2004; BHAYANI e SUSKIND, 2008; ALREFAI, ABURAHMA, KHADER, 2009). As aplicações podem ser feitas em adultos ou em crianças, levando a diminuição da secreção salivar, trazendo benefícios aos pacientes e familiares (GERLINGER et al., 2007; BREHERET et al., 2011; JEUNG, 2012; ÇIFTÇI et al., 2013). Em pacientes pediátricos, frequentemente se faz necessário a injeção em glândulas parótidas e submandibulares bilateralmente para obter uma redução eficaz da sialorreia, necessitando de anestesia geral, o que pode aumentar o custo e o risco de complicações e efeitos colaterais (HASSIN-BAER et al., 2005).

A injeção pode ser feita na glândula submandibular, na parótida ou em ambas, simultaneamente. Injetar apenas as glândulas submandibulares em vez das

glândulas parótidas parece uma abordagem promissora, uma vez que as glândulas submandibulares são as principais responsáveis pela maior parte da produção da saliva não estimulada (KALF et al., 2007). Todavia, é importante salientar que quando a aplicação da BTX-A se faz apenas na glândula submandibular, o *pool* excessivo de saliva pode manter-se na cavidade oral pelo fluxo compensatório da glândula parótida (ERASMUS et al., 2011).

Em relação ao ultrassom, que muitas vezes é utilizado na aplicação da droga, este é útil não só para isolar as glândulas salivares, mas para evitar atingir os músculos adjacentes envolvidos na mastigação e deglutição. Geralmente é utilizado o ultrassom de tireoide e a injeção de ambos os pares de glândulas bilateralmente resulta em melhor sucesso. Uma agulha de insulina de 0,5 cm é recomendada para fazer a aplicação da toxina. Com esta pequena agulha, a glândula pode ser facilmente injetada, evitando aplicar a BTX-A inadvertidamente em qualquer um dos músculos subjacentes (ALTER, 2010), e evitando todas as áreas vasculares mais profundas da glândula (BANERJEE, GLASSON, O'FLAHERTY, 2006; GERLINGER et al., 2007), eliminando complicações na aplicação. Além de auxiliar na localização das glândulas, a ultrassonografia auxilia na visualização da dispersão da toxina através da glândula (AUGUSTO e PEREZ, 2006). A utilização do ultrassom torna a aplicação da BTX-A um método seguro que garante um efeito clínico ideal e evita possíveis efeitos colaterais prejudiciais (JONGERIUS et al., 2003).

Vale ressaltar, entretanto, que nem sempre os aparelhos de ultrassonografia são de fácil acesso (LEE et al., 2010). Porém, na ausência do aparelho ultrassonográfico, a aplicação da toxina pode ser feita pela palpação direta da glândula salivar (ALTER, 2010) e por sua localização anatômica (LEE et al., 2010).

Seus efeitos duram, na maioria dos casos, em torno de 3 a 4 meses, mas ainda há um grupo de pacientes em que o efeito dura mais de seis meses (ELLIES et al., 2004; ELLIES et al., 2006b; CH, 2010). Alguns autores afirmam que a BTX-A em glândulas salivares possuem um efeito mais prolongado, quando comparado com outros tecidos, ainda que reversível (SHAN et al., 2013). A duração de ação limitada é considerada por alguns como uma desvantagem por exigir, em algumas doenças crônicas, uma reaplicação (MENDES et al., 2010). Durações maiores de efeito estão relacionadas a doses também maiores, porém, nesses casos, pode-se ter reações adversas de boca seca (xerostomia) e disfagia (GAMA, 2010). Uma nova

aplicação não é recomendada antes de completar 3 meses da última dose (ALTER, 2010). Na verdade, a dosagem deve ser personalizada para problema clínico do paciente e a gravidade do problema (ALTER, 2010).

Apesar da duração limitada de sua ação, a injeção intraglandular de toxina botulínica tipo A é um procedimento pouco invasivo, relativamente indolor e rápido, com discretos ou nulos efeitos colaterais locais ou sistêmicos, constituindo uma ótima alternativa de tratamento (BHAYANI e SUSKIND, 2008; MENDES et al., 2010; GOK et al., 2013), melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

Pouco se sabe dos reais efeitos colaterais da aplicação da BTX-A em glândulas salivares, pois na literatura corrente os estudos são com amostras de tamanhos pequenos e não identificam claramente estes possíveis efeitos adversos (BHAYANI e SUSKIND, 2008). Como o efeito da toxina é temporário, todas as possíveis complicações são reversíveis, não acarretando maiores problemas aos pacientes (AMANTÉA et al., 2003), e para reduzir a probabilidade de uma resposta secundária, a toxina só deve ser aplicada quando os sintomas levarem a comprometimentos clínicos e nas menores doses possíveis (HELMSTAEDTER et al., 2008).

O paciente deve ser informado a respeito do cuidado dental e oral devido à salivagem reduzida (TRUONG e JOST, 2006), pois, com a diminuição do fluxo salivar pode ocorrer xerostomia, infecções intraorais, aumento do índice de cárie dentária, tártaros e doenças periodontais, como gengivite e periodontite (AMANTÉA et al., 2003; GERLINGER et al., 2007). Segundo Kruegel et al. (2010), em casos de ligeira sensação de pressão na glândula durante as refeições, ou início de inchaço, o paciente pode realizar uma massagem sobre a glândula. A secreção residual de saliva diminui alguns destes efeitos colaterais à nível bucal (GERLINGER et al., 2007).

Como se sabe, a toxina botulínica inibe seletivamente os componentes colinérgicos, mas a inervação adrenérgica é deixada intacta (ELLIES et al., 2004). Por isto, é importante ressaltar que a aplicação de toxina botulínica em glândula salivar evita xerostomia, pois a atividade secretora basal (secreção residual de saliva) é mantida através da inervação adrenérgica (CAPACCIO et al., 2007; GERLINGER et al., 2007). Esses efeitos são explicados pela dupla inervação das glândulas salivares (ELLIES et al., 2004).

Podem ocorrer reações locais após a migração da toxina. Em aplicações nas glândulas salivares, no local pode ocorrer sangramento, infecção, inclinação facial temporária (CH, 2010), e em caso de injeção em músculos vizinhos, pode causar dificuldades de deglutição (JONGERIUS et al., 2003; CH, 2010; REDDIHOUGH et al., 2010). Também foi relatado sialorreia aumentada transitória, fraqueza na mastigação, inchaço glandular secundário a injeção de grandes volumes, boca seca ou xerostomia (REDDIHOUGH et al., 2010) e sialodenite aguda com sialolitíase submandibular (YUAN e SHELTON, 2011). Efeitos adversos sistêmicos após a administração de BTX-A incluem náusea, fraqueza muscular, fadiga, mal-estar, irritação e sintomas gripais (NAUMANN et al., 2006).

A sedação e analgesia, com uma combinação de creme anestésico tópico, e o gás de óxido nitroso, por via oral, podem ser suficientes para permitir que o processo seja bem tolerado pelo paciente (BANERJEE, GLASSON, O'FLAHERTY, 2006). Entretanto, alguns autores recomendam anestesia geral para determinado grupos de pacientes (GOK et al., 2013), principalmente em crianças, sendo uma desvantagem para essa opção terapêutica (JONGERIUS et al., 2004b).

Outra questão relevante está na repetitividade da aplicação, pois os autores acreditam na possibilidade de haver efeitos em longo prazo depois de repetidas doses e ressaltam a necessidade de estudos detalhados nesse ramo (REDDIHOUGH et al., 2010).

Jongerius et al. (2003), preconiza que para garantir o espalhamento da toxina por todo o parênquima glandular, que a mesma seja injetada em dois pontos da glândula, ou em uma injeção mais profunda e que ocorram pequenos derrames da droga na media em que a seringa for sendo retirada.

Embora temporária, a duração da ação da BTX-A para redução do fluxo salivar é satisfatória. Pela escassez de trabalhos na literatura, pouco se sabe sobre os efeitos da toxina botulínica tipo A sobre glândulas salivares em longo prazo (VASHISHTA et al., 2013), e da combinação de glândulas salivares injetadas no mesmo paciente (JONGERIUS et al., 2004b), bem como a dose ideal para alcançar os resultados ideais (VASHISHTA et al., 2013), com o mínimo de efeitos adversos para os pacientes.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Observar aspectos morfométricos, histológicos, histométricos e histoquímicos das glândulas submandibulares de ratas tratadas com toxina botulínica tipo A (BTX-A).

3.2. Objetivos Específicos

a – Mensurar o peso e comprimentos longitudinal e transversal de glândulas submandibulares de ratas tratadas com BTX-A;

b – Avaliar através da microscopia óptica os aspectos histométricos das glândulas salivares submandibulares tratadas com BTX-A;

c – Caracterizar histoquimicamente a distribuição de colágeno e glicoproteínas em glândulas salivares submandibulares de ratas tratadas com BTX-A;

d – Analisar a distribuição de colágeno por microscopia de polarização em glândulas submandibulares de ratas tratadas com BTX-A.

4. HIPÓTESES

H0 – O uso do *Prosigne*[®] não altera a organização estrutural das glândulas submandibulares de ratos;

H1 – O uso do *Prosigne*[®] altera a organização estrutural das glândulas submandibulares de ratos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Tipo, Caracterização e Localização do Estudo

O estudo do tipo experimental, descritivo, analítico quantitativo foi realizado no laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob o processo de número 23076.045320/2012-52 (anexo I).

5.2. Obtenção e Cuidados com os Animais

Foram utilizadas 80 glândulas salivares submandibulares de 40 ratas (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*), fêmeas, adultas saudáveis da linhagem Wistar, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e mantidos no Biotério da Pós-graduação em Cirurgia Experimental da UFPE.

Os animais foram alimentados com uma dieta padrão para roedores do biotério (Nuvital[®] – Nuvilab), com livre acesso a comida e água, e mantidos em gaiolas apropriadas, com temperatura de 22 ± 2 °C, com ciclo claro/escuro de 12/12 horas e aclimatados um mês antes da realização dos procedimentos, segundo recomendação ética do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e do *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*. Todas as manipulações experimentais foram realizadas entre 8:00 e 10:00 horas.

5.3. Definições dos Grupos de Estudo e Tratamento dos Animais

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos:

- Grupo I: 14 glândulas submandibulares, as quais não foram submetidas a tratamento (grupo controle negativo);
- Grupo II: 34 glândulas submandibulares tratadas com a gelatina bovina (Gelita do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil);
- Grupo III: 32 glândulas submandibulares tratadas com a toxina botulínica tipo A (BTXA) – *Prosigne*[®] (*Prosigne*[®], Cristália, China).

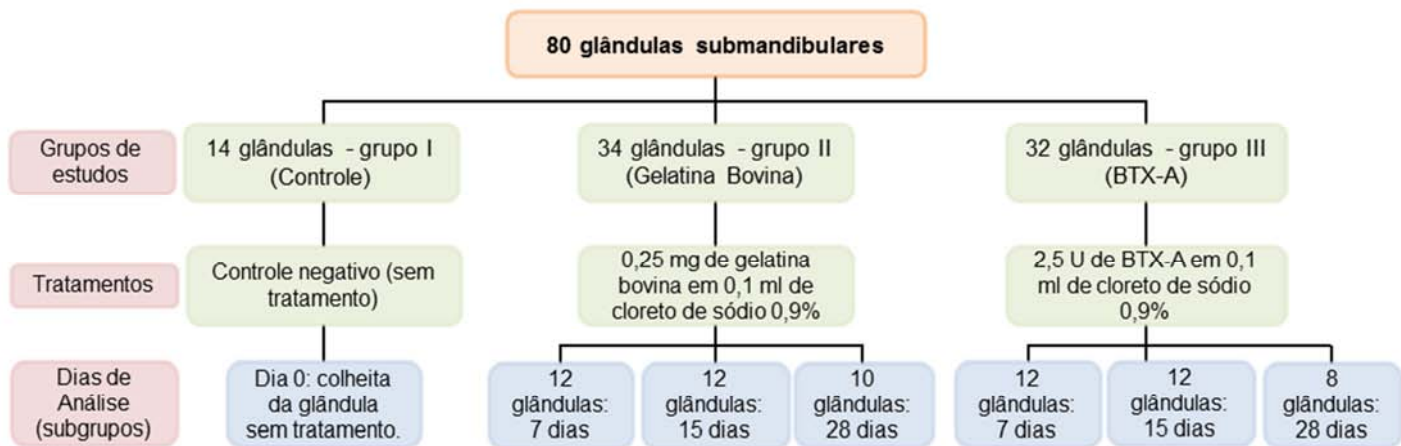
Inicialmente, os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (10 mg/kg de peso – Ketamin[®]) e cloridrato de xilazina (0,5 mg/kg de peso – Anasedan[®]), associados na mesma seringa e administrados por via intramuscular. Após anestesia, foi realizada antissepsia da região cervical dos animais com clorexidina 2 %, e administrada a injeção intraglandular de 0,25 mg de gelatina bovina (Gelita do Brasil Ltda.) diluída em 0,1 ml de cloreto de sódio 0,9% na glândula submandibular direita e esquerda dos animais do grupo II, em dose única.

Nos animais do grupo III, as glândulas submandibulares direita e esquerda de cada animal receberam dose única de injeção intraglandular com 2,5 U de toxina botulínica tipo A (*Prosigne*[®], Cristália, China), reconstituída em 0,1 ml de solução de cloreto de sódio 0,9 %. A diluição da droga em solução salina 0,9 % seguiu rigorosamente a técnica, evitando-se o borbulhamento e agitação do diluente sobre a toxina (ELLIES et al.,1999; ELLIES et al., 2000; ELLIES et al., 2006a). As aplicações da gelatina bovina e da toxina botulínica tipo A foram realizadas pelo método palpatório e pela localização anatômica da glândula submandibular.

Após a aplicação da gelatina bovina e da BTX-A, os dois grupos (II e III) foram subdivididos em 3 subgrupos cada, de acordo com o dias em que as glândulas submandibulares foram analisadas após o tratamento. Grupo com glândulas removidas e analisados 7 dias após as aplicações (12 glândulas tratadas com gelatina bovina e 12 glândulas tratadas com BTX-A); Grupo com glândulas removidas e analisadas 15 dias após as aplicações (12 glândulas tratadas com gelatina bovina e 12 glândulas tratadas com BTX-A); e Grupo com glândulas

removidas e analisadas 28 dias após as aplicações (10 glândulas tratadas com gelatina bovina e 8 glândulas tratadas com BTX-A).

5.3.1. Organograma da distribuição dos grupos de estudo:



5.4. Colheita e Processamento do Material

Nas respectivas datas de cada subgrupo (7, 15 e 28 dias após aplicação da droga), os animais foram pesados e anestesiados com injeção intramuscular de xilazina e quetamina conforme descrito anteriormente, e em seguida perfundidos por via intracardíaca, inicialmente em solução de cloreto de sódio 0,9 % heparinizados (Hemofol[®], Cristália, São Paulo, SP, Brasil), e posteriormente com formaldeído 10 % (obtido a partir do paraformaldeído 4 %), com auxílio de uma bomba de infusão contínua (Harvard Apparatus), conforme descrito por Baratella-Evêncio, Arana-Chavez e Katchburian (1999).

Após a perfusão, foi realizada antissepsia da região cervical dos animais com clorexidina a 2 %, seguida de incisão cervical mediana com lâmina de bisturi n.º 15, divulsão dos tecidos com tesoura de ponta romba, exposição da glândula submandibular, e posteriormente sua excisão (sialoadenectomia bilateral). Após o procedimento de coleta dos espécimes, os animais foram descartados seguindo as normas do COBEA.

5.5. Estudo Morfométrico das Glândulas Salivares

As glândulas excisionadas foram imediatamente pesadas em uma balança de precisão com sensibilidade de 0,001 g (BL320H[®], Marte Científica, São Paulo, SP, Brasil). Os comprimentos longitudinal e transversal das glândulas foram obtidos através de um paquímetro digital com acurácia de 0,05 mm (Paquímetro Digital 150 mm, Shan, China Digital Caliper). Para registro, foram realizadas fotos obtidas através de câmera digital (Sony Cybershot DSC-W320[®] 14.1 Megapixels, Sony Brasil Ltda., São Paulo, SO, Brasil).

5.6. Confeção das Preparações Histológicas

Imediatamente após a aferição das medidas macroscópicas das glândulas, as mesmas foram mergulhadas em solução de formaldeído 10 % (obtido a partir do paraformaldeído 4 % – PFA 4 %, em PBS – solução tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH 7.2) durante 24 horas à temperatura ambiente com movimento giratório, sendo posteriormente mantidos em geladeira a 4 °C por 16-20 horas. Após a fixação, o material foi encaminhado para processamento, através da técnica histológica convencional na seguinte sequência: desidratação em concentrações crescentes de etanol (70 % a 100 %, por 40 minutos cada), diafanização com xilol (dois banhos de 40 minutos cada), embebição (3 banhos de 40 minutos cada) e inclusão em parafina (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983; TOLOSA et al., 2003; TIMM, 2005).

Cortes histológicos semi-seriados foram obtidos com aproximadamente 5 µm, através de um micrótomo LEICA RM 2125 RT (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Alemanha), utilizando-se navalha LEICA 818. Os cortes foram estirados em banho-maria histológico ANCAP, dispostos em lâminas untadas com albumina de Mayer, colocados em estufa J PROLAB 102 por aproximadamente 30 minutos a 37°C para secagem do material. Os espécimes foram corados pela hematoxilina e eosina (HE), tricrômico de Gomori (TG), ácido periódico de Schiff (P.A.S), alcian blue (pH 2,5 para sialomucinas), e picrossirius red (PCS), montados em Entellan[®] (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) (TOLOSA et al., 2003; TIMM, 2005; BONDUKI et al., 2009).

5.7. Estudo Histométrico

As preparações histológicas coradas em hematoxilina e eosina (HE) foram observadas e fotografadas em um microscópio binocular de luz LEICA ICC50 HD[®] acoplado a uma câmera digital, conectado a um computador contendo uma placa de captura de imagem (ATI) através do *software* de captura Leica LAS EZ[®] (Leica Microsystems, Buffalo Grove, USA) nos aumentos de 10x, 40x e 100x. As imagens obtidas possuem 2048 pixels de largura por 1536 pixels de altura (3.145.728 pixels total de resolução).

A análise histométrica se deu através de medições realizadas em imagens digitais obtidas e em objetiva de 40x. A calibração do programa foi realizada utilizando uma fotomicrografia no mesmo aumento (40 x) de uma régua micrométrica de 0,01 mm LEICA (50 mm – Referência 10310345), onde 627 pixels corresponderam a 100 micrômetros.

Foram obtidos 10 registros (10 campos diferentes) para cada porção da glândula (porção serosa e mucosa) através de coordenadas aleatórias para o posicionamento desses quadros de contagem, tomando apenas o cuidado desses campos serem os mais completamente preenchidos com tecido glandular e evitando a sobreposição com áreas já digitalizadas.

O *software* para histometria Image J[®] (National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA), em código fonte Java, de domínio público, foi utilizado para mensuração do diâmetro médio dos ácinos e espessura da parede ductal, através de uma contagem do número de pixels e conversão em micrômetros.

Em cada campo, foi escolhido apenas um ácino e um ducto estriado com secção transversal e circunferência circular, nos quais foram verificados o diâmetro médio de ácinos serosos e mucosos, e espessura média da parede de ductos estriados, tanto na porção mucosa quanto na porção serosa da glândula submandibular. Para obtenção do diâmetro médio dos ácinos e espessura da parede ductal, foram tomados dois registros para cada ácino selecionado (um vertical e outro horizontal) e quatro medidas em cada ducto estriado, respectivamente.

5.8. Estudo Histoquímico para Fibras Colágenas e Material Glicoproteico

Os cortes histológicos destinados à evidenciação das fibras colágenas foram corados pelo tricrômico de Gomori (TG). Para evidenciação de material glicoproteico, foram utilizadas as colorações alcian blue (pH 2,5 para sialomucinas) e o ácido periódico de Schiff (P.A.S) (TOLOSA et al., 2003). Foram feitas imagens digitais conforme o item 5.7., seguida de uma análise qualitativa.

5.9. Análise de Fibras Colágenas em Microscopia de Polarização

Para esta análise do colágeno, as preparações coradas pelo picrossirius red (SWEAT, PUCHTLER, ROSENTHAL, 1964), foram observadas através da fluorescência emitida pelo tecido, utilizando um microscópio polarizado Olympus BX40[®] (Olympus Corporation, Tokyo, Japão), e capturados pelo *software* Image Analysis[®] (Olympus Corporation, Tokyo, Japão). As imagens foram trabalhadas em ambiente Windows 7 Ultimate[®].

5.10. Análise Estatística

Os dados morfométricos e histométricos foram tabulados em planilha do programa Microsoft Office Excel 2013 para Windows (Microsoft Corporation) e em seguida submetidos aos testes de normalidade (teste de Shapiro-Wilks) e de homogeneidade de variância (teste Levene) para determinar a parametricidade dos dados. Em seguida foram analisados pelos Teste t (*Student t Test*), teste Análise de Variância (ANOVA), Mann-Whitney U Test e Kruskal Wallis, de acordo com os dados.

O *software* "R", versão 3.0.2 para Windows (R Foundation for Statistical Computing, 2013) e o *software* SPSS (Statistical Package for Social Science – PASW[®] Statistics 18. Inc., Chicago, IL) foram usados para a realização das análises. Todas as conclusões levaram em consideração o nível de significância de 0,05 (5%).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho são descritos em função dos achados observados no 7^o, 15^o e 28^o dias após a aplicação da toxina botulínica tipo A e do seu veículo.

Foram utilizadas as glândulas submandibulares para o estudo do tratamento com toxina botulínica, pois, segundo Kalf et al. (2007), apesar dessas glândulas serem cerca da metade do volume da glândula parótida, as mesmas produzem em torno de 70 % da saliva seromucosa. Dessa forma, a utilização apenas da glândula submandibular parece ser uma abordagem promissora, merecendo mais atenção para avaliar os méritos desta estratégia de tratamento.

Segundo Lee et al. (2011), não existem estudos com humanos que verifique possíveis alterações na estrutura parenquimatosa e estromal de glândulas tratadas com BTX-A. A maioria dos estudos existentes são ensaios clínicos (SHAN et al., 2013), mas de pouca informação, apesar de seus resultados globais serem promissores (MAJID, 2010).

