

JACIEL BENEDITO DE OLIVEIRA

**AÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA TIPO A NO COMPLEXO SUBMANDIBULAR-
SUBLINGUAL DE RATOS: ESTUDO MORFOLÓGICO, MICOLÓGICO,
BIOQUÍMICO E TOXICOLÓGICO**

Recife, PE

2017



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 no Complexo Submandibular-Sublingual de Ratos: Estudo Morfológico, Micológico, Bioquímico e Toxicológico

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

Orientador:

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto

Co-orientadora:

Profa. Dra. Liriane Baratella Evêncio

Recife, PE

2017

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que seja citada a fonte, respeitando todo o direito autoral.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE

(Biblioteca Central Professor Mário Coelho de Andrade Lima da Universidade Federal Rural de Pernambuco, *Campus Recife*)

Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

Ficha Catalográfica

O48a Oliveira, Jaciel Benedito de
Ação da toxina botulínica tipo A no complexo submandibular-sublingual de ratos: estudo morfológico, micológico, bioquímico e toxicológico / Jaciel Benedito de Oliveira. – 2017.
228 f. : il.

Orientador: Joaquim Evêncio Neto.
Co-orientadora: Liriane Baratella Evêncio.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, BR-PE, 2017.
Inclui referências, anexo(s) e apêndice(s).

1. Glândula submandibular 2. Toxina botulínica tipo 3. Sialorreia 4. Microbiota 5. Saliva 6. Apoptose 7. Eletrólitos 8. Proteínas salivares 9. Biópsia de linfonodo sentinela 10. Infecções fúngicas
I. Evêncio Neto, Joaquim, orient. II. Evêncio, Liriane Baratella, coorient. III. Título

CDD 636.089

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

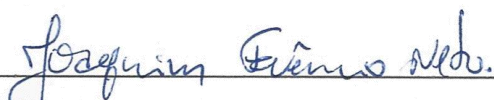
**AÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA TIPO A NO COMPLEXO SUBMANDIBULAR-
SUBLINGUAL DE RATOS: ESTUDO MORFOLÓGICO, MICOLÓGICO,
BIOQUÍMICO E TOXICOLÓGICO**

Tese elaborada por

JACIEL BENEDITO DE OLIVEIRA

Aprovado em 03 de maio de 2017.

BANCA EXAMINADORA:



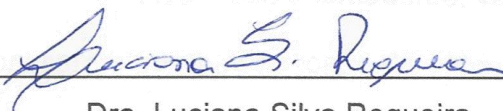
Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto (Presidente e Orientador)

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE



Profa. Dra. Carla Cabral dos Santos Accioly Lins

Departamento de Anatomia, CB/UFPE



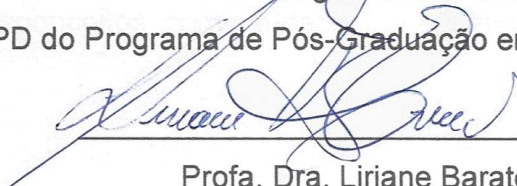
Dra. Luciana Silva Regueira

Cirurgiã-Dentista das Forças Armadas do Brasil (Exército) e IMIP (Instituto de
Medicina Integral Professor Fernando Figueira)



Dra. Lígia Reis Moura Estevão

PNPD do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, UFRPE



Profa. Dra. Liriane Baratella Evêncio

Departamento de Histologia e Embriologia, CB/UFPE

Recife, PE

2017

A Deus, causa primária de tudo e de todos, inteligência suprema, amor, justiça e
caridade.

A Jesus Cristo, nosso mestre e irmão maior.

Aos meus pais e avós pelo amor incondicional e dedicação.

Aos meus orientadores, verdadeiros pais científicos.

Aos mestres que passaram por mim ao longo de anos, professores inspiradores.

Aos pacientes que sofrem com a sialorreia e demais doenças.

Aos meus irmãos de sangue e de espírito, amigos que sempre estiveram comigo.

Aos animais de laboratório.

Ao futuro! Que seja melhor, com mais igualdade, inclusão social, justiça, sem
preconceitos, com caridade, beneficência, indulgência, perdão, paz e amor.

Com todo o amor, dedico.

Jaciel Benedito de Oliveira

AGRADECIMENTOS

Ao meu bom Deus, causa primaria de tudo no Universo, que nos criou a sua imagem e semelhança, sinônimo de amor, justiça, sabedoria, misericórdia e esperança. E nos possibilitou a tudo isso. Obrigado pela oportunidade de viver este momento, por ter aprendido moralmente e intelectualmente ao longo destes anos.

Ao nosso irmão maior, Jesus Cristo. Amor de Deus que se fez matéria, que nos ensinou o sentido de amar, nos cuida e ama, através de toda espiritualidade amiga, nossos anjos de guarda.

Aos meus pais, Marinalva Maria Ferreira e João Benedito de Oliveira, por todo amor e incentivo dado durante toda a minha vida. Muitas vezes incompreendido, ou carente de algo que eles não tiveram. Mas que, com sua forma de amar, estavam ali do meu lado. Obrigado pelo amor incondicional, pela força e segurança fazendo com que eu sempre acreditasse nos meus objetivos, sobretudo para a minha mãe. Hoje, mãe, olho para e pele das minhas mãos e vejo quão fina ela é... Já escutei de alguns: “mãos de doutor”! Agradeço a ti por elas, enquanto as tuas, e a do meu pai, são grossas, calejadas pelo trabalho da vida, as minhas não o são. Se um dos propósitos dos senhores foi formar um filho com mãos de doutor, aqui estou, cumprindo esta missão. Obrigado! Amo vocês!

As minhas avós, Otilia Maria da Conceição (*[in memoriam]*) que, com seu analfabetismo, usava meu anel de formatura do ABC, e me chamava de “Doutor”, plantando em semente em minha mente, no meu cerne) e Helena Maria da Paz. Aos meus avôs, Benedito Gonçalo de Oliveira e Sebastião José Ferreira (*in memoriam*). As minhas irmãs Lucicleide Soares, Janaina Maria de Oliveira e Jaiana Maria de Oliveira, com os respectivos cunhados, Felipe, Roberto e Ricardo. Ao meu irmão Emerson Ferreira e cunhada Jade. Somos “briguentos”, “arengueiros”, introspectivos, mas na hora do aperto, nos damos as mãos. A minha tia, quase avó, Maria Benedita de Oliveira. Obrigado Família. É para vocês e por vocês também!

Um agradecimento especial aos meus orientadores, Joaquim Evêncio Neto e Liriane Baratella Evêncio, pela orientação dedicada, desde a época da graduação. A professora Liriane, com seu jeito doce, maternal, calma, serena e acolhedora. Quantas vezes não fui bater em sua sala em busca para falar de trabalho, mas encontrava outra coisa: paz, tranquilidade e uma palavra amiga. Ao escrever estes agradecimentos, lembrei que em abril de 2017, fazem 10 anos que tive a grande

oportunidade e felicidade de tornar-me aluno da “profa. Liri”. A partir daí, comecei a conhecer a Histologia e a vivê-la verdadeiramente. Comecei a admirar ainda mais a tarefa de ser professor. Agradeço por estes 10 anos de ensinamentos, confiança, estímulo e paciência. E o professor Evêncio, com seu jeito mais sério, que as vezes impunha um medo, mas que ao mesmo tempo brincava com sua calma e de forma surpreendente, nos enchia de alegria e confiança. Obrigado pela confiança e, nos momentos de convivência mais próxima, agradeço pelos preciosos ensinamentos, que contribuíram para a minha formação acadêmica, profissional e pessoal. Obrigado por estes cinco anos de orientação e pela oportunidade de conhecer e fazer parte da UFRPE, onde encontrei pessoas para a vida toda. Aos dois, obrigado pela inspiração e pelo modelo de profissional e família que um dia espero ser. Muitos foram os conselhos e as reflexões.

Aos amigos que trabalharam ao meu lado, fazendo com que os experimentos dessem certo, discutindo e nos divertimos. Hora sob estresse, aperreio e falta de paciência. Mas sempre unidos: Priscilla Suelen Oliveira Carvalho da Silva, Marcele Walmsley Nery, Gabriela de Andrade Lima Valença, Juliana Cristina Peixoto Conceição e Priscylla Gonçalves Correia Leite de Marcelos. Muito grato a vocês.

Agradeço especialmente à Luciana Silva Regueira, por uma amizade que, apesar de ficar mais restrita a vida acadêmica, existe e que transcendeu os muros da Ciência. Dividimos aflições, dinheiro, ratos, toxinas, sonhos e tantas outras coisas. Minha amiga Lú, como foi bom ter-te por perto nestes anos de luta, desde o mestrado. Obrigado pela parceira e por esta louca aventura chamada Doutorado.

Agradeço ao Rair de Menezes Quirino, sempre pronto e disposto para. Sem tempo ruim e se sacrificando em prol dos outros. Fiel companheiro de luta diária. Guerreiro e otimista. Amigo que enfrentou comigo mais que o Doutorado e um monte de fungos, mas que esteve presente em momentos bons e, sobretudo nos ruins. Quando pensei em desistir de tudo, esteve do meu lado. Foi firme nos momentos “do meu desequilíbrio de saúde física, mental e espiritual”. Ainda se escrevesse 10 páginas de agradecimento, seria pouco para dizer obrigado.

Nessa empreita, sou grato ao Leonardo Prezzi Dornelles, com nosso jeito diferente e ao mesmo tempo, harmônico de ser. Obrigado por todos os dias de laboratório, os ensinamentos bioquímicos, testes e retestes com saliva e aulas de inglês. Obrigado pela diversão e experiência. Obrigado pelo incentivo, apoio e acreditar em mim, quando tinham tomado todas as minhas forças e que eu nem sabia o que acontecia

comigo. Quantas vezes o meu coração doeu com e sem motivos, e você aparecia lá para ajudar? Eu sei que não foi fácil, mas foi preciso tudo isso para evoluirmos e melhorarmos enquanto pessoas. Bons sentimentos sempre. Sou grato!

Tenho que fazer mais um agradecimento especial à Maria Edna Barros, não só pelas dicas de processamento histológico, pelas ajudas e pelas horas e horas na frente do Microscópio da Zeiss, mas pelas tapiocas, pastéis, praias, conselhos sobre a vida, por ser a amiga que é, minha dama, cia de tantos momentos bons, colo nos momentos ruins e por nossos sonhos de viagens. Obrigado “Ednann”! Você não foi, você é fundamental.

À Mariana Rego, mãe de Bento e esposa de Leo! Minha amiga, o que teria sido de mim sem você para puxar e não deixar ninguém quieto. Como gosto da tua família, da forma como olha para vida e da tua amizade. Obrigado pelo apoio e por todas as vezes que me ligou xingando e oferecendo ajudas. Obrigado Mari dos óculos modernos! Aproveito o parágrafo para dizer ao Joca Macêdo, que ele foi importante em todo este processo, ajudando nas dicas para eu fazer as análises sorológicas, mas, principalmente no incentivo e alegria de ser. E ao Ely João por tanta receptividade e carinho. A Renata Felix Triane, vovó linda e de energia superpositiva, com pensamento saudáveis e zen! E para completar a turma dos “Beijinhos”, a mestre dos pintinhos, minha querida amiga Priscilla Rocha, com seu jeito meigo, sensível e educado, mas sempre rindo de nossas ciladas! Não pode esquecer do Prof. Chico, que chegou, fui o primeiro que ele conheceu e logo se juntou as nossas saídas!

Outro agradecimento especial à Carolline Guimarães D’assunção, doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal (PPGBA), pelas palavras de apoio, por sempre nos receber sorrindo, por sua personalidade altruísta e por todas as vezes que me ajudou na realização das reações de imunohistoquímica e estudos estatísticos. Não posso esquecer das “garotas estatísticas” e de laboratório: Juliete Lira, Aline Mariano, Danielle Dutra, Wanessa Noadya, Cinthia Giselle, Fabiana Felix e Thais Almeida!

Ao Dr. Cleyton Charles Dantas Carvalho, do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, por ter aberto as portas do laboratório e pela ajuda na realização do ionograma da saliva e do soro sanguíneo.

Aos amigos especiais, e que nos momentos mais difíceis não deixam eu cair. Seguraram na minha mão, me levaram à praia, aos bares e aos médicos. O tempo

voou, muitas coisas aconteceram, vivemos coisas novas, descobrimos mais afinidades e diferenças, mas uma coisa é certa: existe amizade de verdade. Por isso e por toda a vibração positiva, palavras de apoio e incentivo, sou grato a vocês todos: Nathalia Alves (Velhotinha, ao apoio de sempre, aos ouvidos, as ridas, a dupla dinâmica), Renata Campina (Meu Bem, que em tantas horas se fez presente, seja na labuta diária, nas idas às praias ou para as endoscopias), Marilene Costa (Mari, Dona Mari, amiga que nos cuida com muito carinho, todos os dias), Tacila Nunes (Mô Fiu), Karolzinha Costa (Drupa), Iris Luna (Cabeça), Karina Lima, Virgínia Svedese (Svedesesese Michelly), Jhinny Cas (Dinny Princesa), Anadierge Moura (Aninha), Emmerson Silva (Enso Ôô), Larissa Cavalcanti (Lari Meu Bem), Laíse Souza (Jujubex Tequila), Midori Sugaya, Elisângela Pereira (Elis), Ana Carolina Lopes (Krol Cuscuz), Vanessa Barreto (Van), Emmanuel Pontual (Mano), Gabriel Faienstein (Nego Biel), Amanda Figueiredo (Mandinha), Marccone Marinho (AmigoOoO), Tony T Sales, Rafael Freitas, Paulo Henrique (PH), Juliana Ramos, Taciana Rocha (Taci Maninha), Vanessa Leandro (Vanessinha), Laís Meira, Rivaldo Maçaneta Rocha, Willian Freitas (profs.), Giwellington Albuquerque (Gil), Arthur Marrocos, Gabriel Ferreira, Carlos Bispo, Carlos Heitor, Vivi Nunes (Mamis de Sophia), Acanthis, Lili, Raphael Marinho (Carinha), Rafael Guerra e tantos outros queridos. Tenho certeza que esqueci de citar alguém, talvez pelo calor da emoção, mas saibam que tenho todos em meu peito.

Ao meu eterno aperreio Daianne Nobre (praticamente me empurrou para o computador e me fez escrever o final da tese e ficou pegando no meu pé lá do Canadá, além de anos, com sua sensibilidade, ter me apoiado emocionalmente em vários momentos) e a minha Pitchulinha n.º 1, Ludmilla Albuquerque. Aos meus amigos Dalits de sempre, que nunca pararam de apoiar: Rayanne Melo, Aida Camila (Dupla Aidõõõ), Ilana Maciel, Viviane Fiel, Isis Melo, Rosalvo Oliveira (Zé Cigarro de Resina Acrílica), Carla Eugênia, Nancy Rodrigues, Tarsila Menezes, Fernanda Lima, Estelinha Dourado, Flávia Renata e Betânia Ferreira. Minha sempre dupla de TCC, Thais Carine. Aos meus amigos, sempre “pontes citoplasmáticas”: Fernanda Dias, Thiago Pajeú, Alluanan Adelson e Jéssica Santana. Como é bom amar todos vocês! Amigas do tempo do vestibular, Reisa Pinha e Maria Carolina (amiga e mãe da minha linda afilhada Letícia).

Agradeço a toda minha família, tios e tias, que são muitos, porém especiais. Em nome dos meus tios, agradeço a tia Maria Benedita, por todo amor e carinho, por cuidar tão bem e desejar sempre o melhor; minha Madrinha Severina Bio, que do seu

jeito, sempre me presenteia com tanta alegria e amor; e, motivo de bons momentos no interior, meu padrinho José Mendes (*in memoriam*).

Em nome dos meus primos, agradeço a Dulcineide de Oliveira e Ricardo Oliveira. Temos planos para cumprir, não tem como escapar deles. Deus disse que tinha que ser assim, e desta forma está sendo. Quem diria que depois de tanto tempo, a gente se afinaria e repartiria tantas coisas em comum? Agradeço pelo apoio e cuidado. Agradeço por ter me apresentado a uma outra família, a família Morada do Sol. Obrigado de coração. Hoje sou mais feliz pela acolhida e tratamento recebido. Também agradeço pela ida à Brasília, experiência enriquecedora e a Flavinha que nos recebeu super bem e ainda fez um tour conosco, foi ótimo!

Agradeço ao Dr. Adamastor e à Verinha Maciel, em nome de todos (Cicleide, Luciana, Ivan, André, Brenda, Paulinho e tantos outros trabalhadores) que fazem a família Morada do Sol. Lá cheguei desconsolado. Lá cheguei em busca de esperança, explicações e de motivos para continuar e viver. Lá eu encontrei muito mais do que isso. Encontrei amor e razão. Encontrei uma fé racional, pensamento filosófico e ciência. Lá aprendi a ter esperança, de “esperançar” e não de esperar. Lá eu comecei a me libertar e ficar bem. Além de ter me apresentado o Grupo Despertar, que tão bem cuida dos moradores de rua, casas de idosos e crianças carentes da cidade do Recife, pois por conta das nossas ações, comecei a ver além de um corpo físico, o que me transformou humildemente. Por isso, agradeço à Raquel do Monte, em nome de todos que fazem este grupo.