Diante das complicações clínicas dos pacientes que apresentam a sialorreia, é necessário tratamento. Muitas opções estão disponíveis atualmente, mas em geral, ou são pouco eficientes, ou trazem efeitos colaterais graves, ou ainda, podem ser irreversíveis, o que se torna inadequado para alguns pacientes. Dessa forma, tem-se realizado uma intensa busca por um tratamento eficiente, pouco invasivo, reversível e de baixo custo para o paciente. Neste sentido, toxina botulínica tipo A, torna-se uma ótima opção terapêutica e a da marca *Prosigne*[®], por apresentar a gelatina bovina como veículo, possui boa segurança e custo mais baixo.

Após excisão da glândula (sialoadenectomia), pode-se observar macroscopicamente que a aplicação da toxina BTX-A e da gelatina bovina não induziram a inflamação ou necrose da mesma. A cápsula conjuntiva mostrou-se bem preservada, e a glândula possui porções serosas e mucosas bem evidentes em todos os grupos analisados (figura 1).



Figura 1: Glândula submandibular de rato. Observar as porções serosa (s) e mucosa (asterisco).

Morfométricamente foram obtidas a descrição estatística das médias gerais do peso e comprimentos (longitudinal e transversal) das glândulas (tabela 1). Ao aplicar o teste ANOVA no grupo III (BTX-A), observou-se que não houve diferença entre os três subgrupos em relação ao peso ($p = 0,055$), comprimento longitudinal ($p = 0,086$) e comprimento transversal ($p = 0,397$) das glândulas (tabela 1). No grupo II, que recebeu gelatina bovina, houve diferença significativa entre os três subgrupos no comprimento longitudinal ($p = 0,030$) comprimento transversal ($p = 0,025$), sendo que a glândula apresentou dimensões menores no 15º dia após o tratamento (14,427 mm e 8,522 mm, respectivamente no 15º dia), aumentando em seguida no 28º dia (16,016 mm e 9,825 mm, respectivamente no 28º dia). Para o peso das glândulas ($p = 0,146$) não houve diferenças significativas (tabela 1).

Ao compararmos as médias do grupo I (controle) com o grupo III (tratado com BTX-A) no 7º dia após a aplicação da droga, através do teste *t de student*, verificou-se um aumento no peso (controle com 0,246 g e BTX-A 7 dias com 0,303 g, $p = 0,014$) e no comprimento transversal (controle com 7,709 mm e BTX-A 7 dias com 8,453 mm, $p = 0,031$) das glândulas tratadas com BTX-A. O mesmo ocorreu com o peso da glândula com 15 dias após o tratamento com BTX-A (controle com 0,246 g e BTX-A 15 dias com 0,294 g, $p = 0,027$). No 28º dia, o peso e comprimentos voltaram a diminuir, sem diferenças relevantes com o grupo I (tabela 2).

Já na comparação entre os subgrupos de gelatina bovina (grupo II) com o grupo I, houve diferença significativa no 7º e 28º dias após a injeção da gelatina. Houve aumento no peso, comprimento longitudinal e comprimento transversal do grupo II em relação ao grupo I. Ao compara-se as médias entre os subgrupos

tratados com BTX-A e com gelatina bovina, houve aumento, com diferença significativa, para as três variáveis de estudo no grupo tratado com gelatina apenas 28º dia (tabela 2).

Tabela 1: Média e Desvio Padrão do Peso (g), Comprimento Longitudinal (mm) e Comprimento Transversal (mm) das Glândulas Submandibulares.

Grupos	N	PG	CLG	CTG
Controle*	14	0,246 ± 0,0421 g	13,867 ± 1,5454 mm	7,709 ± 0,7633 mm
BTX-A**	7 dias	12 0,303 ± 0,0660 g	14,726 ± 1,2125 mm	8,453 ± 0,8928 mm
	15 dias	12 0,294 ± 0,0620 g	14,326 ± 1,0863 mm	8,252 ± 0,5269 mm
	28 dias	8 0,260 ± 0,0523 g	13,539 ± 1,0483 mm	7,941 ± 1,0214 mm
¹ p-valor		p = 0,055	p = 0,086	p = 0,397
Gelatina***	7 dias	12 0,332 ± 0,0672 g	14,818 ± 0,7882 mm	9,092 ± 0,7828 mm
	15 dias	12 0,290 ± 0,0733 g	14,427 ± 1,2100 mm	8,522 ± 1,3420 mm
	28 dias	10 0,353 ± 0,0865 g	16,016 ± 1,9624 mm	9,825 ± 0,9281 mm
¹ p-valor		p = 0,146	p = 0,030	p = 0,025

¹p-valor do teste da ANOVA (se p-valor < 0,05 as médias entre os dias difere significativamente). PG – Peso da glândula (g); CLG – Comprimento longitudinal da glândula (mm); CTG – Comprimento transversal da glândula (mm). *Grupo I; **Grupo III; ***Grupo II (gelatina de origem bovina).

Na literatura médica os poucos estudos experimentais existentes, não realizaram análises morfométricas das glândulas salivares dos animais tratados com a BTX-A. Como foi dito, a toxina botulínica causa uma desnervação química parassimpática das glândulas salivares. Efeito parecido pode ser alcançando com a secção do nervo corda do tímpano, como o estudo realizado por Ekstrom e Reinhold (2001). Estes autores seccionaram o nervo corda do tímpano de ratos e evidenciaram uma diminuição do peso da glândula parótida. Em outro estudo semelhante realizado em ratos, Kang et al. (2010), após a desnervação cirúrgica da glândula submandibular, notaram nítida diminuição do se peso.

Tabela 2: Comparação Morfométrica entre os Grupos I (Controle), III (BTX-A) e II (Gelatina Bovina) com 7, 15 e 28 dias após a administração da droga.

Dias / Grupo	Grupo: Controle X BTX-A			Grupos: Controle X Gelatina			Grupos BTX-A X Gelatina		
	PG	CLG	CTG	PG	CLG	CTG	PG	CLG	CTG
07	p=0,014*	p=0,133	p=0,031*	p=0,001*	p=0,160	p=0,000*	p=0,300	p=0,827	p=0,76
15	p=0,027*	p=0,398	p=0,085	p=0,70	p=0,320	p=0,65	p=0,870	p=0,832	p=0,843
28	p=0,476	p=0,600	p=0,550	p=0,001*	p=0,007*	p=0,000*	p=0,018*	p=0,005*	p=0,001*

PG – Peso da glândula (g); CLG – Comprimento longitudinal da glândula (mm); CTG – Comprimento transversal da glândula (mm). (*): $p < 0,05$.

Coskum et al. (2007), que realizaram uma investigação histopatológica e imaginológica através de ultrassonografia da glândula submandibular direta de ratos sob influência da toxina botulínica tipo A. Pela análise ultrassonográfica verificaram as dimensões medial-lateral e anteroposterior no plano axial, comprimento periférico e vascularização das glândulas. As glândulas tratadas com BTX-A foram verificadas com 14 e 28 dias após o tratamento e evidenciaram que o tamanho da glândula foi reduzido no grupo tratado. No grupo tratado o tamanho das glândulas com 28 dias foram menores do que no grupo com 14 dias, sugerindo que a injeção intraglandular de BTX-A interfere na estrutura da glândula, promovendo uma atrofia glandular. Relatam ainda que isto acontece sem interferir na estrutura celular, como resultado de um efeito funcional, devido à diminuição da secreção. No geral, espera-se que por volta do 28º dia, a glândula retorne as condições anteriores à aplicação da toxina botulínica, uma vez que, segundo Blitzer e Sulica (2001), no 28º dia após o bloqueio da terminação nervosa principal, o mesmo começa lentamente a recuperar sua capacidade de liberar neurotransmissores, provavelmente através da síntese de nova proteína SNAP-25 (proteína envolvida na exocitose da acetilcolina).

Resultado semelhante foi observado em um estudo realizado por Lee et al. (2011), que utilizaram tomografia computadorizada para verificar a morfologia da glândula salivar submandibular após 3 semanas da aplicação da BTX-A, em 8 pacientes com tetraplegia e hemiplegia espástica, demonstrando melhora da salivação e redução significativa de suas dimensões. Portanto, acredita-se que a diminuição das glândulas salivares pode contribuir para a redução da salivação excessiva. Teymoortash et al. (2007) e Wen, Yuan, Hou (2009), também evidenciaram que após a aplicação de BTX-A, houve redução do peso da glândula submandibular.

Diferentemente do que ocorreu nos trabalhos de Coskum et al. (2007), Teymoortash et al. (2007), Wen, Yuan, Hou (2009) e Lee et al. (2011), em nosso estudo, ficou claro que houve um aumento no peso das glândulas com 7 e 15 dias após o tratamento com BTX-A. Talvez estas diferenças com os trabalhos de Coskum et al. (2007) e Lee et al. (2011), sejam devido as diferenças metodológicas usadas nos dois trabalhos, uma vez que nos estudos destes autores, foram utilizados exames imaginológicos, enquanto que o utilizado neste trabalho foi exame de mensuração direta sobre as glândulas. Já Teymoortash et al. (2007) utilizaram três

protocolos, aplicando só toxina botulínica tipo A, só toxina botulínica tipo B ou uma mistura do tipo A com o tipo B, tendo uma redução significativa no grupo tratado com toxina botulínica tipo B. Além do mais, deve-se ter em mente que ambos utilizaram a formulação americana, que trás como veículo a albumina humana, enquanto que nós utilizados a toxina botulínica liofilizada em gelatina bovina (SPOSITO, 2010), e segundo o laboratório Cristália (2006), a mesma apresenta menor poder de difusão.

O aumento do peso e comprimentos (longitudinal e transversal) da glândula com 7 dias após a aplicação da BTX-A e da gelatina bovina, também pode se explicar pelo fato de que, segundo Reddihough et al. (2010), edema glandular secundário a injeção de grandes volumes pode ocorrer como efeito adverso do tratamento com toxina botulínica. Neste contexto, também é importante a observação feita por Mann (1994), que descreveu um edema bilateral das glândulas parótidas como um efeito colateral após o tratamento unilateral de distonia cervical com toxina botulínica.

É possível que a diferença significativa entre o peso da glândula nos grupos I e III com 15 dias após a administração da droga, se deva ao fato de que seja por volta deste período de tempo que o efeito da droga sobre o tecido glandular esteja no auge, pois no período entre 1 a 2 semanas, a BTX-A está em efeito máximo (CARVALHO, SHIMAOKA, ANDRADE, 2011), e os ácinos estejam retendo maior material secretor. A partir daí os níveis atingem um patamar moderado até a recuperação completa do nervo em um período entre 3 a 6 meses (MISRA, 2002; SPOSITO, 2004). Com base nessa informação, acreditamos que em nosso trabalho, a volta ao estado anterior para todas as variáveis no grupo tratado com toxina ao 28º dia após o tratamento, se deva a diminuição do efeito da droga.

Foi observado histologicamente, que em todos os grupos estudados, a estrutura parenquimatosa mostrou-se envolta por estroma de tecido conjuntivo, que envia septos delimitando-os em lóbulos. Os septos interlobulares continham vasos sanguíneos e porções de ductos interlobulares. Cada glândula apresentou porções serosas e mucosas distintas. Em todos os grupos verificou-se que a porção serosa apresenta ácinos serosos e sistema ductal mostrando secções de ductos intercalados, granulosos, estriados e excretores. A porção mucosa mostrou porções secretoras mucosas, mistas e sistema ductal também com ducto intercalar, estriado e excretor (figura 2).

Os ácinos serosos apresentaram-se com tamanho e forma variados, ora sendo esféricos, outras vezes ovoides ou alongados. Suas células apresentavam citoplasma bem corados pela hematoxilina-eosina, contendo grânulos de secreção acidófilos na porção apical. O núcleo, localizado na região basal da célula, mostrou-se arredondado e fortemente basófilo (figuras 2, 3 e 4).

Os ácinos mucosos se mostraram maiores que os ácinos serosos, com células volumosas, citoplasma claro, pouco corado pela hematoxilina-eosina e seus núcleos, também na região basal, apresentando cromatina densamente distribuída e formato achatado. Entretanto, em maior proporção foram evidenciadas porções secretoras mistas, nas quais, semiluas serosas (crescentes de Gianuzzi) envolviam parcialmente a região terminal das porções secretoras mucosas (figuras 2, 3 e 4).

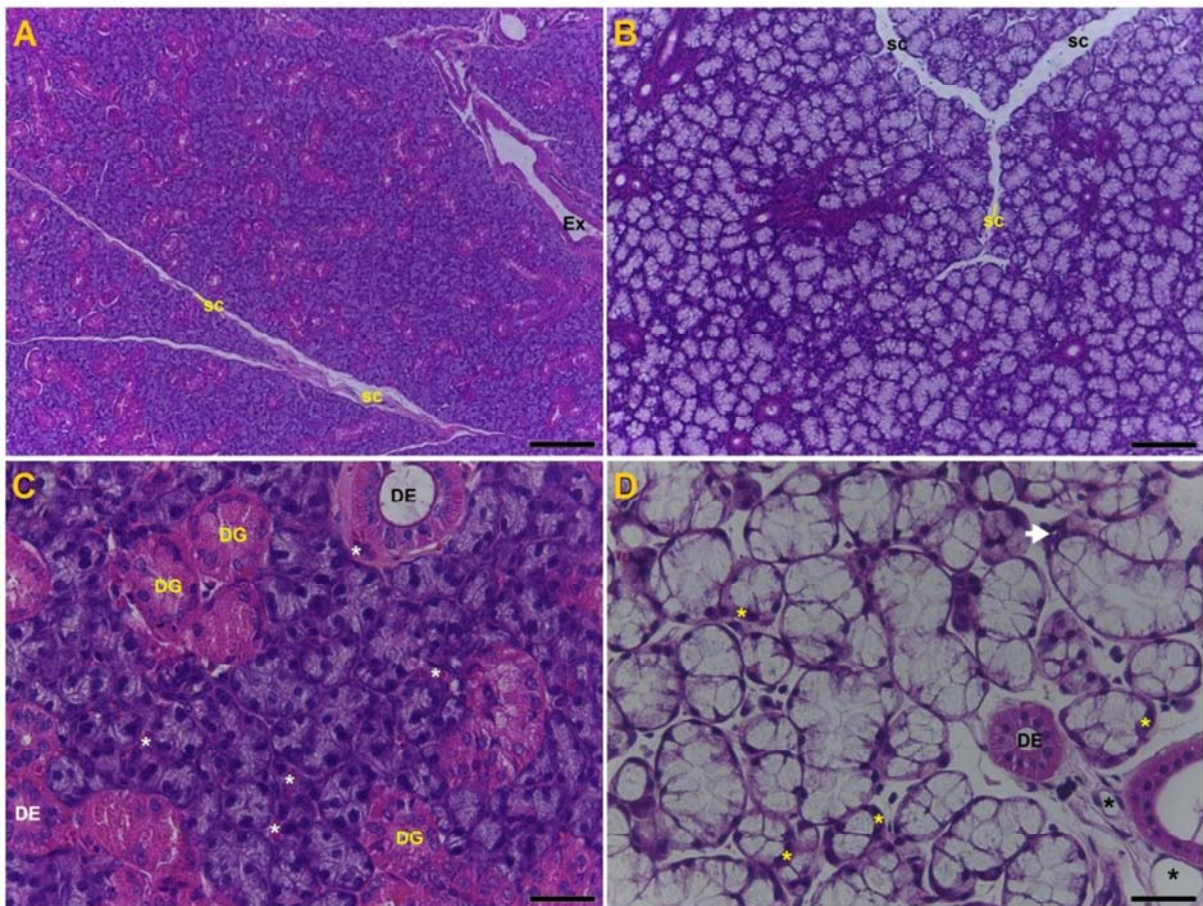


Figura 2: Fotomicrografias de porções de glândulas submandibulares de ratos do grupo I (controle), porção serosa (A e C) e porção mucosa (B e D). Em A, observa-se septos conjuntivos (sc) e ducto excretor interlobular (Ex). Os septos conjuntivos (sc) também são vistos em B. Em C, observamos entre os ácinos, os ductos granuloseos (DG); ductos estriados (DE); vasos sanguíneos (asteriscos pretos). Em C e D, observe os ductos estriados (DE); vasos sanguíneos (asteriscos pretos); semiluas serosas (asterisco amarelo); e ducto intercalar (seta branca). Barra em A e B = 341 μ m. Barra em C e D = 36 μ m. Coloração: Hematoxilina e Eosina.

Os ductos intercalares mostravam-se pequenos, com células epiteliais baixas, cuja forma variou entre achatado e cubóide, sendo o núcleo arredondado e central ocupando quase todo o volume da célula. Nos três grupos verificou-se que são observadas poucas secções de ductos intercalares. Os ductos granulosos apresentaram-se acidófilos, hora densamente preenchidos por grânulos característicos, hora aparentemente “rompidos” ou descarregados, com seus grânulos fortemente acidófilos degranulados para o lúmen, ou ainda como suas células aparentemente vazias, pouco coradas. Os ductos estriados mostraram-se maiores que os intercalados, com epitélio variando de forma cilíndrica baixa para cilíndrica alta. O núcleo, arredondado, encontrava-se na porção central da célula, sendo o citoplasma acidófilo mais abundante evidenciando estriações basais (figuras 2, 3 e 4). O ducto excretor variou em diâmetro, sendo os menos calibrosos pseudoestratificados e os mais calibrosos estratificados cúbicos, estes evidentes nos septos conjuntivos interlobulares (figura 2).

Ainda, em todos os grupos foram observados linfócitos dispersos no parênquima glandular, sem uma distribuição homogênea, podendo ser vistos próximos aos ductos, entre as células que formam a parede do ducto estriado e granuloso, nos ácinos, e em outras vezes, dispersos por toda a preparação (figuras 3 e 4).

Também foram encontradas vacuolizações citoplasmáticas nas células acinares das porções secretoras serosas e em alguns ductos granulosos e estriados em todos os grupos de estudo. Porém estas vacuolizações se mostraram com distribuição irregular não se apresentando em toda extensão da glândula (figuras 2, 3 e 4).

Ao compararmos histologicamente a porção serosa entre as glândulas, foi observado que os ácinos serosos quando analisados entre os subgrupos de cada grupo não apresentaram diferenças quanto a forma e tamanho (figura 3 e 4). Entretanto, as vacuolizações nos ácinos serosos foram observadas em maior proporção no grupo tratado com BTX-A (grupo III) em relação ao controle (grupo I) e em relação ao grupo tratado com gelatina bovina (grupo II) (figuras 2, 3 e 4). No grupo III, ao 7º e 15º dias após o tratamento, notou-se um maior distanciamento entre os ácinos serosos, os quais voltaram a se tornar mais próximos no 28º dia após o tratamento com BTX-A (figura 3). No grupo II este distanciamento entre os

ácinos serosos foi menos evidente (figura 4). Já ao compararmos histologicamente a porção mucosa entre as glândulas, foi observado que os mesmos não apresentaram diferenças quanto a forma. Entretanto, mostraram-se aparentemente maiores no grupo II, tratado com gelatina bovina (figuras 2, 3 e 4). O sistema ductal situado na porção serosa e mucosa das glândulas submandibulares não apresentaram diferenças histológicas entre os subgrupos estudados (figuras 2, 3 e 4).

A descrição histológica da glândula submandibular de ratos do grupo controle do presente estudo está de acordo com o descrito na literatura (JACOBY e LEESON, 1959; CASTRO, CASTRO e MATHEUS, 1985; FONSECA, CASTRO e MATHEUS, 1989; UTRILLA et al., 1992), exceto pela presença das vacuolizações e os linfócitos.

Em 2003a, Ellies et al., aplicaram BTX-A em glândulas submandibulares e em parótidas humanas, e através de investigação ultrassonográfica, afirmaram não observar alterações importantes no parênquima glandular, porém os mesmos não fizeram estudos histológicos que confirmem tal evidência.

Younis e colaboradores (2013), observaram em seus estudos que os ácinos serosos de glândulas submandibulares de ratos analisados 20 dias após a injeção de BTX-A, apresentaram-se com área basal em uma coloração basófila mais intensa, núcleo mais pronunciado e a aparência citoplasmática com grânulos secretores não estava mais evidente. Os ácinos apareceram com tamanhos reduzidos e estavam em menor número em comparação com os ácinos do grupo controle, ocorrendo aumento do espaço interlobular. Assim sugerimos que o mesmo pode ocorrer com o espaço entre os ácinos (interacinar). Os espaços interacinares mais amplos também foram relatados por Kang et al. (2010), além de observarem graves alterações atróficas em ácinos mucosos e células ductais.

As vacuolizações citoplasmáticas também foram observadas em glândulas parótidas nos grupos controle e tratado dos estudos de Dexheimer (2005), porém, além de ter sido utilizada a glândula parótida, foi realizado em camundongos e o grupo tratado submetido a doses de radiação. Younis et al. (2013), também evidenciaram no citoplasma das células acinares vacúolos extensos e grosseiros, mas apenas no grupo tratado com BTX-A. Em nosso trabalho, o aparecimento dessas vacuolizações pode ser explicado pela sexagem dos animais utilizados

(fêmeas), como possíveis alterações fisiológicas após período gestacional, pois as ratas já tinham passado por uma prenhez prévia.

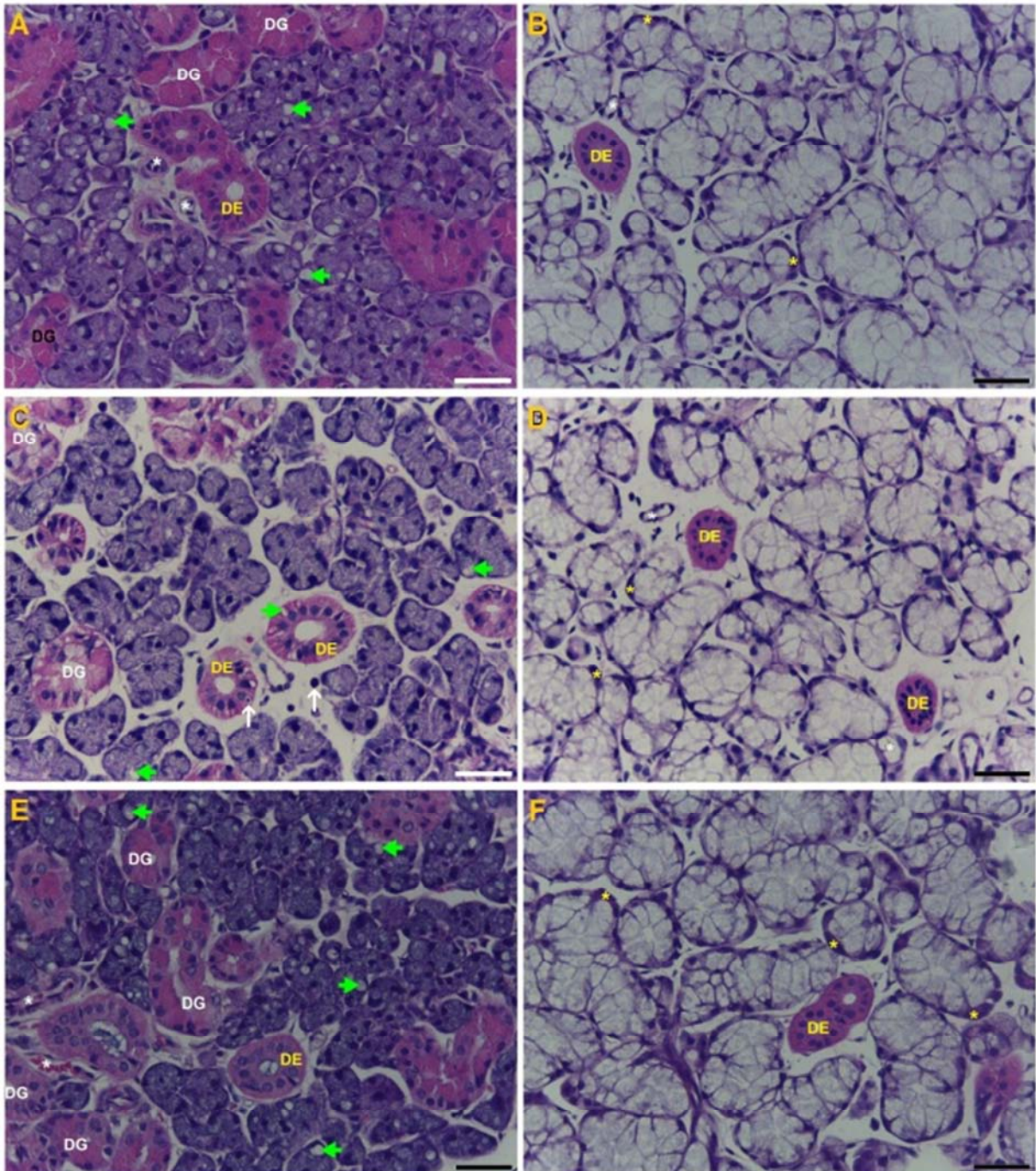


Figura 3: Fotomicrografias de porções de glândulas submandibulares de ratos do grupo tratado com toxina botulínica tipo A (grupo III). BTX-A com 7 dias após a aplicação (A e B). BTX-A com 15 dias após a aplicação (C e D). BTX-A com 28 dias após a aplicação (E e F). Porções serosas (A, C e E) e porções mucosas (B, D e F). Na porção serosa observe entre os ácinos, os ductos granulosos (DG); ductos estriados (DE); vasos sanguíneos (asteriscos brancos); vacuolizações (cabeça de seta verde); e algumas células mononucleadas (seta branca), inclusive em meio as células do ducto estriado. Na porção mucosa observe os ductos estriados (DE); vasos sanguíneos (asteriscos brancos); e semiluas serosas (asterisco amarelo). Barra = 36 µm. Coloração: Hematoxilina e Eosina.

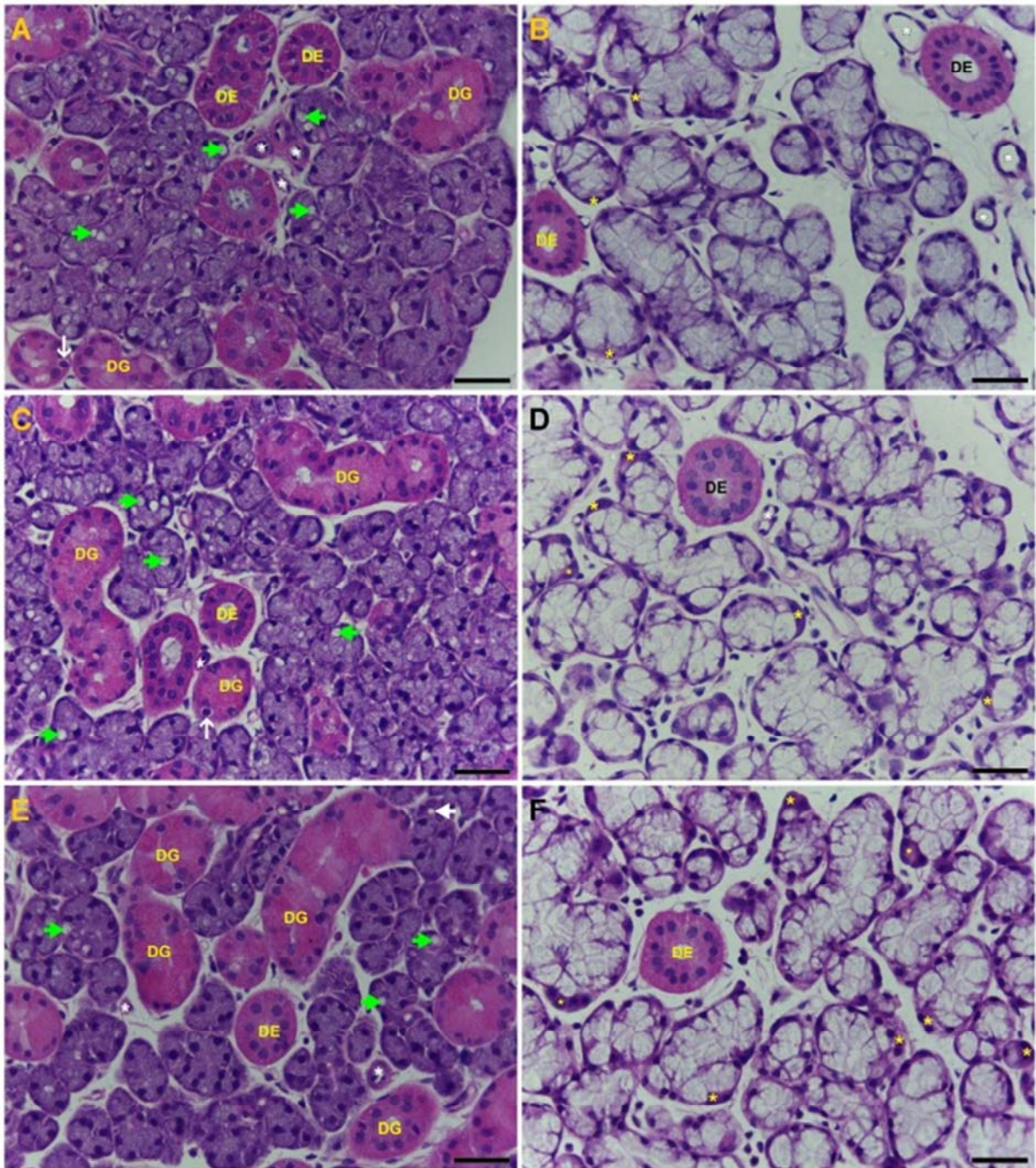


Figura 4: Fotomicrografias de porções de glândulas submandibulares de ratos do grupo tratado com gelatina de origem bovina (grupo II). Grupo tratado com gelatina e analisado 7 dias após a aplicação (A e B). Grupo tratado com gelatina e analisado 15 dias após a aplicação (C e D). Grupo tratado com gelatina e analisado 28 dias após a aplicação (E e F). Porções serosas (A, C e E) e porções mucosas (B, D e F). Na porção serosa observe entre os ácinos, os ductos granulosos (DG); ductos estriados (DE); vasos sanguíneos (asteriscos brancos); vacuolizações (cabeça de seta verde); e algumas células mononucleadas (seta branca); e em E, um ducto intercalar (cabeça de seta branca). Na porção mucosa observe os ductos estriados (DE); vasos sanguíneos (asteriscos brancos); e semiluas serosas (asterisco amarelo). Barra = 36 µm. Coloração: Hematoxilina e Eosina.

Segundo Santos et al. (2001) e Rezende (2012), mulheres grávidas sofrem, dentre as principais alterações orais, de hipersalivação. Dessa forma, pode-se supor

que durante o período gravídico, as glândulas salivares podem intensificar a produção da saliva por um reflexo neurogênico e que após esse período, as organelas responsáveis pela síntese da saliva podem sofrer autofagia, ou a grande quantidade dos grânulos de secreção, podem formar esses vacúolos. Além do mais, o gênero feminino pode influenciar a produção de saliva pela variação hormonal (TSCHEG, 2002). Silva e Melhado (1996) constataram que a progesterona promove um aumento nos ductos granulosos e aumento na quantidade de grânulos de secreção. Ainda segundo Tscheng (2002), as fêmeas também são mais sensíveis aos efeitos de medicamentos xerogênicos. Entretanto, para melhores respostas, necessitam-se de outras metodologias para investigar com maior profundidade a verdadeira natureza dessas vacuolizações citoplasmáticas.

Já na análise ultraestrutural de ácinos serosos de glândulas submandibulares de ratos feitas por Younis et al. (2013), através de microscopia eletrônica de transmissão (MET), os autores afirmaram que os ácinos tratados apresentaram menos grânulos de secreção, alargamento do retículo endoplasmático rugoso (RER), degeneração mitocondrial e núcleos com contornos irregulares. A diminuição do material de secreção foi evidente, com grânulos secretores alterados. Os vacúolos citoplasmáticos foram visualizados, porém os autores não descrevem o seu conteúdo. Algumas destas alterações ultraestruturais também estiveram presentes nas análises de Teymoortash et al. (2007), como alterações e coalescência dos grânulos secretores, com menos material secretor. Além de alterações no RER, Shan et al. (2013), evidenciaram os grânulos secretores de forma semelhante ao descrito por Younis e colaboradores (2013). Dessa maneira, podemos supor que os vacúolos citoplasmáticos se deem pelas alterações e coalescência dos grânulos secretores.

Em relação a presença de linfócitos, Dexheimer (2005), afirma que o aparecimento de linfócitos é comum com o envelhecimento da glândula. Nas pesquisas de Coskun et al. (2007), não foram encontradas alterações relacionadas às células acinares, exceto uma infiltração linfocítica no estroma glandular. Não foi relatada nenhuma alteração histopatológica permanente nas células. No trabalho de Kang et al. (2010), após a desnervação da glândula por neurectomia do nervo corda, também evidenciaram uma infiltração no tecido glandular por células mononucleares. Tais resultados diferem do evidenciado por Yuan, Hou e Wen

(2004), que concluíram não haver nenhuma infiltração celular e necrose em torno de células acinares e ductos das glândulas submandibulares tratadas com BTX-A de origem chinesa, ou seja, sem processo inflamatório.

Alguns estudos, como os de Carpenter et al. (2007) e Yu (1986), sugerem que a presença de células inflamatórias reduzem a secreção das glândulas salivares sem causar qualquer lesão glandular, pois agiriam liberando citocinas, impedindo a liberação de neurotransmissores e, além disso, dessensibilizando as células parenquimatosas.

No grupo I (controle), ao realizar a descrição estatística dos ácinos serosos e mucosos, assim como dos ductos estriados localizados nas duas porções da glândula, ficou evidente que os ácinos mucosos são maiores em relação aos ácinos serosos. O mesmo foi observado nos ductos estriados, tendo parede mais espessa os ductos localizados nas porções mucosas das glândulas (tabela 3).

Tabela 3: Análise descritiva do diâmetro (em micrômetro – μm) dos ácinos e espessura dos ductos no grupo I (controle).

Tipo de Células	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Desvio padrão
Ácinos					
Serosos	30,40	36,80	33,72	33,83	1,87
Mucosos	37,4	44,4	40,04	39,52	2,12
Ductos					
Serosos	13,6	17,6	15,58	15,14	1,23
Mucosos	14,8	19,8	17,38	17,43	1,22

Ao ser avaliado o diâmetro dos ácinos serosos entre os subgrupos (7, 15 e 28 dias após a aplicação da droga), tanto para o grupo III (BTX-A), quanto para o grupo II (gelatina de origem bovina), ao aplicar o teste de ANOVA, verificou-se não haver diferença entre eles (tabela 4). Entretanto, quando comparado os diâmetros dos ácinos serosos entre os grupos pelas respectivas datas de análise após as aplicações das drogas, através do teste *t-student*, verificou-se que os mesmos foram menores no grupo III em relação ao grupo II (tabela 4). Quando comparados com o

grupo I (controle), observou-se pelo teste *t-student* que há diferenças significativas entre os grupos: controle e BTX-A 7 dias ($p = 0,008$); controle e BTX-A 28 dias ($p < 0,001$); e controle e gelatina 28 dias ($p = 0,027$). Nas duas primeiras comparações o controle apresentou uma média significativamente maior; já na última comparação o grupo tratado com gelatina bovina, analisado com 28 dias, possuiu uma média maior.

Tabela 4: Média e desvio padrão do diâmetro do ácinos serosos (em micrômetro – μm) segundo o número de dias de análise e o tipo de tratamento utilizado.

Número de dias da análise	Grupo avaliado		p-valor ²
	Grupo III (BTX-A)	Grupo II (Gelatina Bovina)	
7 dias	31,23±2,50	34,32±2,47	0,006
15 dias	32,18±4,25	35,23±2,49	0,043
28 dias	31,69±2,07	35,71±2,23	<0,001
<i>p-valor</i> ¹	0,300	0,396	-

¹p-valor do teste da ANOVA (se p-valor < 0,05 as médias entre os dias difere significativamente); ²p-valor do teste *t-student* (se p-valor < 0,05 as médias entre grupo III e grupo II diferem significativamente).

Com estes dados histométricos, os quais evidenciaram no grupo III uma diminuição do diâmetro dos ácinos serosos, sugerimos que a toxina esteja interferindo com o mecanismo de síntese e secreção celular causando uma diminuição da atividade transcripcional e traducional de seus componentes proteicos, bloqueando a produção de saliva serosa.

Shan e colaboradores (2013), através de estudos moleculares, propuseram que a falta da acetilcolina causada pela presença da BTX-A nos terminais nervosos, inibe a expressão do receptor muscarínico M3. Diante da diminuição da expressão dos receptores M3, Shan et al. (2013), sugerem que em glândulas salivares, tal fato provoque diminuição do AQP5 (Aquaporina 5) e sua translocação até a membrana apical das células secretoras, diminuindo a secreção de água.

Esta diminuição do diâmetro dos ácinos serosos estão de acordo com Teymoortash et al. (2007), que trataram glândulas submandibulares de ratos com toxina botulínica tipo A, tipo B e tipos A e B simultaneamente, observaram ácinos compactados mais densamente, com forma ligeiramente alongada e a área basal basófila contendo o núcleo mais pronunciado nos ratos tratados com a toxina botulínica do que nos controles, além de relatarem mudanças ultraestruturais nas células acinares, sugerindo que tal fato deva-se a desnervação química da glândula provocada pela inibição da ACh pela toxina botulínica tipo A na junção neuroglandular (LIPP et al., 2003; JONGERIUS et al., 2004b).

Nossos resultados também concordam com os relatados por Yuan, Hou e Wen (2004) e Coskun et al. (2007), ao afirmarem que a toxina botulínica tipo A induz temporariamente atrofia das células acinares. Coskun et al. (2007), afirmam que embora a aplicação da toxina em glândulas de ratos reduza o tamanho das glândulas visualizadas por ultrassonografia, não foi evidenciado alteração histopatológica permanente nas células. Younis et al. (2013), observaram em seus estudos que através da microscopia óptica, os ácinos serosos de glândulas submandibulares de ratos sob ação da BTX-A, além se apresentarem com tamanhos reduzidos, estavam em menor número e mais compactados em comparação com os ácinos do grupo controle.

No entanto, em 2007, Gerlinger et al. em trabalho feito com glândulas submandibulares de coelhos tratadas com toxina botulínica e analisadas dois meses após a aplicação, não evidenciaram alterações histológicas marcantes. Supomos que o tempo decorrido da aplicação da toxina até a análise histológica da glândula foi demasiadamente longo e suficiente para recuperação total do tecido glandular. Ainda, diferentemente dos nossos achados, Ellies et al. (1999), afirmaram não existir diferença histométrica para ácinos serosos de glândulas submandibulares injetadas com a toxina e com o soro fisiológico, embora ambos tivessem uma contagem nuclear ligeiramente superior do que os ácinos do grupo controle. Os autores também observaram fraca imunorreatividade para acetilcolinesterase no grupo tratado, mostrando diminuição da presença de acetilcolina nas junções neuroglandulares.

Estudos semelhantes foram realizados em glândulas parótidas de ratos por Ellies et al. (2000), os quais observaram diferença entre glândulas tratadas com

toxina botulínica tipo A e com solução salina no 7º dia após a aplicação da droga. As glândulas tratadas com a toxina apresentaram uma contagem nuclear menor do que os controles. Todavia, as medidas histométricas realizadas por estes autores, mostraram uma ligeira alteração no volume da célula acinar (inchaço), especialmente no dia 7, resultando em um menor número de núcleos por área da seção, causado pela retenção de produtos de excreção do corpo celular. Este achado difere dos resultados encontrados por Wen, Yan e Hou (2009), que, também utilizaram toxina botulínica em glândulas parótidas, e observaram diminuição da porção acinar.

A reversibilidade da morfologia das porções secretoras são evidentes entre os grupos tratados no nosso experimento, o que está de acordo com Shan et al. (2013), os quais aplicaram toxina botulínica tipo A de origem chinesa em glândulas submandibulares de coelhos, e verificaram que o fluxo salivar vai se recuperando de forma parcial com o tempo, ou seja, a medida que declina a dosagem da droga no local. Em relação as alterações morfológicas, os autores afirmaram que no local da aplicação da droga houve substituição de células ductais e acinares por tecido fibroso. Além disso, as células acinares que rodeavam o ponto da injeção da BTX-A, mostraram-se com tamanhos drasticamente reduzidos, mas que essas alterações atenuaram-se com o passar do tempo.

Na avaliação histométrica dos ácinos mucosos, ao aplicar o teste de ANOVA não houve diferenças significativas entre os diâmetros destes ácinos nos subgrupos do grupo III. Entretanto, a diferença foi relevante entre os subgrupos que receberam a gelatina bovina (p-valor = 0,522 e <0,001, respectivamente), como maior aumento acinar ocorrido do 7º para o 15º dia após o tratamento (tabela 5). Quando comparado o diâmetro dos ácinos entres os subgrupos tratados com BTX-A e com a gelatina de origem bovina, através do teste *t-student*, o resultado foi significativo apenas no 7º dia após o tratamento (p-valor = 0,008), indicando que o grupo III apresentou um diâmetro maior nos ácinos mucosos do que os do grupo II, para este dia (tabela 5). Ao comparar cada subgrupo com o grupo I (controle), verificou-se que só houve diferença significativa entre o grupo controle e subgrupo de gelatina analisado com 7 dias, sendo maiores os diâmetros dos ácinos mucosos do grupo controle (p = 0,007). Nas demais comparações, o teste *t-student* não revelou diferenças significativas.

Não foram encontrados relatos na literatura sobre estes achados da porção mucosa de glândulas submandibulares sob influência da BTX-A. Os ácinos mucosos do grupo III foram maiores que os do grupo controle no 7º e 28º dias após a aplicação da droga, mas sem grandes diferenças significativas. É possível que as porções mucosas tentem compensar a perda de saliva fluida lubrificando em maior proporção a superfície da mucosa oral.

Tabela 5: Média e desvio padrão do diâmetro dos ácinos mucosos (em micrômetro – μm) segundo o número de dias de análise e o tipo de tratamento utilizado.

Número de dias da análise	Grupo avaliado		p-valor ²
	Grupo III (BTX-A)	Grupo II (Gelatina Bovina)	
7	40,98±3,43	37,60±2,03	0,008
15	39,44±5,82	39,25±0,92	0,916
28	41,67±3,57	41,70±2,48	0,985
p-valor ¹	0,522	<0,001	-

¹p-valor do teste da ANOVA (se p-valor < 0,05 as médias entre os dias difere significativamente); ²p-valor do teste *t-student* (se p-valor < 0,05 as médias entre grupo III e grupo II diferem significativamente).

O sistema ductal não mostrou diferenças relevantes entre os subgrupos de cada grupo estudado. Entretanto, ao ser observado morfológicamente entre os grupos, notou-se que os ductos estriados apresentaram-se com paredes mais espessas no grupo tratado com gelatina bovina. Ao realizar o estudo histométrico dos ductos estriados localizados na porção serosa das glândulas submandibulares, foi observado após a aplicação do teste ANOVA, que não houve diferença significativa entre os grupos e subgrupos estudados (p-valor = 0,356 e 0,205, respectivamente) (tabela 6). De forma semelhante ao ocorrido com os ácinos serosos, quando comparada a espessura média da parede do ducto estriado das porções serosas dos subgrupos tratados com BTX-A à parede ductal dos subgrupos tratados com a gelatina de origem bovina, através do teste *t-student*, observou-se maior espessura dos ductos estriados no grupo II (gelatina bovina), sendo

significante em todos os dias avaliados (7, 15 e 28 dias, p-valor = 0,004; <0,001 e 0,012, respectivamente) (tabela 6). Na comparação com o grupo I (controle), observamos diferenças significativas apenas com os três subgrupos tratados com toxina botulínica tipo A (7 dias com $p < 0,001$; 15 dias com $p < 0,001$; e 28 dias com $p = 0,036$), com maior espessura da parede para o grupo I.

Essa diminuição da espessura da parede dos ductos estriados na porção serosa, em relação ao grupo I, sugere que a toxina deve interferir com a formação de saliva mais hipertônica, diminuindo a secreção de água e o bombeamento de íons para produção de saliva tamponada (pH em torno de 7.0). Segundo Teymoortash et al. (2007), embora as células acinares sejam as principais responsáveis pela produção e secreção da saliva, ocorre um pequeno movimento de água transepitelial nos ductos. Desta forma o volume de secreção estaria comprometido.