Ao longo deste ano, duas pessoas, dois profissionais, uma psicóloga chamada Renata Allain e um psiquiatra chamado Dennison Monteiro, aceitaram mais um desafio em suas vidas profissionais. Eu não queria mais escrever esta Tese. Eu não queria mais, simplesmente. E semana a semana, mês a mês, com muita conversa, tudo foi se transformando. Reparti com eles medos, angústias, fracassos e a apoptose quando deu certo. Demos um jeitinho aqui, outro ali, e acompanhei. Obrigado pelos cuidados. E falando de cuidados, sou grato a Ana Carolina Liberal, pela acupuntura, reike, florais e auriculoacupuntura.

Aos meus alunos das turmas de Graduação e Especialização. Meus monitores e ICs. Ser professor é professar a fé e a certeza de que tudo terá valido a pena se o aluno se sentir feliz pelo que aprendeu com você e pelo o que ele lhe ensinou. Foi e é por vocês também! Sinto-me feliz em fazer parte da formação de Biólogos (Licenciados, Bacharéis e Ambientalistas), Cirurgiões-Dentistas, Médicos, Fisioterapeutas,

Licenciados em Dança, Biomédicos, Fonoaudiólogos, Enfermeiros, Terapeutas Ocupacionais, Nutricionistas, Educadores Físicos e Engenheiros Biomédicos!

Aos professores, amigos de trabalho do Departamento de Anatomia e da UFPE, que me apoiaram e incentivaram: Fernanda Villarouco, Renata Campina, Fátima Galdino, Carla Cabral, Graça Coriolano, Lígia Galindo, Elizabeth Neves, Manuela Lira, Vieira Sobrinho, Vanildo Lima, Sandra Lopes, Ana Cristina, Fernando Augusto, Kamilla Dinah, Eduarda Moretti, Emerson Xavier e Ardilles Santos. Cláudio Heliomar, Fátima Galdino e Carla Cabral, ex-orientadores e amigos. Vanildo Lima, um chefe singular. Ana Cláudia Araújo (Aninha L'amour), pelos jantares, vinhos e diversão juntos com Anselmo. Aqui coloco o agradecimento a alguns professores do ensino fundamental e médio, que nunca vou esquecer: Mônica, Vânia, Miriam, Fátima Galvão, Edna, Lindalva, Ismênia, Beatriz Coelho e Sandra.

Abro mais um parágrafo para outro agradecimento especial à professora Fernanda Villarouco (Fernandinha). Desde 2005, minha primeira aula na UFPE. Comecei com medo, pois no ensino médio diziam que os professores da Federal eram "monstros". E nesta primeira aula, foi tudo ao contrário. Ela me apresentou a Anatomia, e por esta ciência comecei a amar a Morfologia. Além de todo cuidado, capricho e trabalho para me trazer de volta para casa, a UFPE. Sobretudo pelos puxões de orelhas e conselhos. Grato sempre!

Ao Prof. Dr. José Guido Corrêa de Araújo Júnior, pelo acolhimento no Serviço de Cirurgia Geral do Hospital das Clínicas (HC), humanidade e excelente cirurgia realizada em minha avó. Num momento de desespero, quando não sabemos direito o que fazer, é que aparecem as pessoas certas para ajudar na caminhada.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), nas pessoas da Magnífica 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 (PRPPG), nas pessoas da Pró-Reitora Profa. Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra e do Coordenador Geral dos Programas de Pós-Graduação *Stricto Sensu* (CPPG), Prof. Dr. Mario de Andrade Lira Junior; ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFO), nas pessoas do Diretor Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto e do Diretor Substituto Eventual, Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá; e ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal (PPGBA), nas pessoas do Coordenador Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota e da Vice-coordenadora, Profa. Dra. Tatiana Souza Porto. À Fundação de Amparo à Ciência e

Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), na pessoa do Prof. Dr. Abraham Benzaquen Sicsu, pela concessão da bolsa de pós-graduação.

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), nas pessoas do Magnífico Reitor Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado e da Vice-Reitora Profa. Dra. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos, que além de ser meu local de trabalho, nos acolheu para fazermos parte dos nossos experimentos. À Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESQ), na pessoa do Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto, pelo incentivo financeiro através do Edital de Apoio a Grupos de Pesquisa (2014) e do Edital de Auxílio Jovem Pesquisador (n.º 01/2015).

Aos demais professores doutores do PPGBA, no qual tive o prazer de aprender: Prof. Valdemiro Júnior, Profa. Ana Porto, Profa. Valéria, Prof. Álvaro, Prof. Romildo, Prof. Fabrício e Prof. Lêucio. A secretária e amiga Edna Cherias, que nos atendia com toda paciência possível e resolvia nossos problemas.

Aos funcionários responsáveis pela limpeza, conservação e segurança das dependências do PPGBA, DMFO, NCE, Dept. de Anatomia, CENAPESQ, com quem construí uma amizade e que sempre me ajudaram com materiais nos momentos de atendimento. Aqui destaco Seu Paulo, Dona Nalda, Rejane e, sobretudo, Mari.

Aos prezados membros da Banca do Exame de Qualificação, Profa. Dra. Elizabeth Arruda Carneiro Ponzi (Beth de Cirurgia, querida desde a graduação) e Dra. Luciana Silva Regueira (honrado em tê-la em minha banca), por todas as contribuições. Tenham a certeza que este trabalho se tornou melhor, com vossos julgamentos!

Agradeço também aos demais membros da Banca de Defesa da Tese do Doutorado, Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto (meu Orientador), Profa. Dra. Liriane Baratella Evêncio (minha Co-orientadora), Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza (Chico), Dra. Lígia Reis Moura Estevão (mais uma vez contribuindo para o meu crescimento), Profa. Dra. Carla Cabral dos Santos Accioly Lins (Carlita, amiga de trabalho. Obrigado pela garrafinha com Água Benta, jamais esquecerei), Dra. Luciana Silva Regueira (mais uma vez Lú), Dra. Maria Edna Gomes de Barros (Meu Bem) e Dra. Mariana Gomes do Rêgo (Mari).

E à vida... Por mais de uma vez fui salvo. Um incêndio em 1997 devastou meu quarto, o fogo devorou tudo, menos a mim. E no final do ano de 2015, cheguei na beira de um penhasco. Estive prestes a cair. Passei o ano de 2016 numa luta sem fim. Luta contra mim, contra as expiações e provas! Dormi dirigindo. Adoeci várias vezes.

Outras, não quis nem sair da cama. Mas tinha algo maior, mais forte, mais sereno me segurando. É para eu estar aqui! Algumas vezes acordei no meio da noite, e tive a impressão da tua presença cuidando de mim, passando energias, me acalutando, me ninando e me curando.

Uma vez me “corrigiram” falando que nos agradecimentos de um trabalho acadêmico, deveria constar apenas os nomes das pessoas que contribuíram para a realização do mesmo. Então, acho que aprendi a lição. Cada nome que citei aqui (e ainda outros que não tive espaço para tal), contribuíram de maneira significativa para a realização desde trabalho. Um pensamento positivo, já me levava à frente por léguas. Como posso ser ingrato à vida, depois de tanto crescimento pessoal e profissional, depois de tanta experiência, depois de tantas pessoas que entraram e saíram da minha convivência ao longo desta caminhada, depois de tantas páginas de agradecimentos?

São mais que agradecimentos, é uma homenagem a todas essas pessoas que fizeram e fazem parte da minha história! Obrigado por existirem!

“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! Sou Grato, **Jaciel Oliveira**.

“O que a gente não pode mesmo, nunca, de jeito nenhum é amar mais ou menos, sonhar mais ou menos, ser amigo mais ou menos, namorar mais ou menos, ter fé mais ou menos, e acreditar mais ou menos. Senão a gente corre o risco de se tornar uma pessoa mais ou menos”
Chico Xavier (1910-2002) – Médiun, filantropo e um importante expoente do Espiritismo.

“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar”
Anatole France (1844-1924) – Escritor francês.

“Tudo aquilo que o homem ignora não existe para ele. Por isso o Universo de cada um se resume ao tamanho do seu saber”
Albert Einstein (1879-1955) - Físico teórico alemão.

“A persistência é o menor caminho para o êxito”
Charles Chaplin (1889-1977) – Ator, diretor, produtor, humorista, empresário, escritor, comediante, dançarino, roteirista e músico britânico.

“Cuidemos do nosso coração, porque é de lá que sai o que é bom e ruim, o que constrói e destrói”
Papa Francisco – 266º Papa da Igreja Católica e atual Chefe de Estado do Vaticano.

“E lembra-te: Tudo o que chega, chega sempre por alguma razão”
Fernando Pessoa (1888-1935) – Poeta, escritor, publicitário, astrólogo, crítico literário, inventor, empresário, tradutor, filósofo e comentarista político português.

“Somente quem passa pelo gelo da dor chega à inocência do amor”
“‘Não há rosas sem espinhos’, é um provérbio melancólico. Digamos em vez disso: ‘Não há espinhos sem rosas’”

“Nada do que é feito por amor é pequeno”
Chiara Lubich (1920-2008) – Fundadora do Movimento dos Focolares.

FONTES FINANCIADORAS

Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia (FACEPE), através da concessão da bolsa de doutorado. Número do processo IBPG-1191-5 05/13.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por intermédio do Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP) concedido ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal (PPGBA), sediado no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESQ) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pelo incentivo financeiro através do Edital de Apoio a Grupos de Pesquisa (2014) e do Edital de Auxílio Jovem Pesquisador (n.º 01/2015).

Recursos próprios.

RESUMO

A injeção intraglandular de toxina botulínica tipo A (BTX-A) nas glândulas submandibulares é considerada clinicamente uma ferramenta terapêutica eficaz para o tratamento da sialorreia. Porém, são poucos os dados na literatura que discutem sua influência sobre o tecido glandular, saliva e microbiota oral, assim como seu metabolismo sistêmico. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi mensurar os eletrólitos da saliva e soro sanguíneo, verificar as proteínas salivares, realizar o diagnóstico micológico da cavidade oral de ratas e seu perfil de sensibilidade *in vitro* a antifúngicos, analisar a bioquímica sérica, proceder com o estudo histopatológico dos fígados e rins, além de observar a presença de apoptose através da técnica de TUNEL e as características histológicas do parênquima dos complexos submandibulares-sublinguais de ratas tratadas com injeção intraglandular BTX-A. Foram utilizadas ratas Wistas, divididas em cinco grupos: grupo controle (n = 7), sem quaisquer tratamentos; grupos BTX-A 12 dias (n = 7) e 35 dias (n = 6), cujas glândulas submandibulares dos complexos submandibulares-sublinguais direitos receberam injeção de 2,5 U BTX-A (Prosigne®), com amostras analisadas 12 e 35 dias após a aplicação; grupo GEL 12 dias e GEL 35 dias (n = 6 animais cada), cujas glândulas salivares direitas receberam injeção de 0,125 mg gelatina de origem bovina, e com parâmetros analisados 12 e 35 dias após o tratamento, respectivamente. Os dados coletados foram submetidos a análise estatística. A BTX-A promoveu uma atrofia dos ácinos serosos com vacuolizações citoplasmáticas. O aparecimento de apoptose foi mais evidente nos grupos tratados com BTX-A e analisados com 12 dias. Os linfonodos dos grupos tratados com BTX-A apresentaram reatividade. Observou-se poucas alterações nas proteínas e íons salivares. Os fungos dos gêneros *Candida spp.* e *Aspergillus spp.*, se comportaram como oportunistas nos grupos tratados com BTX-A, além de serem resistentes aos agentes antifúngicos testados. Verificou-se alterações histopatológicas nos rins, porém sem alterações hepáticas.

Palavras-Chave: glândula submandibular; toxina botulínica tipo A; sialorreia; microbiota; saliva; apoptose; eletrólitos; proteínas salivares; biópsia de linfonodo sentinela; infecções fúngicas; toxicologia

ABSTRACT

Intraglandular injection of botulinum toxin type A (BTX-A) into the submandibular glands is clinically considered an effective therapeutic tool for the treatment of sialorrhoea. However, there are few data in the literature that discuss its influence on the glandular tissue, oral saliva and microbiota, as well as its systemic metabolism. Thus, the objective of the present study was to measure salivary and serum electrolytes, to verify the salivary proteins, to perform the mycological diagnosis of the oral cavity of rats and their profile of sensitivity *in vitro* to antifungals, to analyze the serum biochemistry, to proceed with the histopathological study of the livers and kidneys, in addition to observing the presence of apoptosis through the TUNEL technique and the histological characteristics of the submandibular-sublingual complex parenchyma of rats treated with BTX-A intraglandular injection. Wistar rats were divided into five groups: control group (n = 7), without any treatments; BTX-A groups 12 days (n = 7) and 35 days (n = 6), whose submandibular glands of the right submandibular-sublingual complexes received 2.5 U BTX-A (Prosigne®), with samples analyzed 12 and 35 days after application; and GEL groups 12 and 35 days (n = 6 animals each), whose right salivary glands received injection of 0.125 mg gelatin of bovine origin, with parameters analyzed 12 and 35 days after treatment, respectively. The data collected were submitted to statistical analysis. BTX-A promoted atrophy of serous acyces with cytoplasmic vacuolations. The appearance of apoptosis was most evident in the BTX-A treated groups and analyzed at 12 days. The lymph nodes of the BTX-A treated groups showed reactivity. There were few changes in salivary proteins and ions. Fungi of the genres *Candida spp.* and *Aspergillus spp.*, Behaved as opportunists in the groups treated with BTX-A, besides being resistant to the antifungal agents tested. Histopathological alterations in the kidneys were verified, but without hepatic alterations.

Keywords: submandibular gland; botulinum toxin, type A; sialorrhoea; microbiota; saliva; apoptosis; electrolytes; salivary proteins; sentinel lymph node biopsy; mycoses; toxicology

SUMÁRIO

Fontes Financiadoras	I
Resumo	II
Abstract	III
Sumário	IV
Lista de Figuras	VIII
Lista de Tabelas	XI
Lista de Abreviaturas	XII
1. Introdução	31
2. Revisão da Literatura	33
2.1. Histologia da Glândula Submandibular de Ratos e de Humanos	33
2.2. Localização e Anatomia da Glândula Submandibular de Ratos	42
2.3. Fisiologia da Secreção Salivar	43
2.3.1. Regulação pelo Sistema Nervoso Parassimpático	47
2.3.2. Regulação pelo Sistema Nervoso Simpático	49
2.3.3. Alteração da Saliva Primária em Saliva Secundária	50
2.4. Saliva	53
2.4.1. Composição da Saliva	55
2.5. Microbiota Fúngica da Cavidade Oral	57
2.6. Hipersalivação ou Sialorreia	60

2.6.1. Etiologia da Sialorreia	61
2.6.2. Consequências da Sialorreia	64
2.7. Tratamentos para a Sialorreia	65
2.8. Toxina Botulínica	69
2.8.1. Estrutura Química da Toxina Botulínica Tipo A	75
2.8.2. Mecanismo de Ação da Toxina Botulínica Tipo A	78
2.8.3. Tempo de Ação da Toxina Botulínica Tipo A	82
2.8.4. Estabilizantes da Toxina Botulínica Tipo A	83
2.8.5. Metabolização e Excreção da Toxina Botulínica Tipo A	84
2.9. Tratamento da Sialorreia com Toxina Botulínica	85
2.10. Efeitos Adversos do Tratamento da Sialorreia com Toxina Botulínica ...	90
3. Justificativa	94
4. Objetivos	95
5. Hipóteses	96
6. Material e Métodos	97
6.1. Considerações Éticas	97
6.2. Tipo, Caracterização e Localização do Estudo	97
6.3. Obtenção e Cuidados com os Animais	98
6.4. Definições dos Grupos de Estudo	98
6.5. Tratamento dos Animais	99
6.6. Obtenção dos Isolados Fúngicos da Cavidade Oral dos Animais	100

6.7. Colheita de Saliva Total dos Animais	101
6.8. Colheita e Fixação do Complexo Submandibular-Sublingual e Linfonodos	102
6.9. Colheita de Sangue, Fígado e dos Rins	102
6.10. Confeção das Preparações Histológicas	103
6.11. Estudo Histológico do Complexo Submandibular-Sublingual	103
6.12. Técnica de TUNEL por Fluorescência	104
6.13. Análise Bioquímica da Saliva	105
6.13.1. Atividade Proteolítica Total	105
6.13.2. Dosagem de Proteínas	105
6.13.3. Detecção de α -Amilase	106
6.13.4. Ionograma da Saliva	106
6.14. Análise Fúngica	107
6.14.1. Realização do Diagnóstico Micológico	107
6.14.2. Identificação dos Isolados	107
6.14.3. Perfil de Sensibilidade <i>in vitro</i> a Antifúngicos	108
6.15. Análise Bioquímica Sérica	109
6.16. Ionograma do Soro Sanguíneo	110
6.17. Análises Histopatológicas do Fígado e dos Rins	111
6.18. Análise Estatística	111
Referências	112