Tabela 6: Média e desvio padrão da espessura (em micrômetro – μm) da parede dos ductos estriados da porção serosa da glândula submandibular, segundo o número de dias de análise e o tipo de tratamento utilizado.

Número de dias de análise	Grupo avaliado		p-valor ²
	Grupo III (BTX-A)	Grupo II (Gelatina Bovina)	
7 dias	13,32±1,53	15,07±1,12	0,004
15 dias	13,01±1,30	16,08±2,11	<0,001
28 dias	14,05±1,98	16,04±0,95	0,012
p-valor ¹	0,356	0,205	-

¹p-valor do teste da ANOVA (se p-valor < 0,05 as médias entre os dias difere significativamente); ²p-valor do teste *t-student* (se p-valor < 0,05 as médias entre grupo III e grupo II diferem significativamente).

Já os ductos estriados localizados nas porções mucosas apresentaram-se com paredes mais espessas nos subgrupos tratados com gelatina bovina quando comparado com os demais subgrupos. Pelo teste ANOVA, não houve diferenças entre os três subgrupos tratados com BTX-A ($p = 0,172$), todavia, houve diferenças

significativas entres os subgrupos tratados com gelatina bovina ($p = 0,003$). Quando se comparou pelo teste *t-student* a espessura da parede dos ductos entre todos os subgrupos por seus respectivos dias de análise, a única diferença significativa ocorreu apenas no 15º dia após as aplicações das drogas (p -valor = 0,002) (tabela 7). Ao ser realizada comparação dos subgrupos tratados com BTX-A com o grupo I (controle), observou-se diferenças significativas no 7º e 15º dias após a aplicação da droga ($p < 0,001$ para os dois). Já na comparação entre os subgrupos tratados com gelatina bovina (grupo II) com o grupo I (controle), as diferenças significativas ocorreram no 7º e 28º dias de análise ($p = 0,041$ e 0,007, respectivamente), sendo que no 7º dia o grupo I apresentou paredes mais espessas, enquanto que no 28º dia após a aplicação da gelatina bovina, ocorreu o inverso.

Tabela 7: Média e desvio padrão da espessura (em micrômetro – μm) da parede dos ductos estriados da porção mucosa da glândula submandibular, segundo o número de dias de análise e o tipo de tratamento utilizado.

Número de dias de análise	Grupo avaliado		p-valor ²
	Grupo III (BTX-A)	Grupo II (Gelatina Bovina)	
7 dias	15,06±1,65	16,30±1,35	0,059
15 dias	15,25±1,39	17,85±2,07	0,002
28 dias	16,77±3,20	18,82±1,13	0,119
p-valor ¹	0,172	0,003	-

¹p-valor do teste da ANOVA (se p-valor < 0,05 as médias entre os dias difere significativamente); ²p-valor do teste *t-student* (se p-valor < 0,05 as médias entre grupo III e grupo II diferem significativamente).

Sobre a espessura da parede dos ductos estriados localizados na porção serosa e mucosa, também não foi encontrado nenhum registro de trabalho investigativo nesse sentido na literatura. Nos grupos tratados, tanto com BTX-A, quanto com gelatina bovina, houve uma predominância na espessura da parede nos ductos que estão localizados na porção mucosa da glândula. E, de maneira geral, a

espessura da parede os ductos estriados nos três subgrupos tratados com gelatina de origem bovina foram mais espessos que as dos outros grupos.

Shan et al. (2013), afirmaram que o ductos das glândulas submandibulares de coelhos apresentaram-se com um ligeiro alargamento, atenuando-se com o passar do tempo. Porém esses autores não fizeram medições para comprovar alterações na espessura da parede ductal e, também, não especificaram qual segmento do sistema ductal foi utilizado.

Como a estimulação de receptores colinérgicos ativam os transportadores de íons em células ductais (TURNER e SUGIYA, 2002), tendo uma grande importância na concentração final da saliva, sugerimos que tal função seja mais importante na porção serosa da glândula. São necessárias outras metodologias para investigar com maior profundidade a influência da gelatina bovina no tecido glandular.

Nada foi encontrado sobre a ação da gelatina bovina em porções secretoras e excretoras glandulares. Sabe-se que a gelatina bovina é composta essencialmente da proteína colágeno da pele e de osso bovino (GELITA DO BRASIL, 2013). Por ser de origem xenógena (de espécie diferente), talvez desperte alguma reação local com liberação de mediadores químicos que interfira na secreção glandular. Apesar de o laboratório Cristália (2006), afirmar não haver maior grau de alergia à gelatina e que qualquer consideração sobre a gelatina é de caráter especulativo. Além disso, este laboratório afirma que não existe nenhum trabalho que comprove que a associação gelatina-toxina botulínica produz maior efeito adverso.

Embora não avaliado no presente estudo, vale ressaltar que alguns autores evidenciaram a presença de apoptose em glândulas submandibulares de coelhos sob ação da BTX-A. Shan et al. (2013), também relataram a presença de apoptose, sendo mais evidente nas células ductais e com maior distribuição duas semanas após a aplicação da droga. A presença de BTX-A também aumentou a concentração de amilase salivar, mas a concentração dos íons K^+ e Cl^- não se alteraram no fluido salivar.

Ao tratarmos as preparações com ácido periódico de Schiff (P.A.S.), os ácinos mucosos do grupo controle reagiram positivamente mostrando citoplasma corado em magenta, indicando a presença de mucina (material glicoproteico) em seu interior, conforme descrito por Tolosa et al. (2003). Os ductos estriados coraram-se

em azul claro com seus núcleos em azul escuro. Esse mesmo padrão se repetiu nos demais grupos, porém com a presença de algumas vacuolizações (figura 5).

Todos os grupos também foram positivos para a coloração em alcian blue (pH 2.5), estando a substância glicoproteica corada em azul (TOLOSA et al., 2003), confirmando a presença de glicoproteínas neutras. Nesta coloração, também foi evidenciado o aparecimento de vacuolizações nos ácinos mucosos (figura 6). Os poucos vacúolos presentes na porção mucosa sugere que o processo de interrupção da salivação seja parecido em ambas as porções.

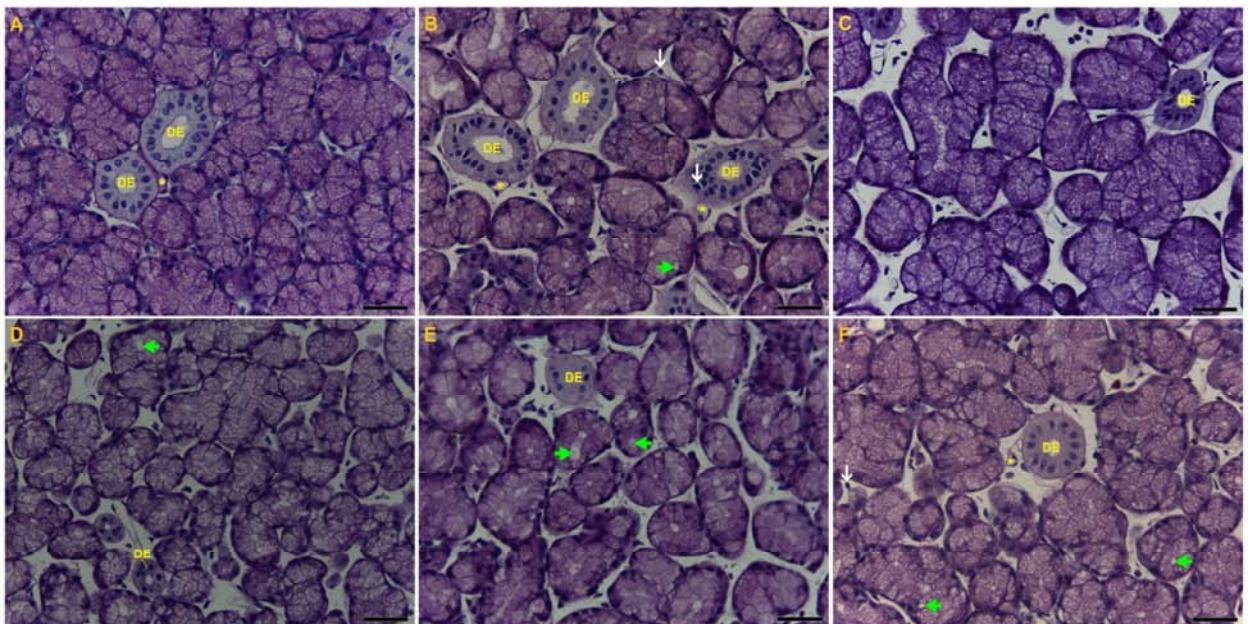


Figura 5: Fotomicrografias de porções mucosas de glândulas submandibulares de ratos do grupo I ou controle (A), grupo III (BTX-A) com 7 dias (B), grupo III com 15 dias (C), grupo II (gelatina bovina) com 7 dias (D), grupo II com 15 dias (E) e grupo II com 28 dias (F). Observe o ducto estriado (DE) e vasos sanguíneos (asterisco amarelo). As cabeças das setas verdes indicam a presença de vacuolizações em B, D, E e F. Em B e F observa-se células mononucleadas (setas brancas). Barra = 36 μ m. Coloração: P.A.S.

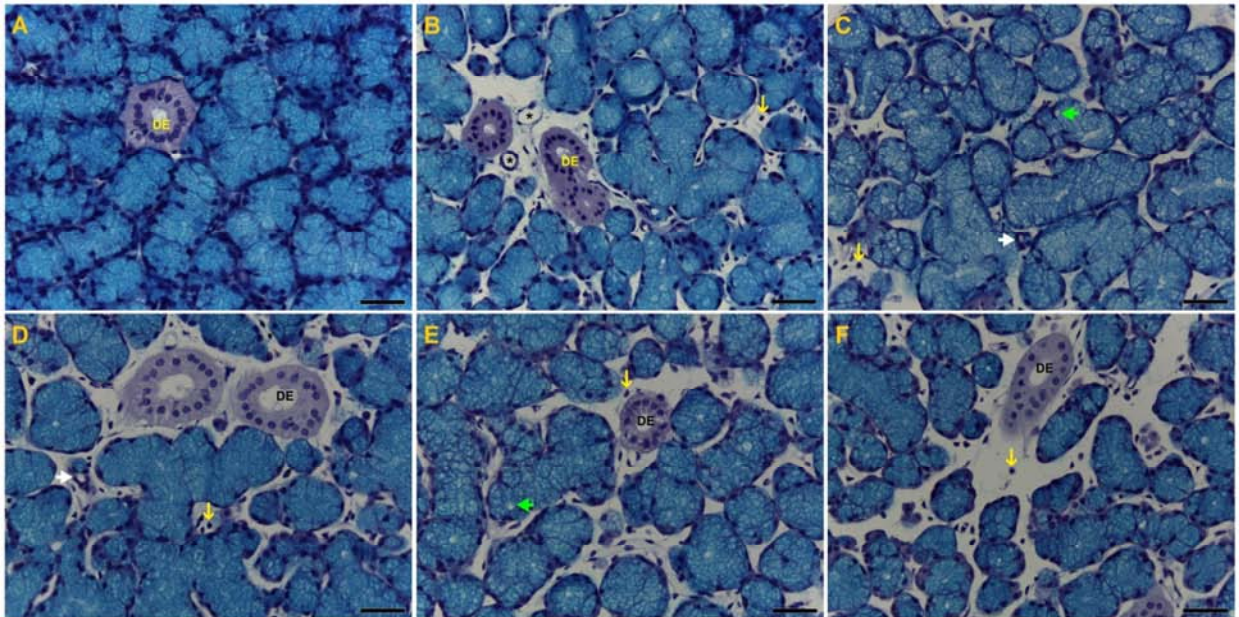


Figura 6: Fotomicrografias de porções mucosas de glândulas submandibulares de ratos do grupo I ou controle (A), grupo III (BTX-A) com 7 dias (B), grupo III com 15 dias (C), grupo III com 28 dias (D), grupo II (gelatina bovina) com 7 dias (E) e grupo II com 15 dias (F). Observe o ducto estriado (DE) e vasos sanguíneos (asterisco preto). As cabeças das setas verdes indicam a presença de vacuolizações. As setas amarelas indicam células mononucleadas. Barra = 36 μ m. Coloração: Alcian blue (pH 2,5).

Ao tratarmos com Tricrômico de Gomori, evidenciou-se colágeno distribuído uniformemente pela cápsula, pelos septos conjuntivos e em algumas regiões intralobulares de todos os grupos estudados. As fibras colágenas adquiriram uma tonalidade verde claro e os núcleos celulares numa tonalidade próxima à cor preta, conforme descrito por Tolosa et al. (2003). Segundo Tolosa e colaboradores (2003), o tricrômico de Gomori é um corante ácido que serve para evidenciar fibras colágenas, corando-as em verde-claro, e os núcleos das células em preto. Os grânulos dos ductos granulosos apresentaram-se numa tonalidade vermelha intensa. Já os ductos estriados hora aparecem numa tonalidade verde com núcleos azulados, hora apresentam-se com seu citoplasma com estriações roxas (figuras 7 e 8). Entretanto, tal método não permite distinguir a distribuição dos tipos de colágeno presentes no tecido estromal da glândula submandibular de ratos.

A coloração de tricrômico de Gomori consiste em método que se utiliza a combinação de três corantes ácidos trifenilmetano azul ou verde, além de ácidos acético, fosfomolibdico ou fosfotúngstico. O ácido fosfomolibdico intensifica a coloração dos componentes fibrilares, resultando na coloração de fibras colágenas em cor verde (LILLIE e FULLMER, 1976).

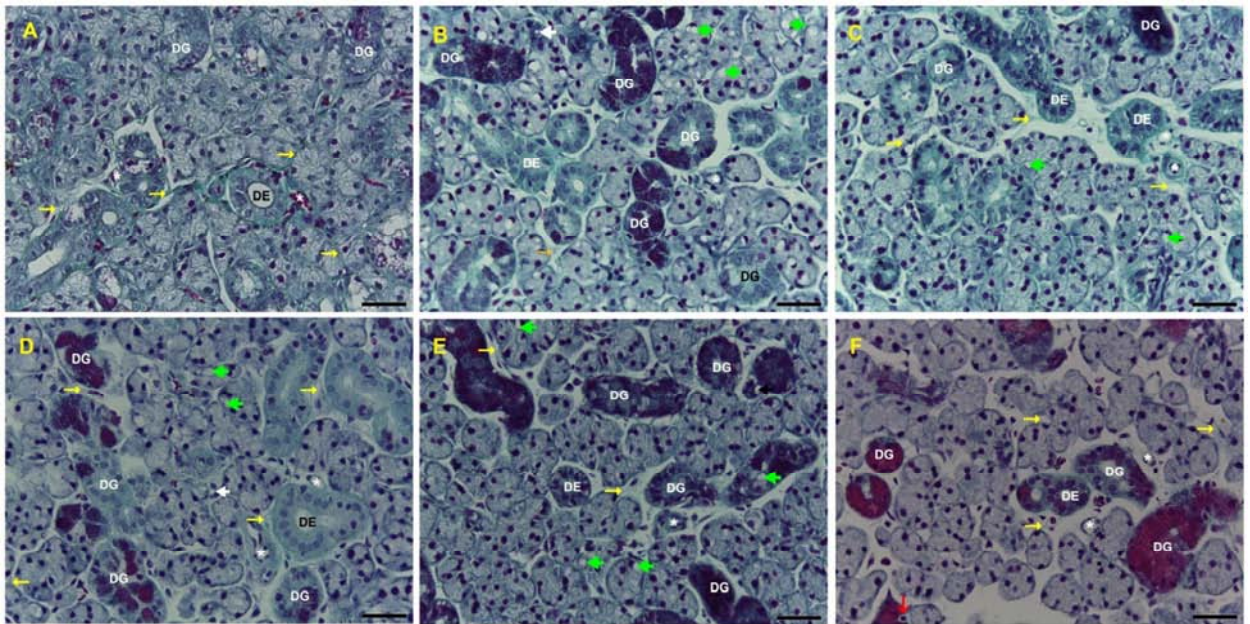


Figura 7: Fotomicrografias de porções serosas: grupo I ou controle (A); grupo III (BTX-A) com 7 dias (B); grupo III com 15 dias (C); grupo III com 28 dias (D); grupo II (gelatina bovina) com 7 dias (E); grupo II com 28 dias (F). Observe os ductos estriados (DE), ducto granuloso (DG), ducto intercalar (cabeça de setas brancas), vacuolizações (cabeça de setas verdes), vasos sanguíneos (asteriscos brancos) e o tecido conjuntivo interacinar (setas amarelas). Em F, na seta vermelha, uma célula mononucleada. Barra = 36 μ m. Coloração: Tricrômico de Gomori.

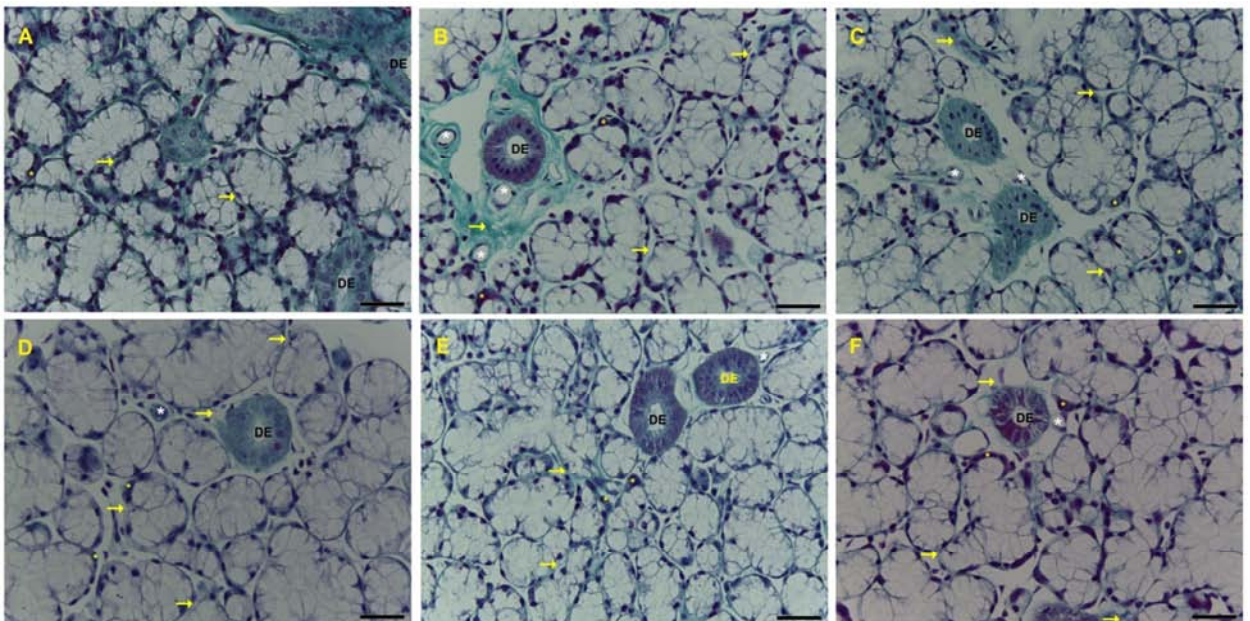


Figura 8: Fotomicrografias de porções mucosas: grupo I ou controle (A); grupo III (BTX-A) com 7 dias (B); grupo III com 15 dias (C); grupo III com 28 dias (D); grupo II (gelatina) com 7 dias (E); grupo II com 15 dias (F). Observe as semiluas serosas (asteriscos amarelos), ductos estriados (DE), vasos sanguíneos (asteriscos brancos) e o tecido conjuntivo interacinar (setas amarelas). Barra = 36 μ m. Coloração: Tricrômico de Gomori.

O picrossirius red é um corante de natureza química ácida, que ao reagir com as fibras colágenas promove um aumento da sua birrefringência normal (SWEAT, PUCHTLER, ROSENTHAL, 1964; JUNQUEIRA, BIGNOLAS, BRENTANI, 1979), e, dependendo da espessura da fibra, mostra-se em cores diferentes quando vista no microscópio de polarização. Através da fluorescência gerada, permite a observação discriminada das fibras de colágeno tipo I (colágeno maduro) e tipo III (colágeno imaturo) (JUNQUEIRA, BIGNOLAS, BRENTANI, 1979; DAYAN et al., 1989). Notamos a maior presença de tecido interacinar no grupo controle e nos subgrupos analisados ao 7º dia após o tratamento com BTX-A e com gelatina bovina, porém com predominância do grupo controle. No grupo tratado com BTX-A houve uma diminuição do 15º dia, voltando a um ligeiro aumento no 28º dia após o tratamento. Nos demais grupos de estudo, observamos uma diminuição do estroma localizado entre os ácinos mucosos (figura 9). Na porção serosa, a quantidade de tecido estromal entre os ácinos foi semelhante para todos os grupos (figura 10).

Para todos os grupos, observamos a predominância de colágeno tipo III nos espaços interacinares, cuja birrefringência evidencia-se pela cor verde. Pouquíssimos pontos revelaram a presença de colágeno tipo I, restrito e em pouca quantidade nos septos, fortemente birrefringentes, visto como fibras amarelas ou vermelhas, conforme descrito por Melo et al. (2003). Não existe nenhum estudo semelhante na literatura, mas Katchburian e Aranã-Chaves (2012) afirmam que a matriz extracelular de glândulas salivares é constituída principalmente por fibrilas colágenas do tipo I.

Outras investigações recentes mostram estudos imunohistoquímicos para as enzimas acetilcolinesterase (AChE) e óxido nítrico neuronal sintase (nNOS) em glândulas submandibulares e parótidas, como nos trabalhos de Ellies et al. (1999), Ellies et al. (2000), Ellies et al. (2003a), Ellies et al. (2006a), Ellies et al. (2006b). Yuan, Hou e Wen (2004), além de processamento histológico, também realizaram imunohistoquímica para substância ou polipeptídeo P. Wen, Yan e Hou (2009), também fizeram imunohistoquímica para polipeptídeo vasoativo intestinal (VIP). Em todos eles foi evidenciada fraca imunorreatividade nos grupos tratados com BTX-A, proporcional com o aumento da duração de exposição à toxina. O papel da acetilcolina é bem conhecido. Já o do óxido nítrico (NO) estaria envolvido no processo de regulação secretória, agindo como um possível neuromodulador

vascular na regulação de processos secretores específicos no trato aerodigestivo superior (TAKAI et al., 1999; ELLIES et al., 2006a; ELLIES et al., 2006b).

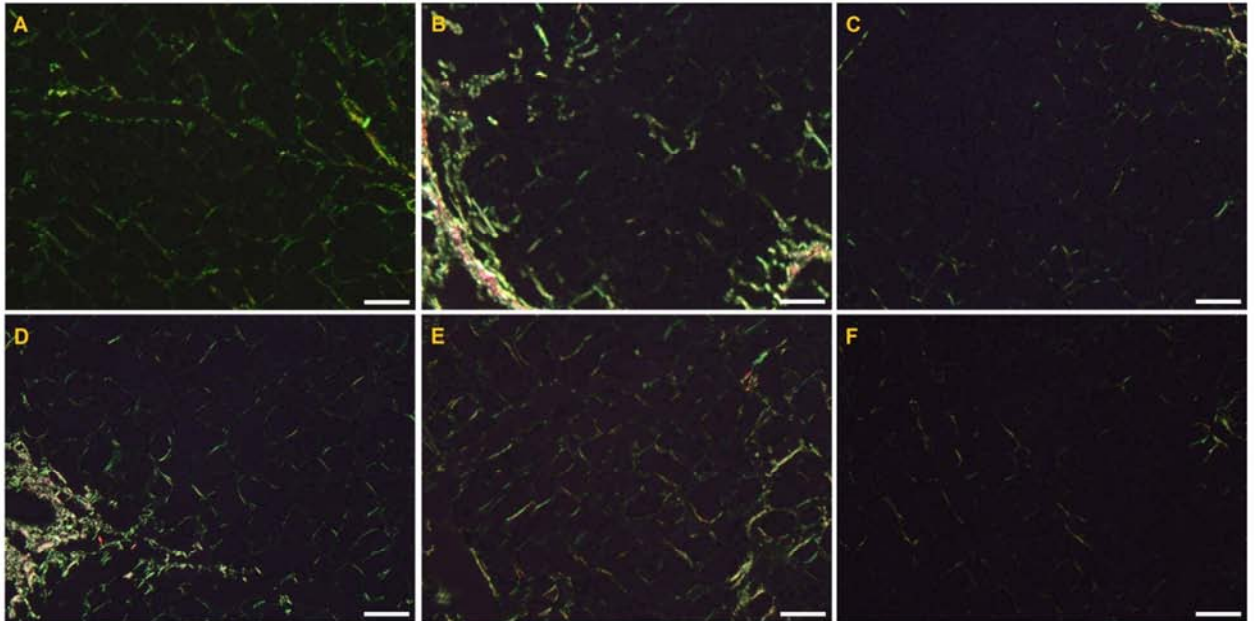


Figura 9: Fotomicrografias de polarização de porções mucosas: grupo I ou controle (A); grupo III (BTX-A) com 7 dias (B); grupo III com 15 dias (C); grupo III com 28 dias (D); grupo II (gelatina) com 7 dias (E); grupo II com 28 dias (F). Observe colágeno tipo I (fibras coradas em amarelo ou vermelho) e colágeno tipo III (fibras coradas em verde). Barra = 288 μ m. Coloração: Picrossirius Red.

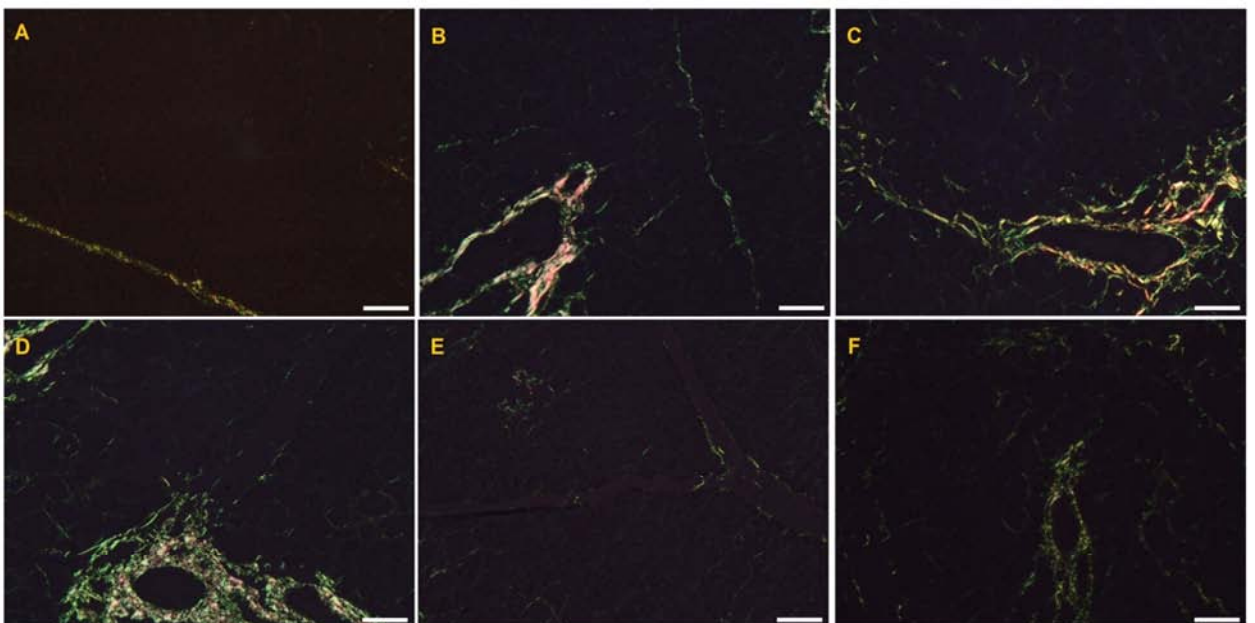


Figura 10: Fotomicrografias de polarização de porções serosas: grupo I ou controle (A); grupo III (BTX-A) com 7 dias (B); grupo III com 15 dias (C); grupo III com 28 dias (D); grupo II (gelatina) com 7 dias (E); grupo II com 28 dias (F). Observe colágeno tipo I (fibras coradas em amarelo ou vermelho) e colágeno tipo III (fibras coradas em verde). Barra = 288 μ m. Coloração: Picrossirius Red.

De acordo com os estudos clínicos, a toxina botulínica é um recurso terapêutico eficaz, seguro e consistente, apresenta alto impacto no tratamento das mais diferentes doenças, mas esses dados estão respaldados apenas por estudos clínicos e muitas perguntas ainda permanecem sem solução. As pesquisas experimentais sobre este tema são escassas e ainda muito divergentes. Conforme observado nos poucos trabalhos existentes na literatura, ainda há muita divergência e questionamentos metodológicos.

São necessários mais estudos detalhados com outras metodologias, com a finalidade de desvendar ultraestruturalmente e molecularmente as modificações sofridas pelo tecido glandular sob efeito da BTX-A e gelatina de origem bovina.

8. CONCLUSÃO

Dessa forma, concluímos que a toxina botulínica tipo A interfere na organização estrutural das glândulas submandibulares promovendo uma diminuição no diâmetro dos ácinos serosos e na espessura da parede dos ductos estriados, mas que macroscopicamente tal diferença não se mostrou significativa. Além disso, as glândulas tratadas sofreram um aumento da vacuolização e do espaço interacinar. O aparecimento de células mononucleadas é normal, porém intensificado pela administração de BTX-A. Os ácinos serosos do grupo tratado com gelatina bovina foram significativamente maiores quando comparados com o mesmo tipo de ácino sob influência da BTX-A e do grupo controle. Já os ácinos mucosos tratados com gelatina bovina foram em geral menores que os ácinos tratados com BTX-A e do grupo controle. A espessura da parede os ductos estriados nos três subgrupos tratados com gelatina de origem bovina foram mais espessos que as dos outros grupos.

Histoquimicamente, as porções mucosas apresentaram-se positivas para a presença de material glicoproteico, tanto na coloração por P.A.S., quanto por alcian blue, corando em magenta e em azul, respectivamente. A coloração de tricrômico de Gomori evidenciou a presença de fibras colágenas interperenquimatosa num tonalidade verde. Na técnica de polarização, pelo corante picrossirius red, evidenciamos maior quantidade de colágeno tipo III.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, F.; FARID, R.; NADA, I.; EL-SHARNOUBY, M. Evaluation of ethanolamine oleate sclerotherapy on the submandibular glands of canines as a potential therapy for sialorrhea. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, v. 77, p. 351-355, 2013.
- AFFONSO, S.Q.; CRUZ, S.E.B. Disfunções salivares medicamentosas e suas implicações no paciente odontogeriatrico. *Revista Odontológica do Planalto Central*, v. 3, n. 1, p. 52-60, 2013.
- ALREFAI, A.H.; ABURAHMA, S.K.; KHADER, Y.S. Treatment of sialorrhea in children with Cerebral Palsy: A double-blind placebo controlled trial. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, v. 111, p. 79-82, 2009.
- ALTER, K.E. High-Frequency Ultrasound Guidance for Neurotoxin Injections. *Physical Medicine & Rehabilitation Clinics of North America*, v. 21, p. 607-630, 2010.
- AMANTÉA, D.V.; NOVAES, A.P.; CAMPOLONGO, G.D.; PESSOA de BARROS, T. A Utilização da Toxina Botulínica tipo A na Dor e Disfunção Temporomandibular. *JBA Jornal Brasileiro De Oclusão, ATM & Dor Orofacial*, v. 3, n. 10, p. 170-173, 2003.
- AMARO, P. DUARTE, AL. Fissura Anal. Parte I: Fundamentos Teóricos. *Revista Portuguesa de Coloproctologia*, v. 6, n. 1, p. 18-26, 2009.
- AUGUSTO, A.G.; PEREZ, A.C. Babação. Investigação quanto aos melhores métodos terapêuticos. *Acta ORL/Técnicas em Otorrinolaringologia*, v. 24, n. 1, p. 1-6, 2006.
- AVERY, J.K. *Desenvolvimento e Histologia Bucal*. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 456p.
- BANERJEE, K.J.; GLASSOM, G.; O'FLAHERTY, S.J. Parotid and submandibular botulinum toxin A injections for sialorrhoea in children with cerebral palsy. *Developmental Medicine & Child Neurology*, v. 48, n. 11, p. 883-887, 2006.
- BARATELLA-EVÊNCIO, L.; ARANA-CHAVEZ, V.E.; KATCHBURIAN, E. Fases do desenvolvimento do retículo estrelado em germes dentários de molares de rato. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 66, p. 62, 1999.
- BARBOSA, D.B.; TAGA, R. Estudo Estereológico dos Diferentes Componentes Estruturais de Glândulas Submandibulares de Ratos Machos e Fêmeas. *Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru*, v. 5, n. 3/4, p. 51-57, 1997.
- BARRETT, K.E.; BARMAN, S.M.; BOITANO, S.; BROOKS, H.L. *Fisiologia Médica de Ganong*. 24ª Edição. Porto Alegre: Artmed. 2014. 752p.

BAVIKATTE, G.; SIT, P.L.; HASSOON, A. Management of Drooling of Saliva. **British Journal of Medical Practitioners**, v. 5, n. 1, p. 502-507, 2012.

BERWECK, S.; SCHROEDER, A.S.; LEE, S.H.; BIGALKE, H.; HEINEN, F. Secondary non-response due to antibody formation in a child after three injections of botulinum toxin B into the salivary glands. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 49, n. 1, p. 62-64, 2007.

BHATIA, K.P.; MÜNCHAU, A.; BROWN, P. Botulinum toxin is a useful treatment in excessive drooling of saliva. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 67, n. 5, p. 697, 1999.

BHAYANI, M.K.; SUSKIND, D.L. The use of botulinum toxin in patients with sialorrhea. **Operative Techniques in Otolaryngology**, v.19, n. 4, p. 243-247, 2008.

BLAKE, K.D.; MacCUSPIE, J.; CORSTEN, G. Botulinum Toxin Injections Into Salivary Glands to Decrease Oral Secretions in Charge Syndrome: Prospective Case Study. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 158(A), n. 4, p. 828-831, 2012.

BLASCO, P.A. Management of drooling: 10 years after the Consortium on Drooling, 1990. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 44, n. 11, p. 778-781, 2002.

BLITZER, A.; SULICA, L. Botulinum toxin: basic science and clinical uses in otolaryngology. **The Laryngoscope**, v. 111, n. 2, p. 218-226, 2001.

BLOEM, B.R.; KALF, J.G.; VAN DE KERKHOF, P.C.M.; ZWARTS, M.J. Debilitating consequences of drooling. **Journal of Neurology**, v. 256, n. 8, p. 1382-1383, 2009.

BONDUKI, C.E.; DORNELAS JÚNIOR, G.O.; BERNARDO, A.; SIMÕES, M.J.; CASTRO, R.A.; GOMES, M.T.V.; GIRÃO, M.J.B.C. Avaliação da proporção de colágeno no tecido uterino antes e após tratamento do leiomioma uterino pela embolização arterial. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 12, p. 598-603, 2009.

BORG, M.; HIRST, F. The Role of Radiation Therapy in the Management of Sialorrhea. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 41, n. 5, p. 1113-1119, 1998.

BOTHWELL, J.E.; CLARKE, K.; DOOLEY, J.M.; GORDON, K.E.; ANDERSON, R.; WOOD, E.P.; CAMFIELD, C.S.; CAMFIELD, P.R. Botulinum Toxin A as a Treatment for Excessive Drooling in Children. **Pediatric Neurology**, v. 27, n. 1, p. 18-22, 2002.

BOYCE, H.W.; BAKHEET, M.R. Sialorrhea: a review of vexing, often unrecognized sign of oropharyngeal and esophageal disease. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 39, n. 2, p. 89-97, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Uso racional de medicamentos: temas selecionados**. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos – Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 156 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BREHERET, R.; BIZON, A.; JEUFROY, C.; LACCOURREYE, L. Ultrasound-guided botulinum toxin injections for treatment of drooling. **European Annals of Otorhinolaryngology – Head and Neck diseases**, v. 128, n. 5, p. 224-229, 2011.

BURG, J.J.W.V.; JONGERIUS, P.H.; HULST, K.V.; LIMBEEK, J.V.; ROTTEVEEL, J.J. Drooling in children with cerebral palsy: effect of salivary flow reduction on daily life and care. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 48, n. 2, p. 103-107, 2006.

CANTARELLA, G.; BERLUSCONI, A.; MELE, V.; COGIAMANIAN, F.; BARBIERI, S. Treatment of Frey's syndrome with botulinum toxin type B. **Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 143, n. 2, p. 214-218, 2010.

CAPACCIO, P.; TORRETTA, S.; OTTAVIANI, F.; SAMBATARO, G.; PIGNATARO, L. Modern management of obstructive salivary diseases. **Acta Otorhinolaryngologica Italica**, v. 27, n. 4, p. 161-172, 2007.

CARPENTER, G.H.; KHOSRAVANI, N.; EKSTRÖM, J. OSAILAN, S.M.; PATERSON, K.P.; PROCTOR, G.B. Altered plasticity of the parasympathetic innervation in the recovering rat submandibular gland following extensive atrophy. **Experimental Physiology**, v. 94, n. 2, p. 213-219, 2009.

CARRUTHERS, A. Botulinum Toxin Type A: History and Current Cosmetic Use in the Upper Face. **Disease-a-Month**, v. 48, p. 299-322, 2002.

CARRUTHERS, J.; CARRUTHERS, A. Botulinum toxin A in the mid and lower face and neck. **Dermatologic Clinics**, v. 22, n. 2, p. 151-158, 2004.

CARRUTHERS, A.; CARRUTHERS, J. Botulinum toxin type A. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 53, n. 2, p. 284-290, 2005.

CARVALHO, R.C.R.; SHIMAOKA, A.M.; ANDRADE, A.P. **O Uso da Toxina Botulínica na Odontologia**. Conselho Federal de Odontologia. 2011. Disponível em: <<http://cfo.org.br/wp-content/uploads/2011/05/toxina-botulinica.pdf>>.

CASTRO, A.L.; CASTRO, A.L.; MATHEUS, G. Efeitos da hipertensão arterial benigna e maligna em glândulas submandibulares de ratos. Estudo histológico. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 14, n. 112, p. 69-75, 1985.

CATALÁN, M.A.; NAKAMOTO, T.; MELVIN, J.E. The salivary gland fluid secretion mechanism. **The Journal of Medical Investigation**, v. 56, suppl, p.192-196, 2009.

CH (THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA). **Salivary Gland Botulinum Toxin Type A Injection**. Information About Your Child's Procedure. 2010. Disponível em <<http://www.chop.edu/export/download/pdfs/articles/radiology/ir-salivary-gland-botox.pdf>>. Acesso em 19 de jan. de 2014.

CHEIDDE, L.; SCHOR, N. Revisão: transportadores de água. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 1, p. 71-78, 1999.

CHOW, T.L.; CHAN, S.W.; LAM, S.H. Ranula successfully treated by botulinum toxin type A: Report of 3 cases. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 105, n. 1, p. 41-42, 2008.

ÇİFTÇİ, T.; AKINCI, D.; YURTTUTAN, N.; AKHAN, O. US-guided botulinum toxin injection for excessive drooling in children. **Diagnostic and Interventional Radiology**, v. 19, n. 1, p.56-60, 2013.

COBO, E.P.; VIVED, À.M.; CANO, L.G.; ATANSASIO, E.M.; MESQUIDA, M.E.P.; CARTAGENA, P.S. **Toxina botulínica na prática clínica: atlas de pontos musculares**. Porto Alegre: Artmed, 2009. 360 p.

CORSO, B.L.; SILVEIRA, V.C.; BINHA, A.M.P.; CHAMLIAN, T.R. Therapeutic Approach in Drooling on Cerebral Palsy: Systematic Review. **Revista Medicina de Reabilitação**, v. 30, n. 1, p. 9-13, 2011.

COSKUN, B.U.; SAVK, H.; CICEK, E.D.; BASAK, T.; BASAK, M.; DADAS, B. Histopathological and radiological investigations of the influence of botulinum toxin on the submandibular gland of the rat. **European Archives of Otorhinolaryngology**, v. 264, p. 783-787, 2007.

COUSIN, X.; STRAHLE, U.; CHATONNET, A. Are there non-catalytic functions of acetylcholinesterases. Lesson from mutant animal models. **Bioassays**, v. 27, n. 2, p. 189-200, 2005.

CRISTÁLIA – Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA. **Prosigne® - Mitos e Verdades**. 2006. Disponível em <http://www.2cristalia.com.br/prosigne/mitos_e_verdades.pdf>. Acesso em 12 de jan de 2014.

CRYSDALE, W.S. The drooling patient: evaluation and current surgical options. **The Laryngoscope**, v. 90, n. 5 Pt 1, p. 775-783, 1980.

CRYSDALE, W.S.; MCCANN, C.; ROSKE, L.; JOSEPH, M.; SEMENUK, D.; CHAIT, P. Saliva control issues in the neurologically challenged. A 30 year experience in team management. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 70, n. 3, p. 519-527, 2006.

DAYAN, D.; HISS, Y.; HIRSHBERG, A.; BUBIS, J.J.; WOLMAN, M. Are the polarization colors of picosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? **Histochemistry**, v. 93, n. 1, p. 27-29, 1989.

DEXHEIMER, M. **Avaliação Morfológica e Morfométrica das Glândulas Parótidas de Camundongos Submetidos à Radiação X ao Longo do Envelhecimento**. 59 f. (Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia Clínica Radiologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Porto Alegre, 2005.

DICKSON, E.C.; SHEVSKY, R. Studies on the manner in which the toxin of clostridium botulinum acts upon the body: I. The effect upon the autonomic nervous system. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 37, n. 5, p. 711-731, 1923.

EKSTRÖM, J.; REINHOLD, A.C. Reflex-elicited increases in female rat parotid protein synthesis involving parasympathetic non-adrenergic, non-cholinergic mechanisms. *Experimental Physiology*, v. 86, n. 5, p. 605-610, 2001.

ELLIES, M.; LASKAWI, R.; GÖTZ, W.; ARGLEBE, C.; TORMÄHLEN, G. Immunohistochemical and morphometric investigations of the influence of botulinum toxin on the submandibular gland of the rat. *European Archives of Otorhinolaryngology*, v. 256, n. 3, p. 148-152, 1999.

ELLIES, M.; LASKAWI, R.; TORMÄHLEN, G.; GÖTZ, W. The Effect of Local Injection of Botulinum Toxin A on the Parotid Gland of the Rat: An Immunohistochemical and Morphometric Study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 58, n. 11, p. 1251-1256, 2000.

ELLIES, M.; LASKAWI, R.; ROHBACH-VOLLAND, S.; RÖDEL, R.; BEUCHE, W. Sekretionshemmung exokriner Drüsen des Kopf-Hals-Bereiches durch Applikation von Botulinum Toxin A: Therapie seltener Krankheitsbilder (Blocking of secretion in exocrine glands of the head and neck area with botulinum toxin A. Therapeutic option in the treatment of rare diseases). *HNO*, v. 49, n. 10, p. 807-823, 2001.

ELLIES, M.; ROHBACH-VOLLAND, S.; ARGLEBE, C.; WILKEN, B.; LASKAWI, R.; HNEFELD, F. Successful management of drooling with botulinum toxin A in neurologically disabled children. *Neuropediatrics*, v. 33, n. 6, p. 327-330, 2002a.

ELLIES, M.; LASKAWI, R.; ROHRBACH-VOLLAND, S.; ARGLEBE, C.; BEUCHE, W. Botulinum toxin to reduce saliva flow: selected indications for ultrasound-guided toxin application into salivary glands. *The Laryngoscope*, v. 112, n. 1, p. 82-86, 2002b.

ELLIES, M.; LASKAWI, R.; SCHÜTZ, S.; QUONDAMATTEO, F. Immunohistochemical Evidence of nNOS and Changes after Intraglandular Application of Botulinum Toxin A in Cephalic Salivary Glands of Adult Rats. *Journal for Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery (ORL)*, v. 65, n. 3, p. 140-143, 2003a.