Apêndices I, II, III e IV	138
Apêndice I – Artigo 1: Aplicação Local de Toxina Botulínica Tipo A no Complexo Submandibular-Sublingual de Ratas: Avaliações Apoptóticas e Histológicas das Glândulas Salivares e Linfonodos Associados	139
Apêndice II – Artigo 2: Aplicação Local de Toxina Botulínica Tipo A no Complexo Submandibular-Sublingual de Ratas: Análise da Microbiota Fúngica Oral	163
Apêndice III – Artigo 3: Aplicação Local de Toxina Botulínica Tipo A no Complexo Submandibular-Sublingual de Ratas: Análise Bioquímica da Saliva Total	183
Apêndice IV – Artigo 4: Aplicação Local de Toxina Botulínica Tipo A no Complexo Submandibular-Sublingual de Ratas: Análises Sorológica e Histopatológicas Hepáticas e Renais	203
Anexo I – Primeiro Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	227
Anexo II – Segundo Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) ..	228

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1:

- Figura 1:** Fotomicrografias do complexo submandibular-sublingual de ratas do grupo Controle. Em A e C, glândula submandibular. Em B, observa-se porções de glândula sublingual e submandibular. Em D, glândula sublingual. Coloração: Hematoxilina e Eosina 145
- Figura 2:** Fotomicrografias de parte do complexo submandibular-sublingual de ratas dos grupos BTX-A 12 (A, B, C e D) e 35 dias (E e F). Em A, visão geral da glândula submandibular. Em B e C, maior aumento da glândula submandibular. Em D, glândula sublingual. Em E, glândula submandibular após 35 dias. Em F, glândula sublingual do grupo BTX-A 35. Coloração: Hematoxilina e Eosina 146
- Figura 3:** Fotomicrografias de parte do complexo submandibular-sublingual de ratas dos grupos GEL 12 (A, B, C e D) e 35 dias (E e F). Em A, visão geral da glândula submandibular. Em B e C, maior aumento da glândula submandibular. Em D, glândula sublingual do grupo GEL 12 dias. Em E, glândula submandibular do grupo GEL 35 dias. E em F, glândula sublingual do grupo GEL 35 dias. Coloração: Hematoxilina e Eosina 147
- Figura 4:** Fotomicrografias de fluorescência de glândulas submandibulares de ratas. Em A, grupo controle. Em B, grupo BTX-A 12 dias. Em C, grupo BTX-A 35 dias. Em D, grupo GEL 12 dias. Em E, grupo GEL 35 dias. Observar que os núcleos em apoptose emitem uma cor vermelha púrpura (cabeças de setas brancas) e os núcleos com seu DNA hígado emitem uma coloração azul. Técnica de TUNEL (Apoptose). Magnificação: $\pm 200x$ 148
- Figura 5:** Fotomicrografias de fluorescência de glândulas sublinguais de ratas. Em A, grupo controle. Em B, grupo BTX-A 12 dias. Em C, grupo GEL 12 dias. Observar que os núcleos em apoptose emitem uma cor vermelha púrpura (cabeças de setas brancas) e os núcleos com seu DNA hígado emitem uma coloração azul. Técnica de TUNEL (Apoptose). Magnificação: $\pm 200x$ 149

Figura 6: Fotografias de linfonodos submandibulares de ratas do grupo controle (A) e grupo BTX-A (B), no momento do ato cirúrgico de exérese do complexo submandibular-sublingual direito. Observe em A e em B os linfonodos submandibulares (setas pretas) e as glândulas submandibulares direitas (asteriscos pretos) 149

Figura 7: Fotomicrografias de linfonodos submandibulares de ratas. Em A, grupo controle. Em B, grupo BTX-A 12 dias. Em C e D, grupo BTX-A 35 dias. Em E, grupo GEL 12 dias. Em F, grupo GEL 35 dias. Coloração: Hematoxilina e Eosina 149

Artigo 2:

Figura 1: Gráfico de barras mostrando as diferentes concentrações das drogas utilizadas para o teste de sensibilidade (anfotericina B em azul; cetoconazol em laranja; e ciclopirox olamina em cinza) por isolados, segundo os grupos BTX-A 12 e 35 dias. Observar que os isolados obtidos 35 dias após a aplicação da BTX-A foram mais sensíveis quando comparados com os isolados coletados 12 dias após a aplicação da droga 182

Artigo 4:

Figura 1: Fotomicrografias de fragmentos hepáticos de ratas dos diversos grupos de estudo. Em A, B e C, grupo controle. Em D, grupo BTX-A 12 dias. Em E, grupo BTX-A 35 dias. Em F, grupo GEL 35 dias. Coloração: Hematoxilina e Eosina 213

Figura 2: Fotomicrografias de fragmentos renais de ratas do grupo Controle. Em A, a região cortical (C), o começo da pirâmide renal na região medular (M). Em B, região aplicada do córtex renal. Em C e D, aumento da região medular. Coloração: Hematoxilina e Eosina 214

Figura 3: Fotomicrografias de fragmentos renais de ratas dos grupos tratados com BTX-A. Em A, região cortical de BTX-A 12 dias. Em B, região

medular de BTX-A 12 dias. Em C, D, E e F, parênquima renal do grupo BTX- 215
A 35 dias. Coloração: Hematoxilina e Eosina

Figura 4: Fotomicrografias de fragmentos renais de ratas dos grupos GEL.
Em A, região cortical de GEL 12 dias. Em B, região medular de GEL 12 dias.
Em C, região cortical íntegra do grupo GEL 35 dias. E em D, região cortical
sob injúria do grupo GEL 35 dias. Coloração: Hematoxilina e Eosina 216

LISTA DE TABELAS

Artigo 2:

Tabela 1: Perfil de resistência dos isolados <i>Candida spp.</i> e <i>Aspergillus spp.</i> provenientes da cavidade oral de ratos com glândula submandibular tratada com BTX-A à Concentração Inibitória Mínima (MIC) por Anfotericina B (AMB), Cetoconazol (KTC) e Ciclopirox Olamina (CPOA)	181
--	-----

Artigo 3:

Tabela 1: Diferença entre as Médias dos Diversos Grupos de Estudo da Atividade Proteolítica (U/mg), Detecção de α -Amilase Salivar (mmol/min) e Dosagem Proteica da Saliva Total (mg/mL)	192
Tabela 2: Grupos com diferenças significativas na Detecção de α -Amilase (mmol/min)	192
Tabela 3: Médias, Desvios Padrões e Análise Estatística dos Parâmetros avaliados no Ionograma da Saliva Total nos Grupos de Estudo	193

Artigo 4:

Tabela 1: Médias, Desvios Padrões e Análise Estatística dos Parâmetros Avaliados para Verificação das Funções Hepáticas e Renais	210
Tabela 2: Médias, Desvios Padrões e Análise Estatística dos Parâmetros avaliados no Ionograma do Soro Sanguíneo nos Grupos de Estudo (Ca^{2+} , PO_4^- , Cl^- , K^+ , Na^+)	211

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: Graus Celsius

±: Mais ou menos

µL: Microlitros

µm: Micrômetros

µg: Micrograma

µmol: Micromol

AB: Alcian Blue

ACh: Acetilcolina

AChE: Enzima acetilcolinesterase

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ALT ou SGPT ou TGP ou GPT: Alanina aminotransferase ou transaminase glutâmico pirúvica ou alanina transaminase ou transaminase glutâmico-pirúvica

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AMPc / AMP-cíclico: 3',5'-adenosina monofosfato cíclico (monofosfato cíclico de adenosina)

ANOVA: Teste Análise de Variância

AQP: Aquaporina / AQP5: Aquaporina 5

AST ou SGOT ou TGO ou GOT: Aspartato aminotransferase ou transaminase glutâmico-oxaloacética ou aspartato aminotransferase ou aspartato transaminase

ATM: Articulação temporomandibular

ATP: Adenosina trifosfato

AVE: Acidente vascular encefálico

Bax: Família de genes e proteínas pró-apoptóticas

Bcl-2: Família de genes e proteínas antiapoptóticas

BDA: Batata dextrose ágar

BoNT / BTX / TxB: Toxina botulínica

BTX-A: Toxina botulínica tipo A

Ca²⁺: Íon cálcio

Ca²⁺/CaM: Cálcio-calmodulina

CaCl₂: Cloreto de cálcio

CB: Centro de Biociências da UFPE

cc: Centímetros cúbicos
CCL2 (MCP-1): *Quimiocina C-C-L Motif Chemokine Ligand 2*
CCS: Centro de Ciências da Saúde da UFPE
CENAPESQ: Centro de Apoio à Pesquisa da UFRPE
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPE
cGMP: Monofosfato cíclico de guanosina
CHC e HCN: Subdomínios do domínio de ligação do receptor da cadeia pesada da toxina botulínica
CIgAs: Conjunto do dímero de IgA e do componente secretor
Cl⁻: Íon cloreto
CIOMS: *Council for International Organizations for Medical Science*
CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*
COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CXCL10 (IP-10): *Quimiocina C-X-C Motif Chemokine Ligand 10*
DAG: Diacilglicerol
DAB: Diaminobenzidina
DAPI: 4'-6-diamino-2-fenilindole
DL₅₀: Dose letal 50%
DMFA: Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE
DMV: Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE
DNA: Ácido desoxirribonucléico
DNM: Doença do neurônio motor
DNS: Ácido dinitrosalicílico
DP ou PD: Doença de Parkinson
dUTP: *2'-Deoxyuridine-5'-Triphosphate*
EGF: Fator de crescimento epidérmico
ELA: Esclerose lateral amiotrófica ou Doença do neurônio motor
EMG: Eletromiografia
F⁻: Íon fluoreto
FA ou FAL ou FALC ou ALP: Fosfatase alcalina
FC: Fibrose cística
FDA: *Food and Drug Administration*
FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz
FR: Formação reticular

g: Grama

GDP: Guanosina difosfato

GGT ou Gama-GT ou GGTP: Gama-glutamil transferase ou gama glutamiltransferase, glutamiltransferase-gama ou glutamiltransferase gama ou gamaglutamiltransferase, glutamil transpeptidas

GH: Hormônio do crescimento

Gs: Proteína G estimuladora

GSH: Glutationa

GTP: Guanosina trifosfato

h: Hora

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HCN e CHC: Subdomínios do domínio de ligação do receptor da cadeia pesada da toxina botulínica

HC_{TX} ou H ou HC: Cadeia pesada da toxina botulínica

HCO₃⁻: Íon bicarbonato

HCR ou Hc: Domínio de ligação do receptor da cadeia pesada da toxina botulínica

HE: Coloração por hematoxilina e eosina

HNT ou Hn: Domínio de translocação da toxina botulínica

HOVET: Hospital Veterinário Escola

HPO₄²⁻: Íon fosfato

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICLAS: *International Council for Laboratory Animal Science*

IgA (IgAs): Imunoglobulina A / Anticorpo

IgG: Imunoglobulina G / Anticorpo

IgM: Imunoglobulina M / Anticorpo

IP₃: Inositol trifosfato

ISE: Sensores de íons seletivos

JNG: Junções neuroglandular

JNM: Junção neuromusculares

K⁺: Íon potássio

KCl: Cloreto de potássio

kDa: Kilodalton (Quilodalton)

kg: Quilograma

L: Litro

LAMP-2: *Lysosome-associated membrane protein 2* (Proteína 2 de membrana associada ao lisossomo)

LC3B-II: *LC3-phosphatidylethanolamine conjugate* (Conjugado LC3-fosfatidiletanolamina)

LC_{TX} ou L ou LC: Cadeia leve da toxina botulínica

LIBP: *Lanzhou Institute of Biological Products*

M: Molar

M3 ou M3R: Receptor muscarínico M3

Mg²⁺: Íon magnésio

mg: Miligramas

MIC (CIM): Concentração Inibitória Mínima

min: Minutos

mL: Mililitros

mm: Milímetros

mM (mmol): Milimolar (Mili moles ou milimol)

MND: Doença do neurônio motor

MOPS: Ácido 3-morfolinopropanosulfônico

Na⁺: Íon sódio

Na⁺-K⁺-ATPase: Bomba sódio e potássio

NA: Noradrenalina / Norepinefrina

NaCl: Cloreto de sódio

NCE: Núcleo de Cirurgia Experimental da UFPE

NIH: *National Institute of Health*

NGF: Fator de crescimento nervoso

ng: Nanograma

nm: Nanômetro

NO: Óxido nítrico

NTS: Núcleo do trato solitário

NSF: Proteína de fusão (fator) sensível à N-etilmalamida

OsO₄: Tetróxido de ósmio

OSCN⁻: Hipocianeto

PANs: Proteínas de Associação à Neurotoxina

P.A.S.: Ácido periódico de Schiff

PBS: Solução salina tampão fosfato

PC ou LC: Paralisia cerebral ou Lesão cerebral
PG2 α : Prostaglandina 2 α
PG: Peso da glândula
PGE: Prostaglandina E (PGE1: Prostaglandina E1 / PGE2: Prostaglandina E2)
pH: Potencial hidrogênio
pIgR: Receptor polimérico de imunoglobulina
PIP₂: Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PKC: Proteína quinase C
PO₄⁻: Íon fosfato
PPGBA: Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal
PPGC: Programa de Pós-Graduação em Cirurgia
ppm: Partes por milhões
PTH: Paratormônio
RDNMP: Retardo do desenvolvimento neuropsicomotor ou neuropsicomuscular
REG / RER: Retículo endoplasmático granular ou rugoso
REL / REA: Retículo endoplasmático liso ou agranular
RNA: Ácido ribonucleico
RNAm: Ácido ribonucleico mensageiro
rpm: Rotação por minuto
SCN⁻: Íon tiocianato, sulfocianato, tiocianeto, sulfocianeto ou rodaneto
SD ou DP: Desvio padrão
SIDA: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SNA: Sistema Nervoso Autônomo
SNC: Sistema Nervoso Central
SNAP-25: Proteína associada a sinaptossomas de 25 kDa
SNARE: *Soluble NSF attachment receptor* (t-SNARE: proteína SNARE da membrana alvo; e v-SNARE: proteína SNARE de vesícula)
SPSS: *Statistical Package for Social Science*
SSC: Complexo submandibular-sublingual
ST: Sinaptotagmina
SV2: Receptores proteicos para toxina botulínica tipo A
TCA: Ácido tricloroacético
TdT: *Terminal deoxynucleotidyl transferase*
TENS: Estimulação elétrica transcutânea

TGI: Trato gastrointestinal

TNF: Fator de necrose tumoral (TNF α : Fator de necrose tumoral alfa)

TOSN: Neurectomia submandibular transoral

TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated (TdT) d-UTP Nick End Labeling*

U ou UI: Unidades internacionais

UFC: Unidades formadoras de colônias

UFPE: Universidade Federal de Pernambuco

UFRPE: Universidade Federal Rural de Pernambuco

USG: Ultrassonografia

VIP: Peptídeo intestinal vasoativo

WHO / OMS: *World Health Organization* / Organização Mundial de Saúde

Zn: Zinco

VAMP: Proteína de membrana transportadora de vesículas

1. INTRODUÇÃO

O termo sialorreia, ou hipersalivação, refere-se a um aumento excessivo na secreção e fluxo salivar ou acúmulo de saliva na cavidade oral com escape salivar, considerado fisiológico e comum em crianças de 15 a 18 ou 24 meses de idade, devendo desaparecer com o desenvolvimento neuromuscular da criança. Todavia, após os 4 anos de idade, é considerado anormal ou patológico (AUGUSTO e PEREZ, 2006; MATO et al., 2010; FAIRHURST e COCKERILL, 2011; KHADIVI et al., 2013).

A sialorreia é um sinal clínico que afeta crianças ou adultos e acompanha várias patologias de acometimento neurológico (motor e/ou mental), como esclerose lateral amiotrófica (ELA) ou doença do neurônio motor (DNM) (YOUNG et al., 2011; ZLOTNIK et al., 2015); doença de Parkinson (PD ou DP); paralisia cerebral (PC) ou lesão cerebral (LC) (KHADIVI et al., 2013); entre outras.

A sialorreia acomete aproximadamente 70% dos pacientes que apresentam retardo do desenvolvimento neuropsicomotor (RDNPM) (COSTA e FERREIRA, 2008). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011; WHO, 2013), mais de 1 bilhão de pessoas vivem com algum tipo de deficiência em todo o mundo, nas quais estão incluídas, por exemplo, DP, ELA e LC. No Brasil, o Censo Demográfico realizado em 2010, revelou que mais de 45 milhões de brasileiros possuem algum tipo de deficiência, sendo que cerca de 13 milhões apresentam algum tipo de deficiência motora e 2,5 milhões com desordens mentais, em graus variados (IBGE, 2010). Em muitas destas desordens, a sialorreia pode estar presente como sinal clínico.

O excesso de saliva pode levar a problemas funcionais, sociais e psicológicos (SILLANPÄÄ et al., 2015). Pode-se encontrar queilite, úlceras perioral com infecções secundárias, sujidade de roupas, com o isolamento social (KHADIVI et al., 2013; HEFFERNAN e ADIL, 2015). Problemas de nutrição, sono e fonação podem estar presentes, assim como asfixia e estertores (SIMONE, EISENCHLAS, JUNIN, 2006), riscos de infecções pulmonares, inclusive pneumonia aspirativa (ZELLER et al., 2012), aumentando a morbidade e mortalidade (REDDIHOUGH e GRAHAM, 2011), gerando um grande impacto e diminuindo na qualidade de vida dos pacientes.

Existem várias formas de tratamento para a sialorreia com o objetivo de reduzir os problemas causados pelo excesso de fluxo salivar (MATO et al., 2010). Porém, a

maior parte dos tratamentos são muito invasivos ou trazem efeitos colaterais graves, ou ainda podem não ser eficiente para casos moderados e severos. Desta forma, a toxina botulínica (BTX), começou a ser experimentada na sialorreia, com bons resultados, sendo uma técnica de tratamento local, pouco invasivo e reversível, capaz de deprimir a atividade secretora das glândulas salivares (paralisia neurosecretora), diminuindo o fluxo salivar e melhorando os sinais clínicos da hipersalivação.

Ensaio clínico randomizado placebo-controlado em pacientes mostraram que a aplicação intraglandular de BTX é uma terapia clínica segura e eficaz e que melhora a sialorreia e qualidade de vida dos pacientes (GOMES-CARAVACA et al., 2015; MALCHER et al., 2015; ALVARENGA et al., 2016), independente do acometimento neurológico do paciente (MAHADEVAN et al., 2016), porém os dados a longo prazo ainda são limitados (VASHISHTA et al., 2013). Determinar um papel mais preciso entre as diferentes formulações de BTX é extremamente importante, pois existem pontos fracos na literatura, fazendo com que haja a necessidade de novos estudos para determinar o uso da BTX na sialorreia, assim como possíveis efeitos colaterais.

Ainda não há consenso final na comunidade científica sobre a eficácia, segurança e utilidade da BTX-A em diversas patologias (CORTÉS-MONROY e SOZA, 2014). 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 eficiência do estabilizante da toxina (gelatina de origem bovina). Diante disso, faz-se necessário estudos experimentais que supram a carência de evidências sobre avaliação estrutural do tecido glandular sob ação da BTX-A, bem como maior detalhamento da composição da saliva secretada após a intervenção com a droga, da microbiota fúngica oral do paciente e mecanismos de excreção da droga, proporcionando subsídios para o entendimento dos profissionais que podem utilizá-la na aplicação clínica como recurso no tratamento da sialorreia, contribuindo diretamente para a confiabilidade em prescrever seu uso para os pacientes com hipersalivação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Histologia da Glândula Submandibular de Ratos e de Humanos

As glândulas salivares são um conjunto de glândulas exócrinas e merócrinas, cujo produto de secreção fluem para a cavidade oral (FERRARIS e MUÑOS, 2006). Já se especulou funções endócrinas, a expressão e secreção de vários de fatores de crescimento celular da glândula parótida (AMANO et al., 2012).

A arquitetura das glândulas salivares nos mamíferos é constituída por dois elementos principais: o tecido glandular secretor (parênquima glandular ou porção “funcional”) e o tecido conjuntivo de suporte (estroma glandular). O complexo parênquima é formado por um grupo de células de formato piramidal, as células secretoras, que juntam formam uma estrutura de formato esférico ou tubular, de fundo cego, denominados de adenômeros (unidades secretoras terminais) ou simplesmente ácinos. Os ácinos são formados por células serosas ou mucosas, ou ainda, por uma combinação de ambos os tipos, desta forma, um ácino pode ser seroso, mucoso ou misto, e vertem seus produtos de secreção para um sistema de ductos excretores. O conjunto de ductos excretora é formado por um sistema sequencial de ductos que começam em bolsas de fundos cegos (os ácinos), vão unindo-se progressivamente (ductos excêntricos) até originar um ducto de maior calibre, que ao final deixa a glândula salivar para se abrir na cavidade oral, a semelhança de um cacho de uvas (MELVIN et al., 2005; AMANO et al., 2012).

Os ramos terminais do sistema ductal (ductos intercalares), se ramificam para, geralmente, encontrar de três a cinco ácinos, reunidos como lóbulos truncados a partir de um hilo ductal comum. Cada ácino se comunica com um ducto intercalar primário, que ao se unir com os ductos intercalares primários, formam o ducto intercalar secundário (ou proximais) (BROCCO e TAMARIN, 1979). O estroma sustenta e dá passagem as redes vasculares e neuronais, que juntos atuam para produzir e secretar a saliva (LOMBAERT et al., 2017).

Com base nisso, estruturalmente as glândulas salivares são classificadas como tubuloacinares compostas, sendo que as glândulas submandibulares são ditas como

tubuloacinares seromucosas, por causa do tipo de ácino e a secreção produzida. Os ácinos podem conter entre 15 e 100 células, circundada por uma lâmina basal esponjosa (que é contínua com a lâmina basal do sistema ductal). Os espaços interparenquimatosos (interacinares) são preenchidos por tecido conjuntivo frouxo (estroma de tecido conjuntivo intersticial), com poucas fibras colágenas, fibras reticulares e muitos capilares sanguíneos, envolvendo os ácinos e ductos (intralobulares). Já o estroma que envolve grupos de ácinos formando lóbulos glandulares, e a glândula como um todo, formando uma cápsula conjuntiva, possui fibras colágenas de vários diâmetros (WATANABE et al., 2007; KONTTINEN et al., 2010).

A unidade histofisiológica mínima do parênquima glandular denomina-se sialona, que compreende uma peça secretora (adenômeros ou ácino) e as porções ductais que modificam a saliva destes adenômeros (FERRARIS e MUÑOS, 2006).

As glândulas submandibulares com características de maturidade se apresentam constituídas por ácinos volumosos e condensados. Em humanos, estas glândulas são mistas por possuir três tipos de unidades secretoras (semorosos, mucosos e mistos). Os ácinos diferenciam-se entre si pelo tipo de saliva produzida, pela estrutura que apresentam e pelos seus grânulos secretores (FERRARIS e MUÑOS, 2006; AMANO et al., 2012). Em roedores glândula submandibular possui apenas ácinos serosos; já as glândulas sublinguais e parótidas são formadas por ácinos mucosos e serosos, respectivamente (PINKSTAFF, 1980; AMANO et al., 2012).

Os ácinos serosos costumam ser mais esféricos, mas evidenciam grande diversidade de tamanhos e são predominantes em relação aos ácinos mucosos, de formato mais tubular (KATCHBURIAN e ARANÃ-CHAVES, 2012). Já nos ácinos mistos, as células serosas se organizam a semelhança de um capuz ou uma meia lua externa às células mucosas, conhecida como meia lua serosa ou semilua serosa ou crescente de Gianuzzi (FERRARIS e MUÑOS, 2006; DELPORTE, BRYLA, PERRET, 2016). Na verdade, as semiluas serosas são formadas por conta do método de fixação química do tecido, pois, na realidade, as células serosas estão localizadas entre as células mucosas (YAMASHINA, TAMAKI, KATSUMATA, 1999). Em ratos, as semiluas são observadas nas glândulas sublinguais (AMANO et al., 2012).

Em tecidos corados pela hematoxilina e eosina (HE), os ácinos serosos são constituídos por células de formato piramidal, com ápice estreito circundando um estreito lúmen central, e estão repousadas em uma delgada lâmina basal. Possuem

citoplasma espumoso (aparência granular) com grânulos mais acidófilos na região apical, pois aí se encontram numerosos grânulos de zimogênio refratários (ou cimógeno com cerca de 1 µm de diâmetro, grânulos secretórios eletrodensos). No terço basal, bastante basófilo devido a abundância de retículo endoplasmático rugoso (REG, RER ou ergastoplasma), encontram-se seus núcleos volumosos e esferoides, com cromatina frouxa e nucléolos evidentes na maioria das vezes. Ocasionalmente pode-se observar algumas células binucleadas. Ultraestruturalmente, o complexo de Golgi supra-nuclear é bastante desenvolvido, do qual brotam grânulos pequenos e imaturos, que posteriormente, à medida que se deslocam em direção apical, se tornam grânulos secretores maduros. Posuem quantidade moderada de mitocôndrias, alguns lisossomos, tonofilamentos e microtúbulos (LEESON, 1956; LEESON e JACOBY, 1957; TAMARIN e SREEBNY, 1965; COPE e WILLIAMS, 1974; BARBOSA e TAGA, 1997; MOHAMED, ELNEGRIS, WAHDAN, 2015).

Numerosos canalículos estreitos que se abrem na luz dos ácinos, podem ser visualizados entre as células. Estas células projetam para a luz dos canalículos e dos ácinos, poucas e baixas microvilosidades. Próximo ao ápice das células acinares, como meio de união, existem complexos juncionais formados por junções firmes ou estreitas (*tight-junctions*), zonas de adesão (*zonulas adherens*), junções de oclusão (*zonula occludens*) e desmossomos (*maculae adherens*). Além disso, possuem *gap-junctions* para intercomunicação. A localização destes complexos juncionais dependem da presença ou ausência dos canalículos intercelulares, que mantêm as células unidas e previne o escoamento do conteúdo da luz para os espaços intercelulares. Dessa forma há clara a presença de uma polarização bem definida nas células acinares, com um domínio apical, relacionado à secreção dos componentes salivares e intercâmbio iônico; e um domínio basolateral, no qual ocorrem diferentes intercâmbios entre a célula e o estroma conjuntivo (TAMARIN e SREEBNY, 1965; FERRARIS e MUÑOS, 2006; SANIOTO et al., 2013).

Os grânulos secretores das células serosas podem conter amilase, peroxidase, lactoperoxidases, ribonucleases, desoxirribonucleases, lisozimas, lipases, fator de crescimento nervoso, fator de crescimento epidérmico, mucinas e outros produtos. O ritmo de secreção é descontínuo e por conta disso, as células serosas podem se apresentar de acordo com o estado funcional em que se encontram (FERRARIS e

MUÑOS, 2006). As células serosas costumam ser mais sensíveis à estímulos externos, do que as células mucosas (BRALIC et al., 2005). Normalmente, os grânulos de secreção serosos possuem grande diâmetro, embora com forma irregular. Mas em glândula submandibular de ratos, os grânulos de secreção serosa apresentaram diferentes tamanhos e formas (D'AVOLA et al., 2006).

As células dos ácinos mucosos, por sua vez, em cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina (HE), também possuem formato piramidal, como polos apicais e basais, sendo volumosas, e formando túbulos mucosos volumeosos e alongados, mas que convencionou-se chamar de ácinos mucosos, e com possuem citoplasma claro (pálido) devido à falta de afinidade dos corantes com a substância mucinógena (mistura de diversas mucossubstâncias ricas em glicoproteínas denominadas mucinas, conjugadas à carboidratos complexos) sintetizadas e armazenadas em seus citoplasmas, para posterior secreção. Seus núcleos também se localizam próximo à base da célula e possuem cromatina densamente distribuída, e tendem a ser mais achatados devido a compressão contra a membrana basal imposta pelos grânulos do citoplasma (FERRARIS e MUÑOS, 2006).

Ultraestruturalmente, na microscopia eletrônica de transmissão (MET), as células mucosas apresentam um aparelho de Golgi bastante evidente, além de numerosos grânulos secretores esféricos e isolados com aparência pálida. O pouco REG está confinado a uma estreita faixa próximo à base da célula, juntamente com as algumas mitocôndrias. Os núcleos celulares apresentam-se redondos e centralmente localizados, contradizendo o que se observa na microscopia óptica convencional. Tal fato se explica pelo tipo de fixação, pois nos fixadores convencionais para microscopia óptica, os grânulos mucosos sofrem alterações que acabam achatando os núcleos e deslocando-os para posição basal. Os canalículos intercelulares são menos desenvolvidos (FERRARIS e MUÑOS, 2006).

Associados em alguns ácinos mucosos, pode-se distinguir pequenos grupos de células serosas (com citoplasma bem corado eosinofílicamente) formando a semilua serosa, geralmente localizadas nas porções mais distais dos ácinos mucosos, organizada como um capuz ou casquete, compondo um ácino misto. Para alguns autores, a secreção destas semiluas serosas chegariam até o lúmen dos ácinos através de canalículos intercelulares. Mas outros autores descreverem que estas células serosas alinham-se no mesmo nível das células mucosas, compartilhando um lúmen comum,

e, dessa forma, não deixando nenhuma estrutura semilunar (YAMASHINA, TAMAKI, KATSUMATA, 1999; FERRARIS e MUÑOS, 2006; AMANO et al., 2012).

A luz de cada ácino é contínua com a luz do sistema ductal. Em humanos existem três segmentos distintos de ductos excretores, com níveis de organização histológica característicos para cada uma destas partes. O primeiro segmento, que tem comunicação direta com a luz dos ácinos, são os ductos intercalares (ou peças intercalares de Boll), seguindo pelos ductos estriados e pelos últimos ductos, que são os ductos excretores, os quais iniciam seus trajetos ainda no interior dos lóbulos das glândulas salivares (ductos excretores intralobulares), atingem os septos de tecido conjuntivo (ductos excretores interlobulares) e se dirigem em direção à cavidade oral, ondem se fundem ao epitélio oral estratificado pavimentoso, os quais funcionam como ductos coletores apenas de passagem, relativamente inertes (MELFI e ALLEY, 2010; AMANO et al., 2012; SANIOTO et al., 2013). As células dos ductos podem ser distinguidas pelo seu citoplasma claro e núcleos redondos ou ovais de cromatina perinuclear menos conspícuas (YOHRO, 1970). Já em roedores, o sistema ductal é composto pelos ductos denominados na sequência que se segue a partir do ácino de ductos intercalares, ductos granulosos, ductos estriados, ductos excretores (intralobular e interlobular) e o ducto excretor principal (AMANO et al., 2012).

Vários ácinos estão ligados a uma ramificação de ductos intercalares, com paredes formadas por uma única camada de células epiteliais, geralmente cúbicas, com núcleos proeminentes centralmente localizados devido à escassez de citoplasma e de difícil visualização em glândulas adultas. O ducto intercalar é o menor em secção transversal e o mais próximo dos ácinos, se originando a partir de cada ácino, podendo ser ramificados. Nas preparações histológicas ele é visto comprimido entre as secções dos ácinos (JACOBY e LEESON, 1959; BARBOSA e TAGA, 1997).

Ultraestruturalmente observa-se na célula do ducto intercalar membranas apical e basal lisas, unidas principalmente por desmossomos. Seu citoplasma apresenta pouco desenvolvimento das organelas, como algumas cisternas de REG localizados na região basal, complexo de Golgi supra-nuclear e pode apresentar pequenos grânulos que contém proteínas. As células dos ductos intercalares podem agir como células tronco, podendo se diferenciar em células acinares, mioepiteliais ou estriadas. Nas glândulas submandibulares, os ductos intercalares são especialmente curtos (FERRARIS e MUÑOS, 2006).

Os ductos estriados, geralmente longos, mais abundantes, com luz mais ampla, com núcleo posicionado apicalmente, originados pela união de dois ou mais ductos intercalares, forma o segmento mais ativo do sistema ductal. São formados por células colunares, cilíndricas ou cúbicas altas, com membrana apical apresentando pequenas microvilosidades projetadas para a luz do ducto e membrana adluminal ou basal, adjacente à lâmina basal, apresenta múltiplas dobras verticalmente alinhadas (longas estrias) e intercaladas com uma grande quantidade de mitocôndrias filamentosas organizadas paralelamente entre as invaginações das pregas, envolvidas no transporte ativo de íons neste segmento de ductos, com uma grande quantidade de citoplasma marcadamente acidófilo. As pregas basais se interdigitam com as pregas das células vizinhas, formando um labirinto basal que é um aspecto típico dos epitélios que intervêm no transporte ativo. As estriações basais são especialmente mais desenvolvidas nas glândulas submandibulares humanas. Seu citoplasma apresenta REG e complexo de Golgi pouco desenvolvidos, além de alguns túbulos do retículo endoplasmático liso (REL ou REA) de localização apical. Também se observa no terço apical do citoplasma, principalmente na glândula submandibular, pequenos grânulos secretores de densidade moderada, contendo fator de crescimento epidérmico e calicreína, porém em pequena quantidade na espécie humana. Existem, também, lisossomos, peroxissomos, filamentos do citoesqueleto, ribossomos livres e uma quantidade moderada de glicogênio. Estas células também estão unidas por desmossomos e outros complexos de união (TAMARIN e SREEBNY, 1965; FERRARIS e MUÑOS, 2006; AMANO et al., 2012; SANIOTO et al., 2013). Grânulos de coloração clara na região apical destas células que expressam marcadores histoquímicos para endocitose e transcitose da imunoglobulina secretor (IgA) a partir da região basolateral para apical (PROCTOR e CARPENTER, 1998; TANDLER et al., 2001).

Posteriormente, os ductos estriados unem-se uns aos outros para formar os ductos excretores intralobulares, que por sua vez formam os ductos excretores extralobulares ou interlobulares, os quais caminham nos septos conjuntivos que separam os lóbulos glandulares, que aumentam de diâmetro progressivamente. Inicialmente são formados por células colunares; sequencialmente, sua parede começa a adquirir maior quantidade de camadas de células epiteliais poligonais e tornam-se os ductos

excretoras principais que se abrem na cavidade oral, com células cúbicas apresentando núcleo localizado na região central e citoplasma acidófilo (D'AVOLA et al., 2006; FERRARIS e MUÑOS, 2006; SANIOTO et al., 2013).