ELLIES, M.; LASKAWI, R.; ROHRBACH-VOLLAND, S.; ARGLEBE, C. Up-to-Date Report of Botulinum Toxin Therapy in Patients With Drooling Caused by Different Etiologies. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 61, n. 14, p. 454-457, 2003b.

ELLIES, M.; GOTTSTEIN, U.; ROHRBACH-VOLLAND, S.; ARGLEBE, C.; LASKAWI, R. Reduction of salivary flow with botulinum toxin: extended report on 33 patients with drooling, salivary fistulas, and sialadenitis. *The Laryngoscope*, v. 114, n. 10, p. 1856-1860, 2004.

ELLIES, M.; SCHÜTZ, S.; QUONDAMATTEO, F.; LASKAWI, R. The effect of local injection of botulinum toxin A on the immunoreactivity of nNOS in the rat submandibular gland: An immunohistochemical study. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, v. 70, n. 1, p. 59-63, 2006a.

ELLIES, M.; SCHÜTZ, S.; QUONDAMATTEO, F.; LASKAWI, R. Immunohistochemical Investigations of the Influence of Botulinum Toxin A on the

Immunoreactivity of nNOS in the Parotid Gland of the Rat. ***Journal of Oral and Maxillofacial Surgery***, v. 64, n. 3, p. 397-401, 2006b.

EMARA, A.S.; FARAMAWES, M.I.; HASSAAN, M.A.; HAKAM, M.M. Botulinum toxin injection for management of temporomandibular joint clicking. ***International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery***, v. 42, n. 6, p. 759-764, 2013.

ERASMUS, C.E.; SCHEFFER, A.R.T.; VAN HULST, K.; VAN LIMBEEK, J.; VAN DEN HOOGEN, F.J.A.; ROTTEVEEL, J.J.; JONGERIUS, P.H. Does Motor Performance Matter in Botulinum Toxin Efficacy for Drooling? ***Pediatric Neurology***, v. 45, n. 2, p. 95-99, 2011.

FAIRHURST, C.B.R.; COCKERILL, H. Management of drooling in children. ***Archives of Disease in Childhood - Education and Practice***, v. 96, n. 1, p. 25-30, 2011.

FERREIRA, L.M.; TALARICO FILHO, S.; COSTA, R.O.; GODOY, A.; STEINER, D.; FLEISSIG, L.; KEIRA, S.M.; PERCORA, C.; BAGATIN, E.; HASSUN, K.; SUCCI, I.S.; GODOY, A.; LIMA JÚNIOR, C.H.; STEINER, T.A.; BLANES, L.; SAKAMOTO, F.H.; MONTEIRO, E.O. Eficácia e tolerabilidade de uma nova toxina botulínica tipo A para tratamento estético de rugas faciais dinâmicas: estudo multicêntrico prospectivo de fase III. ***Surgical & Cosmetic Dermatology***, v. 1, n. 2, p. 58-63, 2009.

FONSECA, E.C.; CASTRO, A.L.; MATHEUS, G. Contribuição ao estudo das glândulas submandibulares, após lesão da eminência média do hipotálamo, em ratos. ***Revista de Odontologia da UNESP***, v. 18, n. 1/2, p. 165-174, 1989.

FUJITA-YOSHIGAKI, J. Divergence and Convergence in Regulated Exocytosis: The Characteristics of cAMP-Dependent Enzyme Secretion of Parotid Salivary Acinar Cells. ***Cellular Signalling***, v. 10, n. 6, p. 371-375, 1998.

GALVÃO, A.C.R. Tratamento Medicamentoso da Cefaleia Crônica Diária. ***Cefaléia***, suplemento - 9^º SIMBIDOR, p. 73-74, 2009.

GAMA, P.D. Novos Horizontes Terapêuticos da Toxina Botulínica. ***Neurotrends***, p. 43-50, 2010. Disponível em <<http://www.institutocerebro.com/?p=55>>. Acesso em 21 ago. 2012.

GELITA DO BRASIL LTDA. ***Improving Quality of Life. Peptídeos de Colágeno para Vacinas***. 2013. Disponível em <<http://www.gelita.com/pt/aplica-es/pept-deos-de-col-geno-para-vacinas>>. Acesso em 12 de jan de 2014.

GERLINGER, I.; SZALAI, G.; HOLLÓDY, K.; NÉMETH, A. Ultrasound-guided, intraglandular injection of botulinum toxin A in children suffering from excessive salivation. ***The Journal of Laryngology & Otology***, v. 121, n. 10, p. 947-951, 2007.

GOK, G.; COX, N.; BAJWA, J.; CHRISTODOULOU, D.; MOODY, A.; HOWLETT, D.C. Ultrasound-guided injection of botulinum toxin A into the submandibular gland in children and young adults with sialorrhoea. ***British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery***, v. 51, n. 3, p. 231-233, 2013.

GOMES, C.; TRIGO-ROCHA, F.; CASTRO FILHO, J.; FIGUEIREDO, J.; REJOWSKI, R.; BRUSCHINI, H.; SROUGI, M. Comparison of Botox® with a Chinese

Botulinum Toxin Type A (Prosigne®) for the Treatment of Refractory Neurogenic Detrusor Overactivity. *International Continence Society (ICS)*, abstracts, 2007. Disponível em <<http://www.ics.org/Abstracts/Publish/45/000313.pdf>>. Acesso em 12 de jan de 2014.

GÖSCHEL, H.; WOHLFARTH, K.; FREVERT, J.; DENGLER, R.; BIGALKE, H. Botulinum A toxin therapy: neutralizing and nonneutralizing antibodies - therapeutic consequences. *Experimental Neurology*, v. 147, n. 1, p. 96-102, 1997.

GUNTINAS-LICHIUS, O.; JUNGEHÜLSING, M. Treatment of Chronic Parotid Sialiectasis With Botulinum Toxin A. *Laryngoscope*, v. 112, n. 3, p. 586-587, 2002.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Guyton & Hall: Tratado de Fisiologia Médica*. 12ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier. 2011. 1176p.

HASSIN-BAER, S.; SCHEUER, E.; BUCHMAN, A.S.; JACOBSON, I.; BEN-ZEEV, B. Botulinum Toxin Injections for Children With Excessive Drooling. *Journal of Child Neurology*, v. 20, n. 2, p. 120-123, 2005.

HEINEN, F. Siallorrhoea in Pediatric Neurology – the Long Way from Case Series to Clinical Studies. *Neuropediatrics*, v. 39, n. 4, p. 195, 2008.

HELMSTAEDTER, V.; WITTEKINDT, C.; HUTTENBRINK, K.-B.; GUNTINAS-LICHIUS, O. Safety and Efficacy of Botulinum Toxin Therapy in Otorhinolaryngology: Experience From 1,000 Treatments. *Laryngoscope*, v. 118, n. 5, p. 790-796, 2008.

HORNIBROOK, J.; COCHRANE, N. Contemporary Surgical Management of Severe Sialorrhoea in Children. *International Scholarly Research Network - ISRN Pediatrics*, v. 2012, n. 1, p. 364-387, 2012.

HUMPHREY, S.P.; WILLIAMSON, R.T. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, v. 85, n. 2, p. 162-169, 2001.

INTISO, D. Therapeutic Use of Botulinum Toxin in Neurorehabilitation. *Journal of Toxicology*, v. 2012, n. 1, p. 1-12, 2012.

ISAÍAS, P.A.N.; DARÍO, R.M. Trastornos autonómicos. *Revista Mexicana de Neurociencia*, v. 10, n. 2, p. 128-132, 2009.

ISHIKAWA, Y.; CHO, G.; YUAN, Z.; SKOWRONSKI, M.T.; PAN, Y.; ISHIDA, H. Water Channels and Zymogen Granules in Salivary Glands. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 100, n. 5, p. 495-512, 2006.

JACOBY, F.; LEESON, C.R. The post-natal development of the rat submaxillary gland. *Journal of Anatomy*, v. 93, part 2, p. 201-216, 1959.

JANKOVIC, J. Botulinum toxin in clinical practice. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, v. 75, n. 7, p. 951-957, 2004.

JANKOVIC, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, v. 79, n. 1, p.368-376, 2008.

JANKOVIC, J. Disease-oriented approach to botulinum toxin use. *Toxicon*, v. 54, n. 5, p. 614-623, 2009.

JEUNG, S.; LEE, S.; KIM, H.S.; YEO, C.K. Effect of Botulinum Toxin A Injection into the Salivary Glands for Sialorrhea in Children with Neurologic Disorders. *Annals of Rehabilitation Medicine*, v. 36, n. 3, p. 340-346, 2012.

JOHNSON, H.M.; REID, S.M.; HAZARD, C.J.; LUCAS, J.O.; DESAI, M.; REDDIHOUGH, D.S. Effectiveness of the Innsbruck Sensorimotor Activator and Regulator in improving saliva control in children with cerebral palsy. *Developmental Medicine & Child Neurology*, v. 46, n. 1, p. 39-45, 2004.

JONGERIUS, P.H.; ROTTEVEEL, J.J.; VAN DEN HOOGEN, F.J.A.; JOOSTEN, F.; VAN HULST, K.; GABREËLS, F.J.M. Botulinum toxin A: a new option for treatment of drooling in children with cerebral palsy. Presentation of a case series. *European Journal of Pediatrics*, v. 160, n. 8, p. 509-512, 2001.

JONGERIUS, P.H.; JOOSTEN, F.; VAN DEN HOOGEN, F.J.A.; GABREELS, F.J.M.; ROTTEVEEL, J.J. The Treatment of Drooling by Ultrasound-Guided Intraglandular Injections of Botulinum Toxin Type A Into the Salivary Glands. *The Laryngoscope*, v. 113, n. 1, p. 107-111, 2003.

JONGERIUS, P.H.; VAN DEN HOOGEN, F.J.A.; VAN LIN BEEK, J.; GABREELS, J.F.; HULST, K.V.; ROTTEVAL, J.J. Effect of botulinum toxin in the treatment of drooling: a controlled clinical trial. *Pediatrics*, v. 114, n. 3, p. 620-627, 2004a.

JONGERIUS, P.H.; ROTTEVEEL, J.J.; VAN LIMBEEK, J.; GABREËLS, F.J.M.; VAN HULST, K.; VAN DEN HOOGEN, F.J.A. Botulinum toxin effect on salivary flow rate in children with cerebral palsy. *Neurology*, v. 63, n. 8, p. 1371-1375, 2004b.

JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochemical Journal*, v. 11, n. 4, p. 447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. *Técnicas básicas de citologia e histologia*. São Paulo: Santos, 1983. p. 123.

KALF, J.G.; SMIT, A.M.; BLOEM, B.R.; ZWARTS, M.J.; MULLENERS, W.M.; MUNNEKE, M. Botulinum toxin A for drooling in Parkinson's disease: A pilot study to compare submandibular to parotid gland injections. *Parkinsonism and Related Disorders*, v. 13, n. 8, p. 532-534, 2007.

KANG, J.H.; KIM, B.K.; PARK, B.I.; KIM, H.J.; KO, H.M.; YANG, S.Y.; KIM, M.S.; JUNG, J.Y.; KIM, W.J.; OH, W.M.; KIM, S.H.; KIM, J.H. Parasympathectomy induces morphological changes and alters gene-expression profiles in the rat submandibular gland. *Archives of Oral Biology*, v. 55, n. 7, p. 7-14, 2010.

KATCHBURIAN, E.; ARANA-CHAVEZ, V. *Histologia e embriologia oral*. 3ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2012. 388f.

KONTTINEN, Y.T.; STEGAEV, V.; MACKIEWICZ, Z.; PAROLA, P.; HÄNNIENEN, A.; SZODORAY, P. Salivary glands – ‘an unisex organ’? **Oral Diseases**, v. 16, n. 7, p. 577-585, 2010.

KRUEGEL, J. WINTERHOFF, J.; KOEHLER, S.; MATTHES, P.; LAKAWI, R. Botulinum Toxin: A Noninvasive Option for the Symptomatic Treatment of Salivary Gland Stenosis – A Case Report. **Wiley Periodicals, Inc. Head Neck**, v. 32, n. 7, p. 959-963, 2010.

LAGALLA, G.; MILLEVOLTE, M.; CAPECCI, M.; PROVINCIALI, L.; CERAVOLO, M.G. Long-lasting benefits of botulinum toxin type B in Parkinson’s disease-related drooling. **Journal of Neurology**, v. 256, n. 4, p. 563-567, 2009.

LEE, J.H.; LEE, B.N.; KWON, S.O.; CHUNG, R.H.; HAN, S.H. Anatomical localization of submandibular gland for botulinum toxin injection. **Surgical and Radiologic Anatomy**, v. 32, n. 10, p. 945-949, 2010.

LEE, Z.I.; CHO, D.H.; CHOI, W.D.; PARK, D.H.; BYUN, S.D. Effect of Botulinum Toxin Type A on Morphology of Salivary Glands in Patients with Cerebral Palsy. **Annals of Rehabilitation Medicine**, v. 35, n. 5, p. 636-640, 2011.

LEESON, C.R. Localization of alkaline phosphatase in the submaxillary gland of the rat. **Nature**, v. 178, n. 4538, p. 858-859, 1956.

LEESON, C.R.; JACOBY, F. Alkaline phosphatase reaction of the myo-epithelial cells in the rat submaxillary gland. **Journal of Anatomy**, v. 91, p. 579, 1957.

LEESON, C.R.; JACOBY, F. An Electron Microscopic Study of the Rat Submaxillary Gland During its Post-Natal Development and in the Adult. **Journal of Anatomy**, v. 93, part 3, p. 287-295, 1966.

LEÓN B.F.; LEÓN B.R.; BRAVO C.; G. Aplicaciones de la toxina botulínica en glándulas salivales. **Revista Hospital Clínico Universidad de Chile**, v. 22, n. 4, p. 355-360, 2011.

LILLIE, R.D.; FULMER, H.M. **Histopathologic technic and practical histochemistry**. 4^a ed. New York. Mc Graw Hill. 1976. 942 p.

LIM, M.; MACE, A.; REZA-NOURAEI, S.A.; SANDHU, G. Botulinum toxin in the management of sialorrhoea: a systematic review. **Clinical Otolaryngology**, v. 31, v. 4, p. 267-272, 2006.

LIMBROCK, G.J.; HOYER, H.; SCHEYING, H. Regulation therapy by Castillo-Morales in children with Down Syndrome: primary and second orofacial pathology. **ASDC Journal of Dentistry for Children**, v. 57, n. 6, p. 437-441, 1990.

LIPP, A.; TROTTENBERG, T.; SCHINK, T.; KUPSCH, A.; ARNOLD, G. A randomized trial of botulinum toxin A for treatment of drooling. **Neurology**, v. 61, n. 9, p. 1279-1281, 2003.

MAJID, O.W. Clinical use of botulinum toxins in oral and maxillofacial surgery. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 39, n. 3, p. 197-207, 2010.

MANRIQUE, D. Application of type A botulinum toxin to reduce saliva in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v. 71, n. 5, p. 566-569, 2005a.

MANRIQUE, D. Injection of botulinum toxin type a to reduce saliva in patients with neurological diseases. *Einstein*, v. 3, n. 3, p. 174-178, 2005b.

MANRIQUE, D.; BRASIL, O.O.C.; RAMOS, H. Drooling: analysis and evaluation of 31 children who underwent bilateral submandibular gland excision and parotid duct ligation. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v. 73, n. 1, p. 41-45, 2007.

MANRIQUE, D.; SATO, J. Salivary gland surgery for control of chronic pulmonary aspiration in children with cerebral palsy. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, v. 73, n. 9, p. 1192-1194, 2009.

MARCHESAN, I.Q. *Deglutição: normalidade*. In: FURKIM, A.M., SANTINI, S.C. Disfagias orofaríngeas. Editora Pró-fono. 1999. p.3-18.

MARCHESE, M.R.; ALMADORI, G.; GIORGIO, A.; PALUDETTI, G. Post-surgical role of botulinum toxin-A injection in patients with head and neck cancer: personal experience. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*, v. 28, n. 1, p. 13-16, 2008.

MARCHESE-RAGONA, R.; DE FILIPPIS, C.; MARIONI, G.; STAFFIERI, A. Treatment of complications of parotid gland surgery. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*, v. 25, n. 3, p. 174-178, 2005.

MARINA, M.B.; SANI, A.; HAMZAINI, A.H.; HAMIDON, B.B. Ultrasound-guided botulinum toxin A injection: an alternative treatment for dribbling. *The Journal of Laryngology & Otology*, v. 122, n. 6, p. 609-614, 2008.

MELO, E.C.M.; LEMOS, M.; XIMENES FILHO, J.A.; SENNES, L.U.; SALDIVA, P.H.N.; TSUJI, D.H. Distribution of collagen in the lamina propria of the human vocal fold. *The Laryngoscope*, v. 113, n. 12, p. 2187-2191, 2003.

MELVIN, JE.; YULE, D.; SHUTTLEWORTH, T.; BEGENISICH, T. Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. *Annual Review Of Physiology*, v. 67, n. 1, p. 445-469, 2005.

MENDES, M.R.; ZABEU, J.S.; CALDANA, M.L.; BERRETIN-FÉLIX, G.; BRASOLOTTO, A.G. Botox e atuação interdisciplinar. *Pet Informa*, v. 23, n. 3/4, p. 26-31, 2010.

MENINGAUD, J.P.; PITAK-ARNNOP, P.; CHIKHANI, L.; BERTRAND, J.C. Drooling of saliva: A review of the etiology and management options. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, v. 101, n. 1, p. 48-57, 2006.

MESSNER, A.H. **A Criança que Baba. IAPO - Interamerican Association of Pediatric Otorhinolaryngology**. VIII Manual de Otorrinolaringologia Pediátrica da IAPO. 91-95. Disponível em <<http://www.iapo.org.br/novo/secao.asp?s=49>>. 2009. ISBN 978-85-60209-08-8. Editores SIH, T.; CHINSKI, A.; EAVEY, R.; GODINHO, R.

MISRA, V.P. Botulinum toxin as a treatment for drooling of saliva. **Advances in Clinical Neuroscience and Rehabilitation (ACNR)**, v. 2, n. 5, p. 11-12, 2002.

MØLLER, E.; KARLSBORG, M.; BARDOW, A.; LYKKEAA, J.; NISSEN, F.H.; BAKKE, M. Treatment of severe drooling with botulinum toxin in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease: Efficacy and possible mechanisms. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 69, n. 3, p. 151-157, 2011.

MORAES, I.C.; SILVA, G.G.D.; CARVALHO, R.A.; HABITANTE, A.M.Q.B.; BERGO, P.V.A.; SOBRAL, P.J.A. Influência do grau de hidrólise do poli(vinil álcool) nas propriedades físicas de filmes à base de blendas de gelatina e poli(vinil álcool) plastificados com glicerol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 738-745, 2008.

NAKAMURA, T.; MASTSUI, M.; UCHIDAK, K.; FUTATSUGI, A.; KUSAKAWA, S.; MATSUMOTO, N.; NAKAMURA, K.; MANABE, T.; TAKETO, M.M.; MIKOSHIBA, K. M3 muscarinic acetylcholine receptor plays a critical role in parasympathetic control of salivation in mice. **The Journal of Physiology**, v. 558, n. 2, p. 561-575, 2004.

NAUMANN, M.; ALBANESE, A.; HEINEN, F.; MOLENAERS, G.; RELJA, M. Safety and efficacy of botulinum toxin type A following long-term use. **European Journal of Neurology**, v. 13, Suppl 4, p. 35-40, 2006.

NAUMANN, M.; DRESSLER, D.; HALLET, M.; JANKOVIC, J.; SCHIAVO, G.; SEGAL, K.R.; TROUNG, D. Evidence-based review and assessment of botulinum neurotoxin for the treatment of secretory disorders. **Toxicon**, v. 1, n. 67, p. 141-152, 2012.

NEVILLE, B.W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.M.; BOUQUOT, J.E. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, 820 p.

PAGAN, F.L.; HARRISON, A. A guide to dosing in the treatment of cervical dystonia and blepharospasm with Xeomin®: A new botulinum neurotoxin A. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 18, n. 5, p. 441-445, 2012.

PEDERSEN, A.M.; BARDOW, A.; BEIER JENSEN, S.; NAUNTOFTE, B. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. **Oral Diseases**, v. 8, n. 3, p. 117-129, 2002.

PORTA, M.; GAMBA, M.; BERTACCHI, G.; VAJ, P. Treatment of sialorrhoea with ultrasound guided botulinum toxin type A injection in patients with neurological disorders. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 70, n. 4, p. 538-540, 2001.

POULAIN, B.; POPOFF, M.R.; MOLGO, J. How do the botulinum neurotoxins block neurotransmitter release: from botulism to the molecular mechanism of action. **The Botulinum Journal**, v. 1, n. 1, p. 14-87, 2008.

PROCTOR, G.B. Muscarinic receptors and salivary secretion. ***Journal of Applied Physiology***, v. 100, n. 4, p. 1103-1104, 2006.

PROSIGNE: toxina botulínica tipo A [bula de remédio]. Responsável técnico: José Carlos Módolo. Itapira-SP: Cristália Produtos Químicos e Farmacêutisoc LTDA.

REDDIHOUGH, D.; ERASMUS, C.E.; JOHNSON, H.; McKELLAR, G.M.W.; JONGERIUS, P.H. Botulinum toxin assessment, intervention and aftercare for paediatric and adult drooling: international consensus statement. ***European Journal of Neurology***, v. 17, suppl. 2, p. 109-121, 2010.

REDDIHOUGH, D.S.; REID, S.M.; PLOVER, C. Evaluation of glycopyrrolate in the treatment of chronic drooling. ***Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease***, v. 2011, n. 1, p. 3-7, 2011.

REZENDE, C.L. ***Qualidade de Vida das Gestantes de Alto Risco em Centro de Atendimento à Mulher do Município de Dourados, MS***. 128 f. (Dissertação - Mestrado em Psicologia). Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande (MS), 2012.

RICE, D.H. Advances in Diagnosis and Management of Salivary Gland Diseases. ***The Western Journal of Medicine***, v. 140, n. 2, p. 238-249, 1984.

RIEDER, C.R.M.; SCHESTATSKY, P.; SOCAL, M.P.; MONTE, T.L.; FRICKE, D.; COSTA, J.; PICON, P.D. A Double-blind, Randomized, Crossover Study of Prosigne Versus Botox in Patients With Blepharospasm and Hemifacial Spasm. ***Clinical Neuropharmacology***, v. 30, n. 1, p. 39-42, 2007.