Estes ductos iniciam-se formados por um epitélio cilíndrico simples de citoplasma eosinófilo, com poucas estriações basais que desaparecem gradualmente. Posteriormente vão confluindo com outros ductos excretoras, vão aumentando de tamanho e o epitélio se converte paulatinamente em pseudoestratificado, onde pode-se encontrar algumas células caliciformes intercaladas. Posteriormente ficam biestratificado e à medida que se aproxima da boca, passa a ser estratificado, formado por epitélio estratificado pavimentoso. São impermeáveis à água, contribuindo para a manutenção hipotônica da saliva. Alguns autores distinguem células claras e escuras nos ductos excretoras, sendo que as células escuras apresentam invaginações ou pregas menos desenvolvidas na membrana basal. As células claras estariam envolvidas na primeira linha de defesa da cavidade oral, tendo a função de produzir e secretar proteínas, tais como CC10 e CC26 (FERRARIS e MUÑOS, 2006).

Em roedores, além destes ductos, nas glândulas submandibulares, à época da maturidade sexual, os ductos estriados sofrem uma modificação no segmento próximo aos ductos intercalares, formando os ductos granulosos (granulares, serosos, convolutos ou contorcidos), bastante sinuosos (JACOBY e LEESON, 1959; TAMARIN e SREEBNY, 1965; BARBOSA e TAGA, 1997).

Estes ductos granulosos possuem um trajeto complexo, são mais compridos e mais volumosos, bem ramificados, com segmentos tortuosos, bifurcados e trifurcados, e tendem a fazer curvas sigmoides severas, quanto que os ductos estriados tendem a seguir um trajeto reto por longas distâncias (BROCCO e TAMARIN, 1979; TAGA, ACHÔA, PARDINI, 1994). São ainda maiores e mais numerosos no sexo masculino, no qual a glândula submandibular é maior em relação a proporção do corpo do animal, quando comparada com a fêmea (BROWN-GRANT e TAYLOR, 1963).

Na preparação histológica, as secções dos ductos granulosos são visualizadas entre os ácinos serosos (BRALIC et al., 2005), com variações de intensidade de coloração, sendo bastante desenvolvidos e predominam sobre os demais (em maior quantidade), com lúmen amplo e regular. São formados por células bem desenvolvidas, fortemente acidófilas, cilíndricas altas com citoplasma vesiculoso, núcleos grandes, elipsoides e com cromatina frouxamente distribuída, dispostos no polo basal,

onde se vê estrias basais remanescentes das células estriadas, porém mais curtas e inconstantes. O citoplasma apresenta, nos seus dois terços superiores (supranuclear), grande quantidade de grânulos secretores acidófilos esféricos (grânulos eletrodensos, de secreção serosa), de tamanhos e quantidades variáveis. Estes grânulos podem ser encontrados dentro do lúmen, após a descarga das células (JACOBY e LEESON, 1959; TAMARIN e SREEBNY, 1965; BARBOSA e TAGA, 1997; AMANO et al., 2012).

Os grânulos destes ductos contêm uma variedade de polipeptídios biologicamente ativos, tais como fatores de crescimento celular e hormônios, sendo excitados em resposta a estímulos neurais e hormonais (AMANO et al., 2012). São profundamente afetados às variações hormonais, como por exemplo, a testosterona (TAMARIN e SREEBNY, 1965; PINKSTAFF, 1980; BARBOSA e TAGA, 1997).

Entre a membrana plasmática basal e lâmina basal, envolvendo todos ácinos e ductos intercalares em intervalos regulares, existem as células mioepiteliais (ou células em cesta), do tipo dendríticas que abraçam as unidades secretoras terminais. Estas células possuem corpos fusiformes ou estrelados centrais, que abriga seu núcleo achatado, e do qual emergem processos citoplasmáticos pontiagudos, alongadas e ramificados, contendo filamentos de miosina, actina e proteínas relacionados, a semelhança do músculo liso, e abraçam os ácinos e ductos intercalares a semelhança de um polvo. Porém as células que envolvem os ductos intercalares possuem corpo mais alongado e menor números de expansões citoplasmáticas (LEESON, 1956; LEESON e JACOBY, 1957; TAMARIN e SREEBNY, 1965; TAMGADGE et al., 2013; DELPORTE, BRYLA, PERRET, 2016).

Na verdade, as células mioepiteliais estão associadas com os ácinos mais profundos da glândula, cobrindo em torno de 54% da sua superfície. Cada célula emite quatro ou cinco ramos primários, que se bifurcam duas ou três vezes, produzindo, no final, cerca de 20 a 40 processos terminais por célula. Os processos se unem a processos de outras células mioepiteliais próximas, por desmossomo, formando uma espécie de rede na superfície do ácino. Também estabelecem junções *gap* e hemidesmossomos com a lâmina basal (BROCCO e TAMARIN, 1979). Estão relacionadas com funções contráteis, ajudando na excreção da saliva primária do ácino para o sistema ductal, e ao longo das primeiras porções do sistema ductal; ajuda na ruptura das células acinares repletas de secreção; contração e ampliação do diâmetro dos ductos intercalares, diminuindo ou aumentando a sua resistência ao escoamento; impedem

o acúmulo de secreção no interior das células secretoras; suporte para a célula secretora; produzem parte da membrana basal; e acelera o fluxo de saliva. Recebem inervações tanto simpáticas como parassimpáticas (TAMGADGE et al. 2013).

Da cápsula conjuntiva periférica, delgada e constituída por tecido conjuntivo denso fibroso, sustenta e envolve o parênquima glandular, protegendo-o, e da qual partem septos conjuntivos que dividem a glândula em lobos maiores que são subdivididos em lóbulos. Os septos são formados por tecido conjuntivo semidenso (mais celular) (JACOBY e LEESON, 1959; LORBER, 1991; MELFI e ALLEY, 2010). No interior de cada lóbulo, o estroma tem como componente celular os fibroblastos, adipócitos, plasmócitos secretores de imunoglobulinas (ao redor ductos intralobulares), mastócitos, macrófagos e numerosos linfócitos, que pode, inclusive, migrar através do epitélio ductal (BOGART e LEMOS, 1973; FERRARIS e MUÑOS, 2006).

Através dos septos conjuntivos, o suprimento sanguíneo (com capilares periductais, capilares periacinares), vasos linfáticos e fibras nervosas (simpáticas e parassimpáticas) chegam a todo o parênquima glandular (TAMARIN e SREEBNY, 1965; BOGART e LEMOS, 1973; D'AVOLA et al., 2006). Os ductos excretores maiores são rodeados por uma quantidade relevante de tecido colagenoso, com vasos sanguíneos de maior calibre e feixes de axônios do sistema nervoso autônomo (LOBER, 1991). Feixes de axônios revestidos pelas células de Schwann são abundantes no tecido conjuntivo, cursando juntamente com os vasos sanguíneos. Porém perto dos ácinos, mantém relações com as células acinares em depressões rasas na base das células, e com nos ductos intercalares que são densamente inervados. Axônios rodeados apenas por membrana basal são vistos frequentemente nos espaços do tecido conjuntivo próximo aos ductos intercalares (YOHRO, 1971).

Como envelhecimento foram observadas mudanças histológicas, como diminuição do parênquima glandular, em termos de volume, e aumento do estroma. Há, aproximadamente, uma diminuição do volume acinar de 20% a 40% para as glândulas parótida e submandibular, aumentando-se a área ocupada por gordura e tecido fibroso. No sistema ductal não foram notadas mudanças (SREEBNY, 2000).

Além disos, em roedores, existe um evidente dimorfismo sexual observado na estrutura das glândulas salivares submandibulares (CARAMIA, 1966a; JAYASINGHE, COPE, JACOB, 1990) e das sublinguais (LIMA et al., 2004). Os hormônios da tireoide e hipófise têm sido implicados nas modificações estruturais e funcionais das glândulas

salivares. Receptores de estrogênio estão presentes nas glândulas parótidas e submandibulares e estes hormônios sexuais podem influenciar na estrutura histológica da glândula, através de apoptose, relacionado com o envelhecimento (RAHNAMA et al., 2004; MOHAMED, ELNEGRIS, WAHDAN, 2015). Há redução no fluxo salivar de glândulas submandibulares e sublinguais com o aumento da idade e redução nos níveis de produção de estrogênio, pois os hormônios esteroides sexuais também regulam o crescimento, a diferenciação e a função das células em tecidos não reprodutivos e seus níveis baixos levam a mudanças tróficas em muitos órgãos, incluindo glândulas salivares (VALIMAA et al., 2004; MOHAMED, ELNEGRIS, WAHDAN, 2015). Outra hipótese, seria uma ação indireta sobre as glândulas através da sua vascularização, pois o estrogênio regula o equilíbrio entre as influências vasoconstritoras e vasodilatadoras dependentes do endotélio, possivelmente através de sua ação específica sobre o óxido nítrico (NO) e as vias dependentes de prostaglandina (PG2) (SMITH et al., 2009). Em machos, também foi relatado mudanças na estrutura histológica de glândulas submandibulares de camundongos, após a castração, como redução em volume dos ductos intercalares e diminuição do número de grânulos secretórios (CARAMIA, 1966b).

2.2. Localização e Anatomia da Glândula Submandibular de Ratos

Em roedores os pares de glândulas submandibulares e sublinguais estão associadas formando uma estrutura atualmente denominada de complexo submandibular-sublingual (SSC), localizadas na região cervical anterior ou ventral, próximas uma da outra e entre os linfonodos submandibulares e o osso esterno (JACOBY e LEESON, 1959; BROCCO e TAMARIN, 1979; LORBER, 1991; AMANO et al., 2012; CECCHINI et al., 2013). Quando isoladas, a glândula submandibular apresenta-se como forma de uma amêndoa compacta, com margens regulares, enquanto que a glândula sublingual possui a forma de uma lente (S BARBATI et al., 1994; CECCHINI et al., 2013).

O complexo submandibular-sublingual é encapsulado por uma fáscia cervical comum. Porém os ductos excretores de ambas as glândulas correm separados e

abrem-se em locais distintos da cavidade oral do animal. A glândula sublingual ocupa a região laterorrostral (laterossuperior) da glândula submandibular, sendo que as margens rostrais de ambas as glândulas limita os linfonodos submandibulares (SBARBATI et al., 1994; AMANO et al., 2012; CECCHINI et al., 2013).

A glândula submandibular situa-se inferiormente (ventral) e glândula parótida, que é ligeiramente maior. E é adjacente à glândula sublingual, que está, como dito anteriormente, mais anteriormente sobrejacente (CECCHINI et al., 2013). Na região cervical ventral, o complexo glandular está recoberto topograficamente, do plano tecidual mais superficial pela pele do animal, tecido adiposo subcutâneo e dois planos de tecido muscular separados por tecido conjuntivo (SBARBATI et al., 1994). O ducto excretor principal da glândula submandibular passa pelo ducto da glândula sublingual e, às vezes, podem se confluir antes de desembocar na boca (PROCTOR et al., 2007).

Em animais perfundidos com uma solução fixadora, fica evidente a diferença de tonalidade entre ambas as glândulas (AMANO et al., 2012). As duas glândulas são separadas por uma fina camada de tecido conjuntivo, e apesar de formarem um complexo, ambas possuem ductos excretores individualizados, que deixam as glândulas por suas margens ou extremidades rostrais (SBARBATI et al., 1994).

A face ventral do complexo é convexa com uma elevação próxima da junção dos terços rostral e médio, enquanto que a face dorsal é planificada, repousando sobre a laringe. A extremidade rostral é mais espessa ou romba, sendo o contrário na extremidade caudal. Apenas a glândula submandibular alcança a extremidade posterior (caudal), tendo formato ovoide (LORBER, 1991; CECCHINI et al., 2013).

2.3. Fisiologia da Secreção Salivar

De acordo com o modelo bem estabelecido de inervação das glândulas salivares, a inervação motora, eferente visceral, é realizada pelas duas divisões do sistema nervoso autônomo (SNA), parassimpático e simpático, através dos neurotransmissores acetilcolina (ACh) e a norepinefrina ou noradrenalina (NA), respectivamente,

promovendo um processo chamado ligação estímulo-secreção, resultando na secreção constitutiva da saliva em qualquer condição fisiológica. Tanto as células acinares, quanto as células ductais, possuem receptores para estes neurotransmissores nas suas membranas plasmáticas basolaterais (BAUM, 1993; FERRARIS e MUÑOS, 2006; PROCTOR e CARPENTER, 2007; SANIOTO et al., 2013). Porém, uma divisão do SNA pode estimular mais que a outra, modificando a composição da saliva (FERRARIS e MUÑOS, 2006).

Nas células acinares estão presentes receptores adrenérgicos (alfa – α ; e beta – β), estimulados pelo SNA simpático; e receptores colinérgicos muscarínicos do tipo M3, M1 e M5, estimulados através do SNA parassimpático (TOBIN, GIGLIO, GÖTRICK, 2002; FERRARIS e MUÑOS, 2006).

Na inervação secretorotora das glândulas salivares, tantos componentes simpáticos como componentes parassimpáticos, influenciam na secreção salivar de forma sinérgica (agem juntos), especialmente quando os níveis de estimulação são baixos. O SNA também controla o fluxo sanguíneo através das glândulas salivares, sendo importante na regulação da taxa de fluxo salivar (EMMELIN, 1987; CARPENTER, PROCTOR, GARRETT, 2005). Os neurotransmissores (NA ou ACh) funcionam como os primeiros mensageiros (ADRIENN, 2006).

No reflexo salivar, as células mioepiteliais também recebem inervação das duas divisões do SNA, contraindo-as e, dessa forma, apoiam a secreção promovendo o fluxo salivar em direção ao ducto intercalar, e deste para o ducto estriado. A destruição de um tipo de nervo, especialmente o nervo parassimpático, pode levar à atrofia glandular e supersensibilidade do parênquima glandular (EMMELIN, 1987).

A saliva é secretada continuamente por uma estimulação basal (saliva não estimulada); ou estimulação reflexa dos ramos simpáticos e parassimpáticos sobre os adenômeros (saliva estimulada) (KONTTINEN et al., 2010). É produto de um processo de secreção ativo. As células serosas produzem uma saliva primária proteinácea aquosa, rica em amilase salivar; enquanto que as células mucosas, produzem uma saliva com glicoproteínas, ricas em mucina, mais viscosa (CALIL e TAMBELI, 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 realizada

pelos ácinos e produz a saliva primária, isotônica quando comparada com a osmolaridade 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; MIRANDA-RIUS et al., 2015), entre a luz do ducto estriado e a rede capilar periacinar, pela troca de troca de eletrólitos à medida que flui através do referido ducto (KONTTINEN et al., 2010).

Para atender a demanda do órgão, as glândulas salivares têm elevado fluxo sanguíneo proporcional à taxa de formação de saliva, podendo os vasos se dilatarem para atender a alta taxa metabólica (SANIOTO et al., 2013; COSTANZO, 2014). Resumidamente, podemos dizer que a interação entre as células acinares, SNA e vasos sanguíneos é responsável pela saliva que chega na cavidade oral.

O estímulo da secreção salivar pode ser advindo de um complexo aprendizado associativo, por diferentes estímulos sensoriais exógenos, tais como visuais, auditivos e olfativos; ou de forma incondicionada, por meio da chegada do alimento à cavidade oral, que ativa mecanorreceptores e quimiorreceptores da mucosa orofaríngea. Já a diminuição do fluxo salivar pode ocorrer mediante quadros de fadiga, sono, medo, desidratação, patologias salivares, drogas, dentre outros (SANIOTO et al., 2013).

A ligação do neurotransmissor com um receptor provoca na célula parenquimatosa o início a mecanismos precisos de transdução, gerando respostas de mobilização da água (hidrocínética), e/ou secreção de proteínas (proteocínética), e/ou indução de síntese (sintética), ou ainda, a manutenção do tamanho funcional normal (trófica) (FERRARIS e MUÑOS, 2006), sendo que o bloqueio parassimpático crônico leva à atrofia dessas glândulas (SANIOTO et al., 2013).

Existem dois principais mecanismos de transdução em células acinares das glândulas salivares: (1) a geração de AMP (AMP cíclico); e (2) a hidrólise da PIP₂ (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato) (ADRIENN, 2006). A estimulação de receptores provoca aumento intercelular de segundos mensageiros, os quais disparam eventos adicionais que levam à resposta celular (FERRARIS e MUÑOS, 2006).

A saliva serosa, secretada pelos ácinos serosos, é formada por uma solução contendo baixo conteúdo mucinógeno e rica em proteínas como α -amilase salivar (ptialina) e proteínas ricas em prolina, sendo uma secreção mais aquosa. Porém muitas destas proteínas são do tipo glicoproteínas, consideradas mucossubstâncias, e por

isto, alguns autores preferem chama-la de saliva seromucosa. Já uma saliva mais mucosa, é mais viscosa e possui proteínas altamente glicosiladas denominadas de mucinas (FERRARIS e MUÑOS, 2006; NANCI, 2013; SANIOTO et al., 2013).

Dessa forma, fica claro que existe uma íntima relação entre o estímulo e a qualidade da saliva. Porém, quando ambos os nervos são estimulados, há uma cooperação entre os dois sistemas e aumento considerável na quantidade de proteína secretada na saliva (ANDERSON et al., 1994), da qual participam as células acinares e as células ductais (PROCTOR e CARPENTER, 1998). Embora as células acinares sejam as principais responsáveis pela produção e secreção da saliva, ocorre um pequeno movimento de água nos ductos excretorios (TEYMOORTASH et al., 2007).

A ACh logo após exercer sua ação, sofre hidrólise pelas colinesterases (enzima acetilcolinesterase – AChE), liberando ácido acético e colina. Nesta hidrólise, que ocorre na fenda sináptica, cerca de 50% da colina produzida é recaptada pelo terminal axônico, e, posteriormente, é reutilizada para a biossíntese de acetilcolina (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).

Além da regulação adrenérgica e colinérgicas, os axônios contêm arranjos de neuropeptídeos, como polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), substância P, peptídeo de calcitonina gene-relacionado e neuropeptídeo Y (também exercem efeito na vascularização ao regular o fluxo sanguíneo) que influenciam no metabolismo glandular. Estes neuropeptídeos nem sempre estão presentes em axônios do mesmo tipo (EKSTRÖN et al., 1996; NANCI, 2013). A ausência de substância P, por exemplo, promove uma atrofia acinar (HISHIDA et al., 2016).

Outro mecanismo que pode influenciar a função secretora das células acinares é o óxido nítrico (NO) (ADRIENN, 2006), produzido por nervos parassimpáticos, células endoteliais vasculares e células secretoras glandulares, estimulam a secreção da produção de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) e liberam o Ca^{2+} dos sítios de armazenamento intracelular de células secretoras. Evidências indicam que estes mecanismos agem de acordo com as vias de sinalização β -adrenérgica e muscarínica colinérgica, aumentando ou modulando a secreção de saliva (NANCI, 2013). Atua como um neuromodulador vascular na regulação de processos secretorios específicos

(ELLIES et al., 2006a; ELLIES et al., 2006b), assegurando fornecimento de sangue durante a secreção de longo prazo (ADRIEN, 2006).

A enzima calicreína, que catalisa a produção de bradicinina a partir de proteínas plasmáticas específicas, é um potente vasodilatador que eleva o fluxo sanguíneo e a taxa metabólica das glândulas salivares. Esta enzima produzida nas células mesenquimatosas é liberada no meio intersticial durante a estimulação neural da secreção salivar (SANIOTO et al., 2013; COSTANZO, 2014).

Por outro lado, alguns fatores diminuem a salivação. A deficiência em zinco (Zn), por exemplo, nas glândulas submandibulares, provoca uma redução na atividade da fosfatase alcalina em células mioepiteliais, o que implica numa diminuição do fluxo salivar destas glândulas (CHAUDHRY e MEYER, 1979).

2.3.1. Regulação pelo Sistema Nervoso Parassimpático

A estimulação dos nervos colinérgicos promove a liberação de um maior volume de saliva fluida (altamente aquosa) e rica em eletrólitos inorgânicos (secreção iônica), porém com um menor conteúdo de proteínas, além de promover vasodilatação (CARPENTER, PROCTOR, GARRETT, 2005; MELVIN et al., 2005; GUYTON e HALL, 2011; SANIOTO et al., 2013). Esta estimulação pode ser modulada positivamente (alimento, cheiro e náusea por reflexos condicionados) ou negativamente (medo, pelo sono e desidratação) (COSTANZO, 2014).

As fibras nervosas parassimpáticas, ao se relacionarem com as células acinares através de junções neuroglandulares (JNG) liberam na fenda sináptica, mediante a passagem de um potencial de ação, a acetilcolina (ACh). Receptores muscarínicos localizados na membrana basolateral das células acinares quando ligados a ACh, promove a elevação citosólica dos níveis de Ca^{2+} a partir de armazéns intracelulares sensíveis ao inositol trifosfato (IP_3), que é um segundo mensageiro, envolvendo o ciclo fosfoinositídeo. O aumento do cálcio citoplasmático ativa as proteínas quinases C (PKC), o que aumenta o fluxo secretor de fluídos e também a secreção proteica (GUYTON e HALL, 2011; SANIOTO et al., 2013).

Os receptores M3 ativam outras proteínas G (G_q) que ativam a fosfolipase C com especificidade para fosfoinosítídeo e catalisa a formação de diacilglicerol (DAG) e IP_3 do substrato fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2). O DAG ativa a proteína PKC que, em troca, fosforiliza proteínas citosólicas e pode aumentar a transcrição de genes específicos. O IP_3 liga-se aos receptores nas membranas intracelulares, resultando na abertura dos portões de canal de Ca^{2+} , mobilizando cálcio para o meio intracelular, que, por sua vez, produz a resposta fisiológica (secreção salivar), com aumento na síntese e secreção de proteína (AUB e PUTNEY JR., 1987; COSTANZO, 2014).

Em repouso, os canais para Cl^- e para K^+ estão fechados na membrana plasmática. Estes canais se abrem mediante aumento da concentração intracelular (citosólica) de Ca^{2+} , ao estímulo de M3. A abertura dos canais de Cl^- e K^+ aumenta sua condutância e ocorre um efluxo de K^+ para o plasma e de KCl e Cl^- para a luz do ácino, tornando-se mais eletronegativa, o que gera gradiente para o fluxo de Na^+ por via transepitelial ou, predominantemente, via intercelular atravessando o complexo juncional apical. Este movimento de $NaCl$ para a luz do ácino promove um gradiente osmótico propiciando o fluxo de água para a luz acinar, pelas vias intercelular (paracelular) e transcelular (transcelular), uma vez que a membrana plasmática apical das células acinares possuem aquaporinas 5 (AQP5). A secreção fluida das células acinares, acompanha a proteica, e tem composição semelhante do plasma sanguíneo, contendo Na^+ , Cl^- e HCO_3^- , porém mais isotônica (SANIOTO et al., 2013).

O aumento do cálcio intracelular citosólico livre, também ativa os canais de K^+ e Cl^- dependentes de Ca^{2+} , estimulando a translocação de AQP5 das vesículas intracelulares para a membrana citoplasmática apical e o movimento rápido de água (excreção) que fará parte da composição da saliva (MELVIN et al., 2005; CATALÁN, NAKAMOTO, MELVIN, 2009). Aquaporinas (AQP) são proteínas integrais de membrana que formam poros ou canais de água na membrana plasmática das células biológicas, incluindo as células acinares e ductais. Nas glândulas salivares de ratos, a AQP5 é considerada a mais importante (MELVIN et al., 2005; DELPORTE, BRYLA, PERRET, 2016), necessária para manter a osmolaridade correta da saliva secretada (AURE, RUUS, GALTUNG, 2014; HOSOI, 2016). Originalmente estão localizadas no citoplasma (subcelular), necessitando de estímulos para sua expressão e transporte até a membrana plasmática apical (ISHIKAWA et al., 2006a,b; XIE et al., 2016).

2.3.2. Regulação pelo Sistema Nervoso Simpático

Na estimulação adrenérgica ou simpática há a secreção de um volume menor de saliva mais espessa e viscosa, com um conteúdo proteico ou proteáceo mais elevado e outros constituintes salivares, como substâncias mucosas e mucoproteínas da secreção orgânica através da exocitose. Estimam os receptores tipo β -receptores (β -adrenérgicos), mas também os receptores α_1 podem ser ligados (CARPENTER, PROCTOR, GARRETT, 2005; ELLIES et al., 2006b; GUYTON e HALL, 2011).

Na superfície basolateral das células acinares (e células ductais), as fibras nervosas simpáticas liberam noradrenalina (NA) por exocitose através da rota da adenosina monofosfato cíclico (AMPC), um segundo mensageiro que eleva a sua concentração no meio intracelular, fazendo aumentar a síntese proteica (FERRARIS e MUÑOS, 2006; SANIOTO et al., 2013; COSTANZO, 2014). Além de exocitose, proteínas podem ser secretadas direto para a saliva, estroma ou circulação sanguínea através de vias vesiculares (PROCTOR e CARPENTER, 1998).

Os receptores do tipo β_1 , estimula a enzima adenilato ciclase e produção de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), que por sua vez, medeiam um incremento na secreção enzimática, com maior conteúdo proteico, caracterizando, portanto, uma secreção salivar mais viscosa. O outro tipo de receptor do tipo α_1 , que têm o IP_3 como segundo mensageiro, mediando a elevação do nível de Ca^{2+} citosólico. Ambos os receptores aumentam a secreção salivar (FERRARIS e MUÑOS, 2006; SANIOTO et al., 2013; COSTANZO, 2014).

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 presente na membrana plasmática é também ativada, e catalisa a conversão de adenosina trifosfato (ATP) para o segundo mensageiro intracelular, o AMPC (3',5'-adenosina monofosfato cíclico). Este, por sua vez, promove a fosforilação da proteína quinase A (proteína quinase AMP-dependente), que fosforila outras proteínas que, por sua vez, podem estar envolvidas no processo de exocitose, 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 (AUB e PUTNEY JR., 1987; FUJITA-YOSHIGAKI, 1998; FERRARIS e MUÑOS, 2006).

O AMPc pode também estimular a liberação do Ca^{2+} do estoque intracelular, aumentando sua concentração citosólica. Dessa forma o Ca^{2+} pode ser o mediador intracelular comum a todos os receptores; as diferentes respostas celulares podem refletir as diferentes fontes de Ca^{2+} , diferentes locais de sua concentração, ou ambos (AUB e PUTNEY JR., 1987; FERRARIS e MUÑOS, 2006).

Uma descarga simpática, ao ativar receptores α_1 , tem um efeito inicial de elevar o fluxo de secreção salivar, principalmente por estimular a contração das células mioepiteliais e por elevar a concentração citoplasmática de Ca^{2+} , potencializando o efeito da acetilcolina. Ao mesmo tempo, uma ação simpática mais intensa ou prolongada causa vasoconstrição simpática do tecido glandular e diminui o fluxo de sangue ofertado à glândula, contribuindo secundariamente para reduzir a secreção salivar. Portanto, a salivação ativada por estímulo simpático é de pequeno volume, viscosa, em decorrência do maior conteúdo proteico, e com alta concentração de K^+ e de HCO_3^- , como ocorre em situações de estresse, medo ou ansiedade. A interrupção da inervação simpática tem pouco efeito sobre a função das glândulas salivares (FERRARIS e MUÑOS, 2006; SANIOTO et al., 2013).

2.3.3. Alteração da Saliva Primária em Saliva Secundária

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, pois as células do ducto estriado estão envolvidas no transporte ativo de eletrólitos (KONTTINEN et al., 2010).

A saliva recém secretada pelas células acinares apresenta composição eletrolítica e tonicidade semelhantes à do plasma sanguíneo (isotônica ou ligeiramente hipertônica em relação ao plasma sanguíneo, com alta concentração de íons potássio e bicarbonato e baixa concentração de íons sódio e cloreto), sendo denominada saliva primária, e por isso denominado de primeiro estágio da secreção salivar. Ainda nesta situação, as concentrações de α -amilase na saliva primária dependem do tipo de estimulação neural (simpático e parassimpático) para sua secreção (FERRARIS e

MUÑOS, 2006; CATALÁN, NAKAMOTO, MELVIN, 2009; SANIOTO et al., 2013; COSTANZO, 2014). As células do sistema ductal secretam algumas proteínas e modificam a composição iônica da saliva à medida que a saliva se move em direção a cavidade oral (TURNER e SUGIYA, 2002).

Para a formação da saliva primária, existe na membrana basolateral da célula acinar, a bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, canais de K^+ , trocador $\text{H}^+\text{-K}^+$ e o cotransportador $\text{Na}^+\text{-2Cl}^-\text{-K}^+$. Além de K^+ ser absorvido pela $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, ele também é transportado por canal para o meio extracelular e recircula pela $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. O cotransportador $\text{Na}^+\text{-2Cl}^-\text{-K}^+$ eleva o potencial eletroquímico do Cl^- acima dos valores de equilíbrio e provê a força para a transferi-lo para a luz do ácino, através de um canal na membrana apical. O trocador $\text{H}^+\text{-K}^+$ catalisa a reação de hidratação do CO_2 no sentido da formação de HCO_3^- e H^+ , aumentando a concentração intracelular de HCO_3^- . O HCO_3^- é secretado para o lúmen do ácino por um canal de ânion, tornando a luz eletricamente negativa. Forma um campo elétrico que gera a força para movimentação de cátions, como o Na^+ , por via paracelular. No ácino, o epitélio é mais permeável à água, movimentando-a pelo gradiente osmótico para a luz acinar. A maior parte do fluido na saliva é movida pela secreção ativa de Cl^- e contém altas concentrações de Na^+ e Cl^- , formando a principal molécula da saliva primária (NaCl) (BARRETT et al., 2014; COSTANZO, 2014).

Ou seja, a saliva primária apresenta uma baixa concentração de K^+ em relação a de Na^+ , mas significativamente maior que a concentração de K^+ no plasma. Desta forma, a osmolaridade e a concentração os íons Na^+ , K^+ , Cl^- e HCO_3^- da saliva primária são similares às do plasma sanguíneo. Outros íons secretados também estão presentes (FERRARIS e MUÑOS, 2006; COSTANZO, 2014).

Uma segunda etapa, ou estágio, ocorre quando a saliva primária flui para o sistema de ductos estriados, tornando-se hipotônica, ao passo que se mantém o mesmo volume do fluido. O ducto estriado é relativamente impermeável à água, possui alta taxa metabólica e modifica a composição eletrolítica do fluido movimentando basicamente íons. Absorve íons sódio (Na^+) e cloreto (Cl^-) que retornam ao plasma, e secreta íons potássio (K^+) e bicarbonato (HCO_3^-) para a luz dos ductos. Mas a quantidade de solutos removidos excede a quantidade adicionada (FERRARIS e MUÑOS, 2006; CATALÁN, NAKAMOTO, MELVIN, 2009; CALIL e TAMBELO, 2014).

Os mecanismos que acontecem nas células estriadas são complexos e simultâneos, envolvendo as membranas luminal e basolateral, com gasto de energia. O resultado final (saliva secundária) se dá pelo balanço final de todos os mecanismos de transporte. Logo há uma espécie de diluição da saliva (COSTANZO, 2014). O ducto estriado possui receptores β -adrenérgicos acoplados à adenilato ciclase, receptores putativos para prostaglandina E2 e receptores muscarínicos (EVANS, LAU, CASE, 1993). A estimulação de receptores colinérgicos ativa os transportadores de íons nas células ductais (TURNER e SUGIYA, 2002).

A membrana apical (luminal) contém três transportadores de íons: trocador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ (cotransportador passivo), o trocador $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$ e o trocador $\text{H}^+\text{-K}^+$ (cotransporte passivo). Já na membrana basolateral existe a bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ (transporte ativo, no qual saem 3 íons Na^+ para o meio extracelular e entram 2 íons K^+ , para o citosol), o trocador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ e os canais de Cl^- e K^+ . Estes transportadores e canais proteicos, têm o objetivo de absorver o Na^+ e Cl^- da saliva primária (suas concentrações na saliva ficam mais baixas que no plasma sanguíneo) e secretar K^+ e HCO_3^- para formar a saliva secundária (suas concentrações na salivar ficam maiores do que a plasma). Assim, o fluído secretado flui do polo basal para o polo apical das células ductais até o lúmen acinar. Sendo que a taxa de absorção (reabsorção) em moles de Na^+ e Cl^- da saliva, maior do que a taxa de secreção de K^+ e HCO_3^- , diluindo a saliva no interior da luz do ducto estriado (MURAKAMI et al., 2001; GUYTON e HALL, 2011; BARRETT et al., 2014; COSTANZO, 2014).

A composição iônica (tonicidade) da saliva varia com a taxa do fluxo secretor, ou seja, do tempo de contato da saliva primária com as células. Em baixos fluxos secretórios (maior tempo de contato), como por exemplo, menos que 1 mL/min, a composição da saliva difere fundamentalmente da plasmática, sendo hipotônica (menores concentrações de Na^+ e Cl^-) e possui um pH mais ácido (concentrações de K^+ acima de 20 mM). Mas o aumento do fluxo secretor (menor tempo de contato), como por exemplo, 4 mL/min, aproxima a composição da saliva à do plasma sanguíneo ou da saliva inicial, seu pH se torna mais alcalino (maior quantidade de Na^+ , K^+ e, principalmente, HCO_3^- , que pode chegar a valores de até 100 mM, conferindo à saliva pH próximo a 8,0), e eleva sua tonicidade (BOYCE e BAKHEET, 2005; SANIOTO et al., 2013; COSTANZO, 2014). Mesmo a altas taxas secretórias, a tonicidade da saliva é, no máximo, cerca de 70% da plasmática, ou seja, ainda hipotônica em relação ao

plasma (SANIOTO et al., 2013). Esse fluxo secretor não altera a concentração de HCO_3^- , pois a secreção deste ânion é estimulada quando os ácinos recebem o estímulo para a produção de saliva, permanecendo constante e independente da taxa secretória após o fluxo salivar ter atingido valores próximos a 1 mL/min. A concentração de K^+ também independe do fluxo secretor e permanece sempre superior à plasmática após taxa secretória de aproximadamente 1 mL/min, indicando mecanismos ativos de secreção (FERRARIS e MUÑOS, 2006; GUYTON e HALL, 2011; SANIOTO et al., 2013; COSTANZO, 2014).