RODWELL, K.; EDWARDS, P.; WARE, R.S.; BOYD, R. Salivary gland botulinum toxin injections for drooling in children with cerebral palsy and neurodevelopmental disability: a systematic review. ***Developmental Medicine & Child Neurology***, v. 54, n. 11, p. 977-987, 2012.

RON, A.G.; MIRANDA, M.C.; BRAUN, C.G.; VERÓN, J.J.; MARTINEZ, J.T.; HANBINO, M.P.D. Eficacia y seguridad de la toxina botulínica en el tratamiento de la sialorrea en niños con diversas alteraciones neurológicas. ***Anales de pediatría***, Carta al editor, v. 77, n. 4, p. 289-280, 2012.

SANTOS, L.P.; UEMA, A.P.A.; GALASSI, M.A.S.; CIUFF, N.J. O que as Gestantes Conhecem sobre Saúde Bucal? ***Jornal Brasileiro de Odontopediatria e Odontologia do Bebê***, v. 4, n. 21, p. 429-434, 2001.

SAVARESE, R.; DIAMOND, M.; ELOVIC, E.; MILLIS, R.S. Intraparotid injection of botulinum toxin A as a treatment to control sialorrhea in children with cerebral palsy. ***American Journal of Physical Medicine Rehabilitation***, v. 83, n. 4, p. 304-311, 2004.

SEGTNAN, V.H.; KVAAL, K.E.; RUKKE, O.; SCHÜLLER, R.B.; ISAKSSON, T. Rapid assessment of physico-chemical properties of gelatine using near infrared spectroscopy. ***Food Hydrocolloids***, v. 17, n. 5, p. 585-592, 2003.

SHAN, X.-F.; XU, H.; CAI, Z.-G.; WU, L.-L.; YU, G.-Y. Botulinum toxin A inhibits salivary secretion of rabbit submandibular gland. **International Journal of Oral Science**, v. 5, n. 4, p. 217-223, 2013.

SILVA, H.A.; MELHADO, R.M. Reversibilidade dos efeitos da progesterona na glândula submandibular do camundongo fêmea. Estudo histológico e histoquímico. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 25, n. 1, p. 85-96, 1996.

SILVA, P. 1998. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan, 1314p.

SILVA, R. **Disfagia Neurogênica em Adultos: Uma Proposta de avaliação clínica**. In: FURKIM, A.M., SANTINI, S.C. **Disfagias orofaríngeas**. Editora Pró-fono. 1999.

SILVESTRE-RANGIL, J.; SILVESTRE, F.-J.; PUENTE-SANDOVAL, A.; REQUENI-BERNAL, J.; SIMO-RUIZ, J.-M. Clinical-therapeutic management of drooling: Review and update. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 16, n. 6, p.e763-e766, 2011.

SIMPSON, D.M.; GRACIES, J.-M.; GRAHAM, H.K.; HALLETT, M.; MIYASAKI, J.M.; NAUMANN, M.; RUSSMAN, B.; SIMPSON, L.L.; SO, Y. Assessment: Botulinum neurotoxin for the treatment of spasticity (an evidence-based review): Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. **Neurology**, v. 70, n. 19, p. 1691-1698, 2008.

SPOSITO, M.M.M. Toxina botulínica tipo A – propriedades farmacológicas e uso clínico. **Acta Fisiátrica**, v. 11, suppl. 01, p. S7-S44, 2004.

SPOSITO, M.M.M. Toxina Botulínica do Tipo A: mecanismo de ação. **Acta Fisiátrica**, v. 16, n. 1, p. 25-37, 2009.

SPOSITO, M.M.M. Bloqueios químicos para o tratamento da espasticidade na paralisia cerebral. **Acta Fisiátrica**, v. 17, n. 2, p. 68-83, 2010.

SRISKANDAN, N.; MOODY, A.; HOWLETT, D.C. Ultrasound-guided submandibular gland injection of botulinum toxin for hypersalivation in cerebral palsy. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 48, n. 1, p. 58-60, 2010.

SWEAT, F.; PUCHTLER, H.; ROSENTHAL, S. I. Sirius red F3BA as a stain for connective tissue. **Archives of Pathology**, v. 78, p. 69-72, 1964.

TAKAI, N.; UCHIHASHI, K.; HIGUCHI, K.; YOSHIDA, Y.; YAMAGUCHI, M. Localization of neuronal-constitutive nitric oxide synthase and secretory regulation by nitric oxide in the rat submandibular and sublingual glands. **Archives of Oral Biology**, v. 44, n. 9, p. 745-750, 1999.

TANG, X.; WAN, X. Comparison of Botox with a Chinese type A botulinum toxin. **Chinese Medical Journal**, v. 113, n. 9, p. 794-798, 2000.

TEYMOORTASH, A.; SOMMER, F.; MANDIC, R.; SCHULZ, S.; BETTE, M.; AUMÜLLER, G.; WERNER, J.A. Intraglandular application of botulinum toxin leads to

structural and functional changes in rat acinar cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 1, p. 161-167, 2007.

THEVASAGAYAM, M.S.; GAN, K.; EKSTEEN, E. Control of salivary secretions in esophageal atresia with laryngeal cleft using Botulinum toxin Type A. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 72, n. 7, p. 965-969, 2008.

TIIGIMÄE-SAAR, J.; LEIBUR, E.; KOLK, A.; TALVIK, I.; TAMME, T. Use of botulinum neurotoxin A in uncontrolled salivation in children with cerebral palsy: a pilot study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 41, n. 12, p. 1540-1545, 2012.

TIMM, L.L. Técnicas Rotineiras de Preparação e Análise de Lâminas Histológicas. **Caderno La Salle XI**, v. 2, n. 1, p. 231-239, 2005.

TOLOSA, E.M.C.; RODRIGUES, C.J.; BEHMER, O.A.; FREITAS NETO, A.G. 2003. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2ª edição. Editora Manoele Ltda. Barueri – São Paulo. 331p.

TRUONG, D.D.; BHIDAYASIRI, R. Evidence for the effectiveness of botulinum toxin for sialorrhoea. **Journal of Neural Transmission**, v. 115, n. 4, p. 631-635, 2008.

TRUONG, D.D.; JOST, W.H. Botulinum toxin: Clinical use. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 12, n. 6, p. 331-355, 2006.

TSCHENG, D.Z. Sialorrhea – therapeutic drug options. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 36, n. 11, p. 1785-1790, 2002.

TSUI, J.K.C. Botulinum Toxin as a Therapeutic Agent. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 72, n. 1, p. 13-24, 1996.

TURNER, R.J.; SUGIYA, H. Understanding salivary fluid and protein secretion. **Oral Disease**, v. 8, n. 1, p. 3-11, 2002.

UTRILLA, L.S.; REIS, C.C.A.; RIBEIRO, R.D.; MARTINI, A.S.; LOPES, R.A. Estudo histológico da glândula submandibular de camundongos adultos infectados com as Cepas Bolívia e de *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 21, p. 71-77, 1992.

VASHISHTA, R.; NGUYEN, S.A.; WHIT, D.R.; GILLESPIE, M.B. Botulinum Toxin for the Treatment of Sialorrhea: A Meta-analysis. **Otolaryngology – Head and Neck Surgery**, v. 148, n. 2, p. 191-196, 2013.

VERHEYDEN, J.; BLITZER, A.; BRIN, M.F. Other Noncosmetic Uses of BOTOX. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 20, n. 2, p. 121-126, 2001.

VIJAYASEKARAN, S.; UNAL, F.; SCHRAFF, S.A.; JOHNSON, R.F.; RUTTER, M.J. Salivary gland surgery for chronic pulmonary aspiration in children. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 71, n. 1, p. 119-123, 2007.

WATANABE, I.S.; GUIMARÃES, J.P.; OGAWA, K.; IYOMASA, M.M.; MIGLIMO, M.A.; SILVA, M.C.O.; SEMPRINI, M.; SOSTHINES, M.C.K.; LOPES, M.O.; LOPES,

R.A. Glândula submandibular de ratos com envelhecimento: observações ao microscópio eletrônico de varredura de alta resolução. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 12, p. 501-505, 2007.

WEN, W.-D.; YAN, F.; HOU, Y.-P. The mechanism of inhibitory effect on parotid gland secretion with local injection of botulinum toxin type A in the rat. **Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, v. 44, n. 1, p. 38-40, 2009.

WILKEN, B.; ASLAMI, B.; BACKES, H. Successful Treatment of Drooling in Children with Neurological Disorders with Botulinum Toxin A or B. **Neuropediatrics**, v. 39, n. 4, p. 200-204, 2008.

WONG, V.; SUN, J.G.; WONG, W. Traditional Chinese medicine (tongue acupuncture) in children with drooling problems. **Pediatric Neurology**, v. 25, n. 1, p. 47-54, 2001.

WU, C.-J.; SHEN, J.-H.; CHEN, Y.; LIAN, Y.-J. Comparison of two Different Formulations of Botulinum Toxin a for the Treatment of Blepharospasm and Hemifacial Spasm. **Turkish Neurosurgery**, v. 21, n. 4, p. 625-629, 2011.

YANG, P.-Y.; HAN, T.-I.; CHOU, L.-W.; JOU, H.-J.; CHOU, Y.-C.; MENG, N.-H. Botulinum Toxin A in the Treatment of Sialorrhea in Children with Cerebral Palsy. **Mid-Taiwan Journal of Medicine**, v. 11, p. 261-266, 2006.

YOSHIMURA, K.; FUJITA-YOSHIGAKI, J.; MURAKAMI, M.; SEGAWA, A. Cyclic AMP has distinct effects from Ca⁽²⁺⁾ in evoking priming and fusion/exocytosis in parotid amylase secretion. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 444, n. 5, p. 586-596, 2002.

YOUNIS, R.E.; ABOU ELKHIER, M.T.; MOURAD, M.I.; ELNAHAS W. The ultrastructural changes of the parotid gland of rats after intraglandular injection of botulinum toxin A. **Annals of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 1, n. 4, p. 38, 2013.

YU, J.-H. Modulating effects of prostaglandins on parasympathetic-mediated secretory activities of rat salivary glands. **Prostaglandins**, v. 31, n. 6, p. 1087-1097, 1968.

YUAN, F.; HOU, Y.; WEN, W. Immunohistochemical and morphological investigations of the influence of botulinum toxin type A on the submandibular gland of the rats. **Journal of Clinical Otorhinolaryngology/Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi**, v. 18, n. 9, p. 558-560, 2004.

YUAN, M.; SHELTON, J. Acute Sialadenitis Secondary to Submandibular Calculi After Botulinum Neurotoxin Injection for Sialorrhea in a Child with Cerebral Palsy. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 90, n. 12, p. 1064-1067, 2011.

ZALVAN, C.; BENTSIANOV, B.; GONZALEZ-YANES, O.; BLITZER, A. Noncosmetic uses of botulinum toxin. **Dermatologica Clinics**, v. 22, n. 1, p. 187-195, 2004.

APÊNDICE I – Artigo Submetido na Revista Brasileira de Ciências da Saúde – USCS (ISSN: 1678-054X)

AÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA EM GLÂNDULA SALIVAR: REVISÃO SISTEMÁTICA

ACTION OF BOTULINUM TOXIN IN SALIVARY GLAND: SYSTEMATIC REVIEW

OLIVEIRA, Jaciel Benedito¹; BARATELLA-EVÊNCIO, Liriane^{2*}; EVÊNCIO-NETO, Joaquim³

1 – Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE);

2 – Professora Doutora Associada do Departamento de Histologia e Embriologia, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE);

3 – Professor Doutor Associado do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Título curto: Ação da Toxina Botulínica em Glândula Salivar

Short title: Action of Botulinum Toxin in Salivary Gland

***Autor para Correspondência:**

Liriane Baratella Evêncio
Rua Moraes Rego, s/no,
Cidade Universitária, Recife, PE. CEP 50670-901
Fone: 55 (81) 21268515
E-mail: Liriane@uol.com.br

RESUMO

Introdução: O tratamento da sialorreia se faz necessário pelos constantes riscos trazidos por este estado de hipersalivação. Uma nova opção terapêutica surge com a aplicação da toxina botulínica em glândulas salivares. Entretanto, pouco se sabe sobre o seu mecanismo de ação no tecido glandular. **Objetivo:** Com base no exposto, este trabalho teve o objetivo de revisar sistematicamente na literatura a ação da toxina botulínica sobre o tecido das glândulas salivares submandibular e parótida. **Material e métodos:** Foi realizada uma busca eletrônica no *Portal de Periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES), que reúne as bases de dados de grande relevância para este estudo (*Pubmed, Scielo, HighWire, Crossref, Scopus e Science Direct*). **Resultados:** Foram estabelecidos critérios de inclusão e exclusão para os artigos, e um “n” de 13 trabalhos foram selecionados e utilizados. **Conclusão:** São poucas as publicações que esclarecem como os ácinos das glândulas salivares se comportam mediante aplicação da toxina botulínica. Apesar de os achados imunohistoquímicos entre os autores serem concordantes, com imunorreatividade mais fracas nas glândulas tratadas com a toxina botulínica, os dados histométricos são divergentes e há questionamentos metodológicos, necessitando de mais estudos pormenorizados para responder as questões sobre a eficácia e segurança da toxina botulínica nas glândulas salivares.

Palavras-chaves: toxinas botulínicas, glândulas salivares, sialorreia, toxinas botulínicas tipo A, glândula submandibular, ratos Wistar.

ABSTRACT

Introduction: The treatment of drooling if necessary by the constant risks brought by this state of hypersalivation. A new therapeutic option comes up with the application of botulinum toxin in salivary glands. However, little is known about its mechanism of action in glandular tissue. **Objective:** On the basis of the above, this work had the objective of systematically reviewing the literature the action of botulinum toxin on the tissue of the submandibular and parotid salivary glands. **Methodology:** An electronic search was performed on the *Portal de Periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES), which brings together the databases of great relevance for this study (*Pubmed, Scielo, HighWire, Crossref, Scopus and Science Direct*). **Results:** Were established inclusion and exclusion criteria for articles, and an "n" of 13 works were selected and used. **Conclusion:** there are few publications that clarify how the salivary gland acini behave with application of botulinum toxin. Although the immunohistochemical findings were consistent among authors, with weaker immunoreactivity in glands treated with botulinum toxin, the histometric data are divergent, requiring more detailed studies to answer the questions about the efficacy and safety of botulinum toxin in the salivary glands.

Keywords: botulinum toxins, salivary glands, sialorrhea/drooling/hypersalivation, botulinum toxin type A, submaxillary gland, rats Wistar.

1. INTRODUÇÃO

A sialorreia ou hipersalivação é um fenômeno comum em crianças durante o desenvolvimento do controle neuromuscular oral que vai dos 18 aos 24 meses. Todavia, após os 4 anos de idade a sialorreia é considerada anormal e, portanto patológica⁽¹⁾.

A hipersalivação resulta da hipersecreção das glândulas salivares, porém é comumente associada ao prejuízo do controle neuromuscular com disfunção da atividade motora oral e ao aumento do fluxo de saliva⁽²⁾. Também pode ocorrer como efeito colateral de medicamentos que atuam aumentando a atividade dos receptores específicos da via secretomotora resultando em hipersecreção. Entretanto, a maioria dos pacientes que apresentam a sialorreia tem controle neuromuscular oral deficiente⁽³⁾.

Como consequência da sialorreia inclui-se dermatite facial e perioral^(2,4); aumento das infecções periorais e orais, halitose, dificuldade de higiene, isolamento social, riscos de aspiração e perda de fluidos e eletrólitos, gerando um grande impacto na vida dos pacientes^(2,5); dificuldades para falar e pneumonia⁽⁶⁾; e riscos de infecções pulmonares⁽⁷⁾.

Por tratar-se de uma patologia multifatorial, existem várias abordagens terapêuticas. As substâncias farmacêuticas anticolinérgicas, tais como a atropina, benztropina e cloridrato de glicopirrolato são uma opção, reduzindo o volume de saliva na cavidade oral, pois bloqueiam a ação do sistema nervoso autônomo parassimpático sobre os receptores de acetilcolina das glândulas salivares⁽⁸⁻¹⁰⁾. Outras medidas incluem a medicação anti-histamínica⁽⁶⁾; a cirurgia, tais como ablação das glândulas salivares, neurectomia timpânica, transposição ou retroposicionamento de ductos excretores ou ligadura dos ductos excretores^(7,11,12); a radioterapia^(10,13,14); fonoterapia⁽¹⁵⁾; medidas técnicas de posicionamento corporal, e o “biofeedback”^(11,16-18).

Atualmente a toxina botulínica tem sido utilizada no tratamento da sialorreia^(11,19,20), pois a mesma é capaz de deprimir a atividade secretora das glândulas salivares⁽²¹⁾. Essas neurotoxinas são produzidas pela *Clostridium botulinum*, uma bactéria anaeróbica⁽²²⁾. A aplicação da toxina botulínica tipo A como tratamento para a sialorreia foi primeiro proposta em 1997, sob a forma de injeção intraglandular. A sua ação baseia-se na inibição da liberação de acetilcolina ao nível pré-sináptico, agindo sobre os terminais nervosos colinérgicos, fazendo com que ocorra um bloqueio químico local e a perda da atividade neuronal do órgão alvo⁽²³⁾.

Apesar de haver na literatura muitos trabalhos do tipo ensaios clínicos apontando a eficácia da droga, as pesquisas experimentais são escassas, havendo a necessidade de estudos pormenorizados sobre sua segurança e efeito no tecido glandular. Desta forma, este estudo tem por finalidade revisar a bibliografia publicada existente sobre os estudos experimentais, verificando os dados sobre sua eficiência e segurança da toxina botulínica nas glândulas salivares maiores.

2. MÉTODOS

Foi realizada uma busca eletrônica no *Portal de Periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) através do site <www.periodicos.capes.gov.br>, que reúne as bases de dados de grande relevância para este

estudo (*Pubmed, Scielo, HighWire, Crossref, Scopus e Science Direct*). Além dessa busca manual em listas de referências, no período que transcorreu de fevereiro a dezembro de 2013.

Para a realização do referido levantamento, utilizou-se os descritores “*Toxinas Botulínicas (Botulinum Toxins) and Glândulas Salivares (Salivary Glands) and Sialorreia (Sialorrhea, Drooling, Hypersalivation)*”, todos incluídos no Medical Subject Headings (MeSH) e Descritores em Ciências da Saúde (DeCS). A pesquisa foi realizada por um avaliador, verificando o cruzamento dos referidos descritores e seus correspondentes em inglês.

Esta pesquisa não contou com restrição de idiomas, nem se utilizou de um filtro de tempo, sendo os artigos selecionados posteriormente por critérios de inclusão e exclusão.

Foram excluídos na pesquisa artigos de revisão da literatura e relatos de caso. A escolha teve como critério de inclusão a aplicação intraglandular da toxina botulínica tipo A, ou tipo B, ou tipo A e tipo B associadas em glândulas salivares (parótida ou submandibular) de animais, e que passaram por uma posterior análise histológica.

3. RESULTADOS

Na busca no portal de periódicos da CAPES foram encontrados 71 periódicos revisados por pares. Na busca manual em listas de referências de outros artigos, um total de 184 artigos foram obtidos, somando um “n” de 255 artigos. Destes, 64 artigos foram eliminados por estarem repetidos. Os 190 periódicos restantes passaram por uma análise crítica dos avaliadores, e após aplicação dos critérios de exclusão e inclusão, um “n” de 13 artigos foram selecionados e utilizados neste trabalho.

Todos os artigos foram avaliados de forma independente por três revisores, resultando na elaboração da Tabela 1. Os artigos selecionados foram organizados quanto ao autor e ano de publicação; tipo e dose da toxina botulínica aplicada (A ou B); animal e glândula utilizada no estudo; tipo de processamento usado para avaliar a ação da droga; e principais resultados encontrados.

4. DISCUSSÃO

São poucos os trabalhos na literatura que envolvem a ação da toxina botulínica no tecido das glândulas salivares, seja parótida ou submandibular. Entretanto, em 1961, Emmelin e Engström⁽²⁴⁾ investigaram o efeito da toxina botulínica em glândulas parótidas e submandibulares de gatos, os quais notaram a diminuição da liberação de acetilcolina e aumento da sensibilidade do tecido glandular por outros agentes estimuladores da secreção salivar.

O uso da toxina na sialorreia baseou-se numa publicação que datava de 1923, onde Dickson e Shevsky observaram que o nervo timpânico que induzia salivação era bloqueado em gatas infectadas pelo *Clostridium botulinum*^(11,25). Porém como recurso terapêutico a toxina foi liberada para administração em paciente em 1989, quando a FDA (*Food and Drugs Administration*) a classifica como droga segura e eficaz para o tratamento dos distúrbios do movimento. Em 1990, o consenso do *National Institutes of Health* incluiu a toxina botulínica tipo A na lista dos medicamentos seguros e eficientes⁽²⁶⁾.

Existem poucos trabalhos envolvendo processamentos histológicos com dados histométricos e histopatológicos. Atualmente, os estudos experimentais da ação da toxina botulínica em glândulas salivares seguem uma padronização, realizados em ratos, e a maioria refere-se de estudos imunohistoquímicos. As investigações imunohistoquímicas foram feitas, principalmente, para as enzimas acetilcolinesterase (AChE) e óxido nítrico neuronal sintase (nNOS) em glândulas submandibulares e/ou parótidas, como nos trabalhos de Ellies et al.⁽⁸⁾, Ellies et al.⁽²⁵⁾, Ellies et al.⁽²⁷⁾, Ellies et al.⁽²⁸⁾ e Ellies et al.⁽²⁹⁾.

A escolha pela enzima acetilcolinesterase se justifica pelo fato de que o tratamento intraglandular com toxina botulínica consiste numa “desnervação” farmacológica das glândulas salivares, que causa inibição da liberação de acetilcolina (ACh) na junção neuroglandular (parassimpatectomia química) e produz uma redução no fluxo salivar, uma vez que a toxina botulínica inibe seletivamente os componentes colinérgicos^(30,31). A atividade da enzima acetilcolinesterase depende da concentração e da disponibilidade de seu substrato, a acetilcolina, e ambos variam de acordo com o grau de inervação colinérgica das glândulas exócrinas⁽²⁵⁾.