2.4. Saliva

A mais importante função das glândulas salivares é a produção e secreção de uma substância fluida, a saliva. É importante fazer-se distinção entre secreção glandular pura, produto puro proveniente da secreção salivar, e a saliva total ou mista, formada após chegar na cavidade oral e misturar-se com os demais fluidos presentes (FERRARIS e MUÑOS, 2006). Toda superfície interna da cavidade oral, incluindo os dentes e a língua, é coberta por uma película úmida e fluida, a saliva (NANCI, 2013), sendo a maior protetora dos tecidos e órgãos orais (LOPES et al., 2008).

A saliva é uma secreção exócrina, sem cor (clara), discretamente pegajosa, formado por um líquido aquoso rico em eletrólitos e proteínas, ou em mucinas, hipotônica em relação ao plasma sanguíneo, resultante da secreção de glândulas salivares maiores e menores, além do fluido gengival (crevicular), com pH em torno de 6,8 e 7,2, geralmente, ligeiramente ácida e densidade em torno de 1 mg/mL (WILKEN, ASLAMI, BACKES, 2008; MELFI e ALLEY, 2010; KATCHBURIAN e ARANA-CHAVEZ, 2012; CALIL e TAMBELO, 2014). Sua composição final varia de acordo com estimulação do SNA e da glândula considerada (MELVIN et al., 2005).

Dessa forma, pode-se definir por saliva como uma mistura complexa de moléculas e fluidos presentes no interior da cavidade oral, oriundos das glândulas salivares maiores e menores, do fluido gengival (um exsudato do sulco gengival), além de células de descamação do epitélio oral, microrganismos e seus produtos do

metabolismo (detritos celulares), resíduos alimentares, componentes séricos (componentes do soro sanguíneo) e células inflamatórias, por isso também chamada de saliva mista (fluido oral) (MELVIN et al., 2005; FERRARIS e MUÑOS, 2006; SANIOTO et al., 2013). Ou seja, a saliva total é resultado do produto da secreção de todas as glândulas salivares (maiores e menores), mais o fluido gengival.

A saliva possui extrema importância para a manutenção e integridade do ambiente oral, sendo importante na higiene, na saúde e no conforto desta cavidade (CARPENTER, 2013; SANIOTO et al., 2013), que vai desde proteção da cavidade oral de traumatismos mecânicos e químicos (contra o impacto do refluxo ácido gástrico, por exemplo), tamponamento, formação da película salivar, manutenção da integridade dos dentes, ação antimicrobiana, reparo tecidual, digestão, gustação, balanço hídrico e lubrificação da mucosa oral, da faringe e do esôfago (FERRARIS e MUÑOS, 2006; MELFI e ALLEY, 2010; NANJI, 2013; CALIL e TAMBELI, 2014). Além disso, mesmo após a deglutição, tem capacidade de proteção mucosa no trato gastrointestinal e na manutenção da saúde sistêmica (LLENA-PUY, 2006).

O fluxo da saliva total é um índice da umidade oral, indicando o grau de atividade metabólica das glândulas salivares, podendo ainda refletir o estado de vários parâmetros fisiológicos. A medida do fluxo salivar é básica para o entendimento do processo de secreção e para avaliação das condições e doenças orais e sistêmicas que levam a hipofunção salivar (SREEBNY, 2000; SANIOTO et al., 2013). O estudo do fluxo salivar (em repouso ou sob estimulação), bem como da sua composição química básica e de propriedades biofísicas (pH, viscosidade, osmolaridade etc.) são fundamentais para o entendimento do processo de secreção salivar e para avaliação de inúmeras doenças de ordem sistêmica (como exemplo, AIDS, nefropatias, diabetes, neoplasias) ou daquelas que frequentemente acometem a cavidade bucal (como cáries e periodontopatias) (CARPENTER, 2013; SANIOTO et al., 2013).

Por dia, estima-se a produção total de saliva de um indivíduo adulto pode chegar à 1,5 litros, muito embora, a maioria dos investigadores calcula uma média de 600 a 800 mL ou cc diários (FERRARIS e MUÑOS, 2006), ou 0,4 mL/min. Destes, 0,5 litros é de saliva não estimulada (CALIL e TAMBELO, 2014).

Os três pares de glândulas salivares maiores são, em conjunto, responsáveis pela produção de aproximadamente de 80% (ADRIENN, 2006) a 90% da secreção salivar total (SANIOTO et al., 2013). A secreção salivar é contínua e por isso é

classificada de duas formas: em repouso (não estimulada) e estimulada (MELVIN et al., 2005; SANIOTO et al., 2013). Dessa forma, quando em repouso (não estimulada, reflete um fluxo basal contínuo), cerca de 70% da saliva é produzida e secretada pelas glândulas submandibulares (principalmente) e sublinguais (SREEBNY, 2000; HORNIBROOK e COCHRANE, 2012; CARPENTER, 2013; CARPENTER, 2013; SANIOTO et al., 2013), 15 a 20% da parótida e 5 a 10% das glândulas salivares menores (SREEBNY, 2000; CARPENTER, 2013; SANIOTO et al., 2013).

Já na estimulação (saliva estimulada), como ocorre durante a alimentação (inicia-se através de um estímulo sensorial ou aferente), as glândulas parótidas fornecem a maior parte da saliva, em torno de aproximadamente 45 a 50% (SREEBNY, 2000; WILKEN, ASLAMI, BACKES, 2008), e 40 a 45% das glândulas submandibular e sublingual, e envolve interação complexa de centros nervosos superiores (FERRARIS e MUÑOS, 2006; SANIOTO et al., 2013).

O fluxo basal salivar (salivação não estimulada) é de 0,3 a 0,5 mL/min (FERRARIS e MUÑOS, 2006). Já na salivação estimulada possui um fluxo salivar que varia entre 1 e 3 mL/min. Entretanto, quando o fluxo salivar está abaixo de 0,1 a 0,2 mL/min durante o período de repouso, ou de 0,5 a 0,7 mL/min, durante o período de estimulação, é considerado como hipossalivação (xerostomia, assialia, sialopenia ou hipossalialia) (FERRARIS e MUÑOS, 2006; SANIOTO et al., 2013).

2.4.1. Composição da Saliva

A maior parte dos componentes da saliva (água, proteínas, glicoproteínas e eletrólitos) são ativamente secretados pelas glândulas salivares (LLENA-PUY, 2006; PROCTOR e CARPENTER, 2007). As glândulas salivares menores, secretam pouco volumes de saliva mucosa (rica em mucina) (menos de 1 μ L/min por glândula) (CARPENTER, 2013). Já as glândulas de von Ebner secretam saliva serosa pura e contém lipocalina e lipase lingual (ELIASSON e CARLEN 2010).

Consiste numa solução aquosa (99% composta por água) heterogênea, possuindo várias substâncias orgânicas e inorgânicas, tais como: eletrólitos (Na^+ , K^+ , Cl^- e HCO_3^- , em maior quantidade; Ca^{2+} , Mg^{2+} , hidrogênio fosfatase ou HPO_4^{2-} , tiocianeto ou SCN^- e F^- , em menor quantidade, dentre outros); proteínas, mucoproteínas e

peptídeos (amilase ou ptialina, lipase salivar ou lingual, proteínas ricas em prolina, mucinas, histamina, cistatina, peroxidase, lisozima, lactoferrina, estaterinas, defensinas, catelicidina-LL37, e em menor quantidade: eritropoietina, catalases, lactoperoxidase, anidrase carbônica secretora, tromboplastina, calicreína, fosfatase ácida, esterase etc.); anticorpos ou imunoglobulinas (IgA de secreção, IgG e IgM); pequenos compostos orgânicos (moléculas de glicose, aminoácidos, ureia, ácido úrico, lipídios, colesterol, glicose, citrato, lactato, amoníaco, creatinina etc.); além de fator de crescimento nervoso (NGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), insulina, proteínas de ligação ao monofosfato de adenosina cíclico (AMP cíclico), albumina sérica; e ainda 99% de água (FERRARIS e MUÑOS, 2006; MELFI e ALLEY, 2010; CARPENTER, 2013; NANCI, 2013; CALIL e TAMBELO, 2014).

Nucleases também são secretadas na saliva pequenas quantidades, tais como RNAases (ribonuclease) e DNAases (desoxirribonuclease). As proteases vasodilatadoras são a calicreína e a renina. Outras moléculas orgânicas presentes na saliva são o AMP cíclico ligante de proteína, aminoácidos, ureia, ácido úrico, vários lipídios e corticosteroides (FERRARIS e MUÑOS, 2006; CARPENTER, 2013; NANCI, 2013; SANIOTO et al., 2013).

A concentração da maioria dos componentes salivares, principalmente dos íons, depende do estímulo e da velocidade de secreção das glândulas, pois em um aumento na velocidade do fluxo de secreção, como na salivagem estimulada, eleva as concentrações de Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , proteínas (concentração total), ureia, fosfatos e magnésio (Mg^{2+}); enquanto K^+ e flúor (F^-) permanecem inalterados, e as concentrações de fosfato e iodeto diminuem (FERRARIS e MUÑOS, 2006; SANIOTO et al., 2013).

Cerca de 0,2-0,3% dos constituintes totais inorgânicos da saliva, principalmente Na^+ , K^+ , Cl^- e HCO_3^- são os principais contribuintes para a sua osmolaridade. A presença e concentração relativa de íons Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- e também SO_4^{2-} (sulfato), HPO_4^{2-} (hidrogênio fosfato) e H_2PO_4^- (dihidrogênio fosfato) indicam que a saliva não é apenas um ultrafiltrado plasmático. Também se encontram outros íons como cobre (Cu^+), brometo (Br^-), nitrito (NO_2^-) e tiocianato (OCN^-) (MOTOC et al., 2003).

As proteínas secretadas representam a principal categoria de substâncias orgânicas da saliva, na qual incluem-se várias enzimas. As principais enzimas digestivas presentes na saliva são a α -amilase salivar (ptialina) e a lipase lingual. As mucinas (N-

acetil-glicosamina) constituem importante classe de glicoproteínas que na saliva total não estimulada representam cerca de 25-30% das proteínas totais. Deve-se a presença de grupos em cadeias laterais de oligossacarídeos ligados às proteínas em sua composição, como a mucina (proteínas fortemente glicosiladas). Estas glicoproteínas se encontram muito hidratadas e possuem propriedades características como baixa solubilidade, alta viscosidade, elasticidade e adesividade. Além destas, também estão presentes, proteínas antibacterianas (lisozima, lactoferrina, peroxidases, estatinas e cistatinas) e um grupo de proteínas responsáveis, principalmente, pela formação da película do esmalte e pela homeostase do fosfato e cálcio da saliva (PROCTOR e CARPENTER, 1998; FERRARIS e MUÑOS, 2006; SANIOTO et al., 2013; CALIL e TAMBELO, 2014). A maior parte da amilase é secretada pela glândula parótida, sendo que essas proteínas compõem cerca de 30% de todas as proteínas da saliva secretada pela parótida (ADRIENN, 2006).

Embora as secreções das glândulas salivares sejam classificadas como serosa, mucosa ou seromucosa, de acordo com seus conteúdos relativos de glicoproteína ou mucina, as proteínas mais abundantemente secretadas pelas células acinares são proteínas ricas em prolina (PRPs), as quais possuem cerca de um terço de seus aminoácidos representados pela prolina e são secretadas nas formas ácida, básica e glicosilada (SANIOTO et al., 2013; CALIL e TAMBELO, 2014). Além destas, ainda existem as proteínas ricas em histidina (conhecidos como histatinas) e proteínas cisteínas-rich (conhecidos como cistatinas) (CARPENTER, 2013).

Dentre os lipídios, foram citados a presença de triglicerídeos, ácidos graxos livres, fosfatidilcolina, fosfatidiletolamina, frações de fosfatidilserina e fosfatidilinositol (ALAM e ALAM, 1978). Os componentes salivares explicam a sua multifunção.

2.5. Microbiota Fúngica da Cavidade Oral

As leveduras estão presentes em locais diversos no corpo humano como membros da microbiota normal, como no trato gastrointestinal, vagina, região perianal, e a

cavidade oral (WALTIMO et al., 2003a,b). Estes fungos que vivem associados a tecidos animais, desenvolvendo-se harmoniosamente no habitat se causar doenças (ABARCA et al., 1989; CONNOLE et al., 2000; POLLOCK, 2003).

Apesar do gênero *Candida spp.* correr como comensais e constituem uma parte da microbiota oral normal do homem, candidose é a infecção micótica mais comum da cavidade oral humana (BUDTZ-JÓRGENSEN, 1990). Para ocorrer a colonização inicial e a infecção por fungos (persistência), ocorre a adesão das espécies nas superfícies orais do hospedeiro, e na candidose oral, por exemplo, está associada tanto a fatores sistêmicos como a fatores locais, como a diminuição do fluxo salivar e alterações da microbiota bucal (BUDTZ-JÓRGENSEN, 1990; ALLEN, 1992).

Geralmente as leveduras encontradas intraoralmente pertencem a divisão *Ascomycota* e a classe *Endomycetes*, a qual é dividida mais adiante em quatro famílias: *Sccharomycetaceae*, *Endomycetaceae*, *Dipodascaceae* e *Lipomycetaceae*. Na micologia médica, a família mais importante é a família *Sccharomycetaceae* e ao gênero *Candida* (WALTIMO et al., 2003b), principalmente as espécies: *Candida glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. inconspicua*, *C. tropicalis*, *C. Dubliensis* e *C. kefyr* (SIQUEIRA JR. et al., 2002; BELAZI et al., 2004). Vale ressaltar que o Gênero *Candida* compreende mais de 500 espécies (INDEX FUNGORUM, 2008).

Fungos do gênero *Candida spp.* estão presentes principalmente na região posterior do dorso da língua, sendo seu habitat favorito (CANNON et al., 1995). Os fungos presentes na cavidade oral, são geralmente assintomáticos, mas mediante alguma situação adversa, pode causar infecções oportunistas em hospedeiros susceptíveis (SOBEL, 2006), sejam por fatores locais ou sistêmicos (como por exemplo, baixo fluxo salivar, higiene oral precária, próteses mal adaptadas, prótese dentária, quimioterapia para câncer, radioterapia ou AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), com quebra do equilíbrio ecológico, predispondo o aparecimento de infecções por fungos, agora chamados de patológicos (NISENGARD e NEWMAN, 1997; ŞEN, SAFAVI, SPÅNGBERG, 1999). Estas infecções se desenvolverem quando o hospedeiro apresenta as condições ambientais propícias e nutrientes essenciais para o crescimento e reprodução das leveduras (WALTIMO et al., 2003a,b).

Outros fatores permitem que os fungos saprófitos, de baixa patogenicidade, como as leveduras, constituintes da microbiota normal humana e de outros animais, passem a causar danos, originando quadros clínicos diferentes. Entre estes fatores

estão as produções enzimáticas preponderantes para o desenvolvimento da infecção. Proteases, fosfolipases e elastases extracelulares possuem a função de hidrolisar peptídeos, obtendo um papel preponderante para o crescimento e multiplicação do fungo, além de promover a invasão do microrganismo no tecido do hospedeiro colonizado. O potencial de aderência também contribui como facilitador do surgimento do processo infeccioso (LACAZ et al., 2002; MACÍAS et al., 2004), tanto na cavidade oral quanto nas vias respiratória e digestória. Os riscos aumentam se o paciente fizer terapia com antineoplásicos, for neutropênicos, transplantados, sofrer traumas, queimaduras, se estiver com cateterismo, sob ventilação mecânica, dentre outros (CLEFF et al., 2007; GOMPertz et al., 2015).

Ainda vale ressaltar que o gênero *Candida spp.* pode servir de veículo para bactérias, como *Streptococcus mutans* (RAJA, HANNAN, ALI, 2010), contribuindo para aumentar a colonização destas bactérias (BARBIERI et al., 2007), e até promover a desmineralização (NIKAWA et al., 2003), portanto este fungo tem um potencial cariogênico (AL-HEBSHI et al., 2015). Diante disso, a importância das micoses orais tem crescido durante a última década e devem ser consideradas no diagnóstico diferencial de lesões orais (ALMEID e SCULLY, 2002). A maioria dos danos que acometem os tecidos bucais, resultam da resposta inflamatória do próprio hospedeiro, embora dano adicional deva-se as enzimas segregadas pelos fungos (CANNON et al., 1995).

Somado a tudo isso, a cavidade oral apresenta uma microbiota bacteriana concentrada e diversa (TAKARADA et al., 2004), sendo este ecossistema bastante dinâmico (HOLMGREN, CORBET, LIM, 1994). A estimativa varia de 300 a 800 espécies diferentes reconhecidas como componente da microbiota bacteriana normal da cavidade oral humana, as quais também podem provocar infecções nos tecidos orais (SUNDQVIST, 1992; SUNDQVIST, 1994; KAZOR et al., 2003).

No tocante à diminuição do fluxo salivar, traz modificações à microbiota oral, devido a ação imunológica diminuída e à diminuição do efeito tampão da saliva, o que favorece ao desequilíbrio (JORKJEND et al., 2003). É essencial o papel da microbiota oral para a manutenção da homeostasia, saúde bem equilibrada e estável da cavidade bucal, na qual a saliva desempenha um papel fundamental (BARROSO et al., 2015).