Já o óxido nítrico (NO) é uma pequena molécula simples, mensageiro intercelular nos mamíferos superiores, sendo importante neurotransmissor com capacidade potencializadora, com ações endócrinas, autócrinas e parácrinas⁽³²⁾. O óxido nítrico atua como um possível neuromodulador vascular na regulação de processos secretores específicos no trato aerodigestivo superior⁽⁸⁾. A enzima óxido nítrico neuronal sintase é um marcador importante nas placas terminais nervosas das glândulas salivares^(33,34).

Dessa forma, além de transmissores de acetilcolina, outros neurotransmissores, como o neuromodulador NO, também podem estar envolvidos na regulação da função da glândula salivar^(8,28,29).

Ellies et al.^(8,25,27-29), trabalharam com imunorreatividade para as enzimas acetilcolinesterase e óxido nítrico neuronal sintase, e evidenciou fraca imunorreatividade para estas enzimas nos grupos tratados com toxina botulínica, chegando a ser proporcional com o aumento da duração de exposição à toxina.

Os estudos histológicos em glândulas submandibulares, realizados por Ellies et al.⁽²⁵⁾, afirmaram não existir em suas medidas morfométricas nenhuma diferença clara dos ácinos serosos de glândulas injetadas com a toxina e com o soro fisiológico, embora ambos tivessem uma contagem nuclear ligeiramente superior do que nos ácinos do grupo controle. Não verificaram apoptose e as medidas morfométricas não revelaram alterações no volume acinar.

Já em 2000, Ellies e colaboradores⁽²⁷⁾ afirmaram que glândulas parótidas no 7º dia após aplicação da droga apresentaram-se com uma contagem nuclear um pouco menor que no grupo controle. Ainda verificaram que medidas morfométricas mostraram uma ligeira alteração no volume maior da célula acinar, especialmente no dia 7, resultando em um menor número de núcleos por área da seção. Este achado foi descrito como uma consequência da parassimpatectomia e pode se referir à retenção de produtos de excreção do corpo celular. Efeitos colaterais importantes, tais como apoptose, devido a uma reação tóxica, não foram observados.

Yuan, Hou e Wen⁽³⁵⁾, além de processamento histológico com coloração em H.E., também realizaram imunohistoquímica para substância P, um peptídeo bioativo que modula a secreção de glândulas salivares. Concluíram em seus trabalhos que não havia nenhuma infiltração celular e necrose em torno de células acinares e ductos das glândulas submandibulares, ou seja, sem processo inflamatório, embora induza temporariamente a

atrofia das células acinares e ductais. Também observaram diminuição da imunorreatividade à substância P.

Teymoortash et al.⁽³¹⁾, trataram glândulas submandibulares de ratos com toxina botulínica tipo A, B e A/B, realizaram estudos histológicos convencionais, histoquímicos e análises ultraestruturais, além de testarem a imunorreatividade para amilase. Evidenciaram uma redução no peso da glândula submandibular. Encontraram mudanças estruturais em todos os grupos tratados. Mudanças mais significativas foram observadas em glândulas retiradas de animais que receberam a administração simultânea de toxina botulínica tipo A e B, demonstrando ácinos compactados mais densamente, com forma ligeiramente alongada e a área basal basófila contendo o núcleo mais pronunciado, nos quais a avaliação morfométrica, a indicou que a área das células acinares eram menores nos ratos tratados com a toxina botulínica do que nos controles, além de alterações ultraestruturais. Também evidenciaram que as preparações para a imunorreatividade da amilase salivar foram fortemente coradas no grupo controle, diminuindo nos grupos tratados.

Dessa forma, fica claro que os resultados encontrados por Teymoortash et al.⁽³¹⁾ são divergentes daqueles encontrados por Ellies et al.⁽²⁵⁾. Os primeiros afirmam que no estudo realizado por Ellies e colaboradores⁽²⁵⁾, as avaliações morfométricas foram limitadas a descrição dos núcleos das células acinares serosas e que não usaram um método de fixação padronizados para minimizar as diferenças no encolhimento das amostras de tecidos.

Coskun et al.⁽⁹⁾, além de processamento histopatológico, utilizaram estudo radiológico antes e depois da aplicação da toxina, observando em seus resultados redução do tamanho das glândulas, mas sem alteração histológica permanente nas células. Não houve alteração na vascularização. Acredita-se que mudanças no tamanho da glândula submandibular podem ter acontecido como resultado de um efeito funcional devido à diminuição na secreção. Além disso, evidenciaram infiltração linfocitária e apoptose não foi evidenciado.

Wen, Yan e Hou⁽³⁶⁾, também fizeram imunohistoquímica para polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) e evidenciaram uma diminuição na imunorreatividade ao polipeptídeo intestinal vasoativo, que funcionaria como um possível modulador da secreção de glândulas parótidas.

Sendo assim, estes autores Yuan, Hou e Wen⁽³⁵⁾ e Coskun et al.⁽⁹⁾, concordam ao afirmar que a a toxina botulínica tipo A induz temporariamente atrofia das células acinares. Entretanto discordam no ponto em que diz respeito em haver ou não uma infiltração leucocitária. Os autores Wen, Yan e Hou⁽³⁶⁾, mas desta vez usando aplicação da toxina botulínica tipo A em glândulas parótidas de ratos, chegaram as mesmas conclusões, afirmando haver uma temporária atrofia celular, discordando dos achados de Ellies e colaboradores⁽²⁷⁾, que também utilizaram a glândula parótida e observaram um aumento do volume acinar. Gerlinger et al.⁽³⁷⁾ não observaram nenhuma alteração histológica marcante, entretanto, estes autores só analisaram a glândula após 2 meses da injeção da droga, sugerindo a finalização da ação da mesma sobre o tecido glandular.

Shan et al.⁽³⁸⁾, evidenciaram redução de tamanho das células acinares, fibrose, mudanças ultraestruturais no grupo tratado, diminuição do fluxo salivar, apoptose em células acinares e ductais nos grupos tratados com a toxina. Nos achados ultraestruturais, os grânulos secretores de forma semelhante ao descrito por Younis e colaboradores⁽³⁹⁾, o que sugeriu diminuir o espaço intercelular. Os resultados estruturais encontrados por Younis et al.⁽³⁹⁾ foram semelhantes ao descrito por Teymoortash et al.⁽³¹⁾. Além do mais, Shan et al.⁽³⁸⁾ sugeriu que o mecanismo molecular de ação da toxina botulínica tipo A, se dá pela inibição do receptor muscarínico (M3), fazendo com que haja expressão da proteína AQP5 (uma aquaporina), envolvida na secreção de água.

5. CONCLUSÕES

Com base nos achados na literatura médica, pode-se concluir que são poucas as publicações para determinar o mecanismo de ação da toxina botulínica dentro do tecido de glândulas salivares. Apesar dos achados imunohistoquímicos entre os autores serem concordantes, com imunorreatividade mais fracas nas glândulas tratadas com a toxina botulínica, os dados histométricos são divergentes e há questionamentos metodológicos, necessitando de mais estudos pormenorizados para responder possíveis questões sobre a eficácia e segurança da toxina botulínica na glândula salivar.

A melhor compreensão dos mecanismos morfológicos, histológicos e histoquímicos das glândulas salivares sob a influência da toxina botulínica está diretamente relacionada com entendimento dos profissionais que poderiam usá-la como recurso no tratamento da sialorreia. Sendo assim, deve-se incentivar novos estudos experimentais e clínicos sobre o efeito da toxina botulínica com a finalidade de tornar o uso dessa substância mais frequente e acessível, tornando-se uma prática de eleição em detrimento de técnicas mais invasivas.

REFERÊNCIAS

1. Augusto AG, Perez AC. Babação. Investigação quanto aos melhores métodos terapêuticos. *Acta ORL/Técnicas em Otorrinolaringologia*. 2006. 24(1).
2. Yang P-Y, Han T-I, Chou L-W, Jou H-J, Chou Y-C, Meng N-H. Botulinum Toxin A in the Treatment of Sialorrhea in Children with Cerebral Palsy. *Mid-Taiwan Journal of Medicine*. 2006. 11:261-6.
3. Jongerius PH, Rotteveel JJ, Van Den Hoogen F, Joosten F, Van Hulst K, Gabreëls FJM. Botulinum toxin A: a new option for treatment of drooling in children with cerebral palsy. Presentation of a case series. *European Journal of Pediatrics*. 2001. 160:509-12.
4. Bloem BR, Kalf JG, Van De Kerkhof PCM, Zwarts MJ. Debilitating consequences of drooling. *Journal of Neurology*. 2009. 256:1382-3.
5. Jankovic J. Disease-oriented approach to botulinum toxin use. *Toxicon*. 2009. 54:614-23.
6. Alter KE. High-Frequency Ultrasound Guidance for Neurotoxin Injections. *Physical Medicine & Rehabilitation Clinics of North America*. 2010. 21:607-30.
7. Ellies M, Rohbach-Volland S, Arglebe C, Wilken B, Laskawi R, Hnefeld F. Successful management of drooling with botulinum toxin A in neurologically disabled children. *Neuropediatrics*. 2002. 33(6):327-30.
8. Ellies M, Schütz S, Quondamatteo F, Laskawi R. The effect of local injection of botulinum toxin A on the immunoreactivity of nNOS in the rat submandibular gland: An immunohistochemical study. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2006. 70:59-63.
9. Coskun BU, Savk H, Cicek ED, Basak T, Basak M, Dadas B. Histopathological and radiological investigations of the influence of botulinum toxin on the submandibular gland of the rat. *European Archives of Otorhinolaryngology*. 2007. 264:783-7.
10. Bavikatte G, Sit PL, Hassoon A. Management of Drooling of Saliva. *British Journal of Medical Practitioners*. 2012. 5(1):502-507.

11. Savarese R, Diamond M, Elovic E, Millis RS. Intraparotid injection of botulinum toxin A as a treatment to control sialorrhea in children with cerebral palsy. *American Journal of Physical Medicine Rehabilitation*. 2004. 83(4):304-11.
12. Manrique D, Brasil OOC, Ramos H. Evolução de 31 crianças submetidas à ressecção bilateral das glândulas submandibulares e ligadura dos ductos parotídeos para controlar a sialorréia. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. 2007. 73(1):41-45.
13. Kasarskis EJ, Hodskins J, Clair WHS. Unilateral parotid electron beam radiotherapy as palliative treatment for sialorrhea in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*. 2011. 308:155-157.
14. Corso BL, Silveira VC, Binha AMP, Chamlian TR. Therapeutic Approach in Drooling on Cerebral Palsy: Systematic Review. *Revista Medicina de Reabilitação*. 2011. 30(1):9-13.
15. Crysedale WS. The drooling patient: evaluation and current surgical options. *The Laryngoscope*. 1980. 90:775-783.
16. Tscheng DZ. Sialorrhea – therapeutic drug options. *The Annals of Pharmacotherapy*. 2002. 36(11):1785-90.
17. Bloem B., Kalf JG, Van De Kerkhof PCM, Zwarts MJ. Debilitating consequences of drooling. *Journal of Neurology*. 2009. 256:1382-3.
18. Valencia DV, Mendoza A. Toxina botulínica tipo A, una nueva opción en el tratamiento de la sialorrea en niños con parálisis cerebral. *Revista Colombiana de Medicina Física y Rehabilitación*. 2011. 21(1):23-31.
19. Lagalla G, Millevolte M, Capecci M, Provinciali L, Ceravolo MG. Long-lasting benefits of botulinum toxin type B in Parkinson's disease-related drooling. *Journal of Neurology*. 2009. 256:563-7.
20. Intiso D. Therapeutic Use of Botulinum Toxin in Neurorehabilitation. *Journal of Toxicology*. 2012.
21. Ellies M, Gottstein U, Rohrbach-Volland S, Arglebe C, Laskawi R. Reduction of salivary flow with botulinum toxin: extended report on 33 patients with drooling, salivary fistulas, and sialadenitis. *The Laryngoscope*. 2004. 114:1856-60.
22. Sposito MMM. Botulinic Toxin Type A: action mechanism. *Acta Fisiátrica*. 2009. 16(1):25-37.
23. Bushara KO. Sialorrhea in amyotrophic lateral sclerosis: a hypothesis of a new treatment – botulinum toxin A injections of the parotid glands. *Medical Hypotheses*. 1997. 48:337-9.
24. Emmelin N, Engström J. Supersensitivity of Salivary Glands Following Treatment With Bretylium or Guanethidine. *British Journal of Pharmacology*. 1961. 16:315-9.
25. Ellies M, Laskawi R, Götz W, Arglebe C, Tormählen G. Immunohistochemical and morphometric investigations of the influence of botulinum toxin on the submandibular gland of the rat. *European Archives of Otorhinolaryngology*. 1999. 256:148-52.
26. Sposito MMM. Toxina botulínica tipo A – propriedades farmacológicas e uso clínico. *Acta Fisiátrica*. 2004. Suplemento 01:S7-S44.
27. Ellies M, Laskawi R, Tormählen G, Götz W. The Effect of Local Injection of Botulinum Toxin A on the Parotid Gland of the Rat: An Immunohistochemical and Morphometric Study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2000. 58:1251-6.
28. Ellies M, Laskawi R, Schütz S, Quondamatteo F. Immunohistochemical Evidence of nNOS and Changes after Intraglandular Application of Botulinum Toxin A in Cephalic Salivary Glands of Adult Rats. *Journal for Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery (ORL)*. 2003. 65:140-3.
29. Ellies M, Schütz S, Quondamatteo F, Laskawi R. Immunohistochemical Investigations of the Influence of Botulinum Toxin A on the Immunoreactivity of nNOS in the

- Parotid Gland of the Rat. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2006. 64:397-401.
30. Ellies M, Laskawi R, Rohrbach-Volland S, Arglebe C, Beuche W. Botulinum toxin to reduce saliva flow: selected indications for ultrasound-guided toxin application into salivary glands. *The Laryngoscope*. 2002. 112:82-6.
 31. Teymoortash A, Sommer F, Mandic R, Schulz S, Bette M, Aumüller G, Werner JA. Intraglandular application of botulinum toxin leads to structural and functional changes in rat acinar cells. *British Journal of Pharmacology*. 2007. 152:161-7.
 32. Flora Filho R, Zilberstein B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2000. 46(3):265-71.
 33. Chiba T, Tanaka K. A target specific pathway from nitric oxide synthase immunoreactive preganglionic sympathetic to superior cervical ganglion neurons innervating the submandibular salivary gland. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 1998. 71:139-47.
 34. Takai N, Uchihashi K, Higuchi K, Yoshida Y, Yamaguchi M. Localization of neuronal-constitutive nitric oxide synthase and secretory regulation by nitric oxide in the rat submandibular and sublingual glands, *Archives of Oral Biology*. 1999. 44:745-50.
 35. Yuan F, Hou Y-P, Wen W-D. Immunohistochemical And Morphological Investigations Of The Influence Of Botulinum toxin type A on the submandibular gland of the rats. *Journal of Clinical Otorhinolaryngology/Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*. 2004. 18(9):558-60.
 36. Wen W-D, Yan F, Hou Y-P. The mechanism of inhibitory effect on parotid gland secretion with local injection of botulinum toxin type A in the rat. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2009. 44(1):38-40.
 37. Gerlinger I, Szalai G, Hollódy K, Németh A. Ultrasound-guided, intraglandular injection of botulinum toxin A in children suffering from excessive salivation. *The Journal of Laryngology & Otology*. 2007. 121:947-51.
 38. Shan X-F, Xu H, Cai Z-G, Wu L-L, Yu G-Y. Botulinum toxin A inhibits salivary secretion of rabbit submandibular gland. *International Journal of Oral Science*. 2013. 5:217-23.
 39. Younis RE, Abou Elkhier MT, Mourad MI, Elnahas W. The ultrastructural changes of the parotid gland of rats after intraglandular injection of botulinum toxin A. *Annals of Oral & Maxillofacial Surgery*. 2013. 30;1(4):38.

Tabela 1: Estudos sobre a ação da toxina botulínica na glândula salivar de ratos, identificados por autor, ano, tipo e dose da toxina, glândula salivar e metodologia de estudo utilizados e principais resultados.

Autores e ano	Tipo e dose de toxina botulínica	Animal e glândula utilizados	Metodologia de estudo	Principais resultados
Ellies et al., 1999 ²⁵	BTX-A, 2,5 U (Botox [®]).	19 ratas Wistar (200-360 g). Glândula submandibular direita.	Análises com 7, 14 e 28 dias após aplicação. Processamento histológico (HE) e Imunohistoquímica para Acetilcolinesterase.	Imunorreatividade mais fraca nos dias 7, 14 e 28 no grupo tratado. Contagem nuclear ligeiramente superior do que os controles. Sem alteração no volume acinar.
Ellies et al., 2000 ²⁷	BTX-A, 2,5 U (Botox [®]).	16 ratas Wistar (200-360 g). Glândula parótida direita.	Análises com 7, 14 e 28 dias após aplicação. Processamento histológico (HE) e Imunohistoquímica para Acetilcolinesterase.	Imunorreatividade fraca no grupo tratado observada nos dias 7 e 14. Mais forte no dia 28. Contagem nuclear um pouco menor que nos controles. Ligeiro aumento no volume acinar.
Ellies et al., 2003 ²⁸	BTX-A, 2,5 U (Botox [®]).	10 ratas Wistar (200-360 g). Glândula parótida e submandibular direita.	Análises com 7, 143 e 28 dias após aplicação. Imunohistoquímica para Óxido Nítrico Sintase Neuronal (nNOS).	Observado fraca imunorreatividade proporcional com o aumento da duração de exposição à toxina no grupo tratado.
Yuan, Hou, Wen, 2004 ³⁵	BTX-A, 2,5 U. (Prosigne [®]).	18 ratas Wistar (210-280 g). Glândula submandibular direita.	Análises com 6, 10 e 30 dias após aplicação. Processamento histológico (HE) e Imunohistoquímica para substância P.	Atrofia temporária das células acinares e ductais. Sem processo inflamatório. Fraca imunorreatividade no grupo tratado.
Ellies et al., 2006a ⁸	BTX-A, 2,5 U (Botox [®]).	20 ratas Wistar (200-360 g). Glândula submandibular direita.	Análises com 5, 7, 14 e 28 dias após aplicação. Imunohistoquímica para Óxido Nítrico Sintase Neuronal.	Observado fraca imunorreatividade proporcional com o aumento da duração de exposição à toxina no grupo tratado.
Ellies et al., 2006b ²⁹	BTX-A, 2,5 U (Botox [®]).	20 ratas Wistar (200-360 g). Glândula parótida direita.	Análises com 5, 7, 14 e 28 dias após aplicação. Imunohistoquímica para Óxido Nítrico Sintase Neuronal.	Observado fraca imunorreatividade proporcional com o aumento da duração de exposição à toxina no grupo tratado.

Coskun et al., 2007 ⁹	BTX-A, 2,5 U (Botox [®]).	15 ratos Wistar (275-325 g). Glândula submandibular direita.	Análises com 14 e 28 dias após aplicação. Processamento histológico (HE) e exame ultrassonográfico.	Redução do tamanho das glândulas, mas sem alteração histológica permanente nas células. Infiltração linfocitária.
Teymoortash et al., 2007 ³⁵	BTX-A, B ou A/B (Botox [®]). BTX-A: 5 U; BTX-B: 250 U (1:50, fator de conversão).	18 ratos Wistar (250-300 g). Glândula submandibular direita.	Análises com 14 dias após aplicação. Análise macroscópica, processamento histológico (HE), histoquímica, imunohistoquímica para amilase e microscopia eletrônica de transmissão (MET).	Redução do peso da glândula. Ácinos mais compactados e com área menor. Imunorreatividade menor nos grupos tratados. Mudanças ultraestruturais no grupo tratado.
Gerlinger et al., 2007 ³⁷	BTX-A. 8 U. Marca não informada.	3 coelhos (2,5 kg). Glândula submandibular direita.	Análise com 8 semanas após a aplicação.	Sem observação de alterações histológicas marcantes e redução temporária da produção de saliva.
Wen, Yan, Hou, 2009 ³⁶	BTX-A. 2,5 U (Prosigne [®]).	18 ratos Wistar (210-280 g). Glândula parótida direita.	Análises com 7, 12 e 35 dias após aplicação. Processamento histológico (HE) e imunohistoquímica para polipeptídeo vasoativo intestinal.	Temporária atrofia celular e diminuição da imunorreatividade no grupo tratado.
Shan et al., 2013 ³⁸	BTX-A. 10 U e 5U (Prosigne [®]).	30 coelhos (2,4+/-0,3 kg). Glândula submandibular esquerda.	10 U – análise com 1 semana; 5 U – análises com 1, 2, 4 e 12 semanas. Processamento histológico (HE), MET, Tunel (apoptose), imunofluorescência para AQP5, fluxo salivar e PCR para M3	Redução de tamanho das células acinares, fibrose, mudanças ultraestruturais no grupo tratado, diminuição do fluxo salivar, apoptose em células acinares e ductais no tratado, inibição do receptor M3, e localização de AQP5 no citoplasma da célula.
Younis et al., 2013 ³⁹	BTX-A, 2 U (Botox [®]).	15 ratos Wistar (150-200 g). Glândula parótida direita.	Análise com 20 dias após a aplicação. Processamento histológico (HE) e MET.	Redução no tamanho dos ácinos, com menos grânulos secretores e com vacúolos extensos e grosseiros. Espaços interlobulares mais largos. Mudanças ultraestruturais no grupo tratado.

ANEXO I – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 30 de novembro de 2012.

Ofício nº 518/12

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Liriane Baratella Evencio**
Departamento de Histologia e Embriologia
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.045320/2012-52

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Avaliação da Influência da Toxina Botulinica Tipo A (BTX-A) na Glândula Submandibular de Ratos: Estudo Morfológico, Imunohistoquímico e Bacteriológico”**.

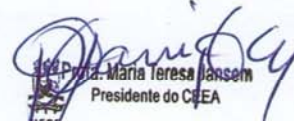
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição-UFPE; Animais: Ratos; Linhagem: Wistar; Sexo: Fêmeas; Número de animais previsto no protocolo: 42 ratos; Peso: 300-360g; Idade: 3 meses.

Atenciosamente,


Prof.ª Maria Teresa Jansen
Presidente do CEUA