2.6. Hipersalivação ou Sialorreia

O acúmulo de saliva na cavidade oral é dito sialorreia ou hipersalivação, sendo um achado frequente em pacientes portadores de vários distúrbios neurológicos, como ocorre, por exemplo, na lesão cerebral (10% e 58% dos pacientes) e na doença de Parkinson (MANRIQUE, 2005a; ZLOTNIK et al., 2015; JOST, 2016). O *clearance salivar* é processo pelo qual a saliva é renovada na cavidade oral por nova secreção e deglutição da saliva total existente, ficando uma saliva residual (SREEBNY, 2000).

A hipersalivação é comumente associada ao prejuízo do controle neuromuscular com disfunção da atividade motora oral e falta de coordenação dos músculos faríngeos (diminuição da habilidade da deglutição da saliva) ou à hipersecreção das glândulas salivares (aumento do fluxo de saliva) ou disfunção sensorial (YANG et al., 2006; WILKEN, ASLAMI, BACKES, 2008; HEFFERNAN e ADIL, 2015). Também pode ocorrer como efeito colateral de medicamentos. Porém, a maioria dos pacientes com sialorreia tem controle neuromuscular oral deficiente (JONGERIUS et al., 2001).

Dessa forma, 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 (MENINGAUD et al., 2006; SILVESTRE-RANGIL et al., 2011; CARDONA, SAINT-MARTIN, DANIEL, 2015), acompanhando várias patologias, no qual o paciente não consegue compensá-la pela deglutição (ROBIN e MEENAKSHI, 2008).

A 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, problemas com o controle de saliva é considerado anormal ou patológica (AUGUSTO e PEREZ, 2006; FAIRHURST e COCKERILL, 2011). Os termos “*drooling*”, babação, hipersialorreia, ptialismo, incontínência salivar, sialose (hipersialose), “*dribbling*” e “*drivelling*” são utilizados como sinônimos para a sialorreia (BHATIA, MÜNCHAU, BROWN, 1999; AUGUSTO e PEREZ, 2006; HORNIBROOK e COCHRANE, 2012).

A sialorreia podem causar um preocupante quadro clínico, principalmente em pacientes com desordens neurológicas, resultando em aspirações salivares silenciosas, conduzindo-o a riscos maiores de infecções pulmonares e maior desconforto (MANRIQUE, 2005a,b; DANIEL e CORDONA, 2014). O risco é ainda maior quando se tratar de um paciente idoso, debilitados, ou aqueles em cuidados crônicos. Dessa forma, justifica-se utilizar a terapêutica mais adequada, prevenindo o indivíduo de entrar numa situação de complicações potencialmente graves, inconvenientes e de desconforto (BOYCE e BAKHEET, 2005).

2.6.1. Etiologia da Sialorreia

Para ocorrer a deglutição normal, é necessária uma sequência altamente complexa de eventos que requer a coordenação de vários grupos musculares da boca e da faringe. Muitas condições, congênitas ou adquiridas, que incluem disfunção neuromuscular relacionado com paralisia cerebral, disfunção sensorial e anormalidades anatômicas (como macroglossia), pode interferir neste mecanismo de normalidade, levando, à deglutição descoordenada (VIJAYASEKARAN et al., 2007).

Desta forma, a hipersalivação é comumente associada ao prejuízo do controle neuromuscular com disfunção da atividade motora oral ou ao aumento do fluxo de saliva (YANG et al., 2006; WILKEN, ASLAMI, BACKES, 2008). Existem duas formas de sialorreia: 1 – a sialorreia relativa, 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 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 sialorreia pode ainda classificada em: sialorreia anterior é quando a saliva escapa pela abertura oral; e sialorreia posterior, quando a saliva se direciona para a faringe (CHAHUÁN et al., 2012).

É uma condição incomum que tem várias causas (NEVILLE et al., 2016). As causas da sialorreia estão agrupadas em 3 categorias: *neuromuscular/disfunção sensorial* (retardo mental, lesão cerebral, doença de Parkinson, paralisia

pseudobulbar e bulbar e acidente vascular encefálico); *hipersecreção*, ou seja, verdadeira hiperprodução de saliva (inflamações, fármacos como tranquilizantes e anticonvulsivantes, neurolépticos, exposição tóxica como ao mercúrio) (CHAHUÁN et al., 2012; DRESSLER, 2013; MIRANDA-RIUS et al., 2015); e *anatômica* (macroglossia, incompetência oral, má oclusão dentária, problemas ortodônticos, defeitos cirúrgicos da cabeça e pescoço) (CHAHUÁN et al., 2012).

Na maioria dos casos, a hipersalivação ou sialorreia quase nunca é causada pela produção excessiva de saliva, ao contrário do que frequentemente se interpreta, mas pela dificuldade, inabilidade ou deficiência de deglutição da mesma (sialorreia relativa) (SILVESTRE-RANGIL et al., 2011; DRESSLER, 2013; MIRANDA-RIUS et al., 2015). Esta condição é conhecida como disfagia, ou seja, dificuldade de condução do conteúdo da cavidade bucal até o estômago (MARCHESAN, 1999). 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 (BENEDICTIS, CARNIELLI, BENEDICTIS, 2009; MENDES et al., 2010). Neste tipo de sialorreia, cinco fatores clínicos que influenciam para o acúmulo de saliva é a posição da cabeça, vedação de lábio, o controle voluntário sobre a língua, tonicidade do pescoço resultando em mau posicionamento cabeça, fase oral da deglutição anormal, reduzida percepção sensorial de saliva e a idade mental do paciente (HEFFERNAN e ADIL, 2015).

O *pool* excessivo de saliva na porção anterior da cavidade bucal e incontinência da mesma, é um achado frequente em doenças neurológicas crônicas (neuropsicomotoras e neurodegenerativas) (MARINA et al., 2008), devido às alterações sensório-motoras causadas pela doença de base, como em 10 a 38% dos pacientes com paralisia ou lesão cerebral (PC ou LC) (JONGERIUS et al., 2004a; KHADIVI et al., 2013); paralisia facial periférica (BARREIRA, 2010); Síndrome de Down (LIMBROCK, HOYER, SCHEYING, 1990); em 75% dos pacientes com Doença de Parkinson (DP) (JANKOVIC, 2009; ZLOTNIK et al., 2015); esclerose lateral amiotrófica (ELA) ou doença do neurônio motor (DNM), retardo do desenvolvimento neuropsicomuscular (RDNMP), *Miastemia Gravis*, Acidente Vascular Encefálico (AVE), encefalopatias crônicas progressivas ou não progressivas (ELLIES et al., 2002a; JONGERIUS et al.,

2004a; ELLIES et al., 2006a; MØLLER et al., 2011); entre outras, sendo um motivo de desconforto significativo para os pacientes afetados (ISAÍAS e DARÍO, 2009; ALTER, 2010). Na esclerose lateral amiotrófica, por exemplo, a sialorreia está presente em cerca de 25% dos casos (YOUNG et al., 2011). Agravando este quadro, contribuem as baixas habilidades cognitivas e mentais de muito destes pacientes (JONGERIUS et al., 2004a; MENINGAUD et al., 2006; MARINA et al., 2008).

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., 2016). Em ratos, a salivação excessiva e perda de peso são sintomas que podem sugerir uma obstrução do trato digestivo, como na estenose de esôfago (CORIA-AVILA et al., 2006).

O excesso de saliva também pode aparecer no carcinoma de cabeça e pescoço (MARCHESE et al., 2008; JANKOVIC, 2009; ALTER, 2010), causada pelo próprio tumor ou disfagia relacionada com o tratamento, ou, ainda, devido à anatomia alterada da ressecção oncológica do trato aerodigestivo superior, especialmente o terço médio da mandíbula (BOMELI et al., 2008). 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., 2016).

Quando ocorre como efeito colateral de medicamentos, resulta de drogas que atuam aumentando a atividade dos receptores específicos da via secretomotora, resultando em hipersecreção (JONGERIUS et al., 2001; AUGUSTO e PEREZ, 2006; AFFONSO e CRUZ, 2013), como o lítio e os agonistas colinérgicos, como pilocarpina (NEVILLE et al., 2016). Em pacientes geriátricos, os medicamentos antipsicóticos, em sua maior parte, induzem a sialorreia (AFFONSO e CRUZ, 2013). O aumento da salivação é decorrente da estimulação direta de receptores muscarínicos M1 e M3 nas glândulas salivares (HENDRICKSON, MAROCCO, GREENBERG, 2004).

O alcoolismo crônico é uma das principais causas da sialoadenite (inflamação glandular), que resulta em um aumento de peso da glândula submandibular, volume, proliferação celular, invasão de células inflamatórias e aumento do fluxo salivar (CORNEJO et al., 2003; CORREIA et al., 2010).

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). A sialorreia também pode ser por hipersalivação idiopática (JANKOVIC, 2009), e a macroglossia pode contribuir para este quadro (MARINA et al., 2008).

2.6.2. Consequências da Sialorreia

O elevado fluxo salivar pode até ser benéfico para prevenção de cáries e higiene oral, mas este fluxo patológico excessivo também pode ser bastante prejudicial (DANIEL e CORDONA, 2014), uma vez o excesso de saliva traz impactos negativos sobre funções psicossociais, educacionais e físicas, sendo um importante problema clínico, social e emocional para crianças e adultos, muitas vezes embaraçoso para os pacientes (HASSIN-BAER et al., 2005; CAPACCIO et al., 2008), devendo ser alvo de atenção e gestão. Todas as consequências justificam o tratamento da sialorreia.

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; WILKEN, ASLAMI, BACKES, 2008; BLOEM et al., 2009); aumento das infecções periorais e orais, maceração da pele, halitose, dificuldade de higiene e riscos de aspiração (ELLIES et al., 2002a; HEINEN, 2008; WILKEN, ASLAMI, BACKES, 2008; HORNIBROOK e COCHRANE, 2012). A maceração da pele pode estar ao redor da boca, queixo e pescoço e podem infectarse secundariamente por bactérias (MARINA et al., 2008; NEVILLE et al., 2016) e por fungos, como *Candida albicans* (MENINGAUD et al., 2006).

A sialorreia ainda pode causar asfixia (BHATIA, MÜNCHAU, BROWN, 1999); desidratação por perda de fluidos, eletrólitos e proteínas (MENINGAUD et al., 2006; YANG et al., 2006); alterações nutricionais (MARINA et al., 2008); dificuldades para falar (MENINGAUD et al., 2006; ALTER, 2010); infecção do trato aéreo superior (ALTER, 2010); afogamento por aspirações recorrentes (ISAÍAS e DARÍO, 2009); e riscos de infecções pulmonares, inclusive pneumonia aspirativa (BHATIA, MÜNCHAU, BROWN, 1999; ELLIES et al., 2002a; WILKEN, ASLAMI, BACKES, 2008; ISAÍAS e DARÍO, 2009; MANRIQUE e SATO, 2009; ALTER, 2010). Aspiração pulmonar crônica

tem considerável morbidade, principalmente pelas recorrentes infecções secundárias do trato respiratório inferior (VIJAYASEKARAN et al., 2007), aumentando significativamente os cuidados com o paciente, com risco de vida (TURK-GONZALES e ODDERSON, 2005).

A constante perda de fluídos através do excesso de saliva pode originar uma urina mais concentrada, além de constipação (obstipação) (HEINEN, 2008). Ocorre 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); limitações de atividades (MØLLER et al., 2011); perdas na função mastigatória (MENINGAUD et al., 2006); além de estresse aos cuidadores (MØLLER 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 mesmos, levando ao isolamento social e depressão do mesmo e de seus familiares, causando impacto na qualidade de vida (ELLIES et al., 2002a; TURK-GONZALES e ODDERSON, 2005; MØLLER et al., 2011). Também é necessário atuar sobre as consequências sociais e a autoestima do indivíduo.

Dessa forma, nota-se que o tratamento da sialorreia é fundamental para melhora do estado geral e da qualidade de vida do paciente (WILKEN, ASLAMI, BACKES, 2008; ARELLANO-SALDAÑA et al., 2014), do ponto de vista físico, psicológico e social (OLIVEIRA FILHO, SILVA, ALMEIDA, 2016), e faz parte do atendimento multidisciplinar desses indivíduos. O grau de envolvimento de cada especialidade vai depender da etiologia e da intensidade da sialorreia, estado de consciência do paciente, estado geral de saúde do indivíduo, dos efeitos secundários causados pela hipersalivação e, infelizmente, da disponibilidade do tratamento.

2.7. Tratamentos para a Sialorreia

Como a sialorreia é causada por mecanismos patológicos diversos, e a existência de muitos tratamentos diferentes, dificultam a gestão clínica dos pacientes

(MIRANDA-RIUS et al., 2015), os quais envolvem uma abordagem multidisciplinar que tem como objetivos trabalhar a fala, postura, consciência oromotora e sensorial (HORNIBROOK e COCHRANE, 2012). Os estados secundários à sialorreia fazem com que o paciente necessite de maior cuidado (SILLANPÄÄ et al., 2015).

Em decorrência da presença de distúrbios e efeitos colaterais, diversos profissionais de saúde são necessários para compor uma equipe multidisciplinar para o tratamento e acompanhamento da sialorreia como o médico, cirurgião-dentista, nutricionista, (MARINA et al., 2008), terapeuta ocupacional (YAM et al., 2006) e fisioterapeuta (KHADIVI et al., 2013).

Algumas causas de sialorreia são transitórias ou leves e não necessitam de tratamentos. Já em pacientes com distúrbios neurológicos se faz necessário pelos riscos de agravo que a mesma oferece ao mesmo. 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.

Os tratamentos convencionais incluem a fonoterapia (CRYSDALE et al., 1985; CRYSDALE et al., 2006); fisioterapia funcional, fisioterapia motora orofacial e terapia de comportamento (AUGUSTO e PEREZ, 2006; FAIRHURST e COCKERILL, 2011; HEFFERNAN e ADIL, 2015); programa de alimentação e/ou estimulação oral (WONG, SUN, WONG, 2001); sucção da saliva (XEREZ, 2008; YOUNG et al., 2011); tratamento cirúrgico (FAIRHURST e COCKERILL, 2011; MONTGOMERY et al., 2016); e o tratamento farmacológico (FAIRHURST e COCKERILL, 2011; MONTGOMERY et al., 2016).

Outros tratamentos menos convencionais incluem a radioterapia das glândulas salivares (CORSO et al., 2011; YOUNG et al., 2011; ASSOULINE et al., 2013); aparelhos ortopédicos intraorais (BLASCO, 2002; 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). Mas nem sempre todas as formas de tratamento estão ao alcance dos pacientes ou são tão eficientes.

As terapias comportamentais não têm sido demonstradas como tão eficiente (HASSIN-BAER et al., 2005). Em terapias de fisioterapia oromotora, o tratamento é

de valor limitado em crianças severamente retardadas. Em relação aos aparelhos ortopédicos, poucos profissionais o utilizam e não existem dados claros de quais pacientes que se beneficiariam de tais dispositivos (AUGUSTO e PEREZ, 2006). Já a terapêutica medicamentosa (terapias farmacológicas sistêmicas) e os procedimentos cirúrgicos são medidas invasivas e estressantes para o paciente, e muitas vezes associados à efeitos secundários indesejáveis (ELLIES et al., 1999; HASSIN-BAER et al., 2005; ALTER, 2010).

As substâncias farmacêuticas anticolinérgicas mais utilizadas são a atropina, benzotropina, escopolamina, cloridrato benzexol e glicopirrolato, são opções de tratamento, reduzindo o volume de saliva na cavidade oral, inibindo a produção de saliva obtendo resultados positivos (AUGUSTO e PEREZ, 2006; ELLIES et al., 2006a; COSKUM et al., 2007; REDDIHOUGH, REID, PLOVER, 2011; HORNIBROOK e COCHRANE, 2012). Também foram citadas outras drogas, tais como β -bloqueadores, agentes antirrefluxo (TSCHENG, 2002); drogas antiparkinson para pacientes com parkinsonismo (MANRIQUE, 2005b); adesivos transdérmicos de escopolamina; antidepressivos tricíclicos para a redução da secreção aquosa e mucolíticos (DRESSLER, 2013). Entretanto, a administração dos mesmos é limitada por apresentarem um número significativo de efeitos colaterais provenientes da absorção sistêmica (BLASCO, 2002; MENINGAUD et al., 2006).

O uso de anticolinérgicos traz muitos efeitos colaterais sistêmicos, como boca seca, visão turva e retenção urinária (ELLIES et al., 2002b; TRUONG e BHIDAYASIRI, 2008; 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). Em alguns

casos, uma melhoria significativa da função salivar não tem sido observada após a administração de drogas para tratar a sialorreia (MIRANDA-RIUS et al., 2015).

Em relação aos tratamentos cirúrgicos realizados, os mais conhecidos são a ablação ou excisão das glândulas salivares, a neurectomia timpânica (desnervação ou denervação ou desnervação parassimpática), a transposição ou retroposicionamento de ductos excretores e a ligadura dos ductos excretores (ELLIES et al., 2002a; MANRIQUE, BRASIL, RAMOS, 2007; FAIRHURST e COCKERILL, 2011; SAGAR et al., 2016). Entretanto, tais procedimentos cirúrgicos são muito invasivos e estressantes para o paciente, com relato de complicações, além do aumento da cárie dental, afecções gengivais, parotidite, cistos, fístulas pós-operatórias (ELLIES et al., 2002b; SAVARESE et al., 2004), rânulas (SAGAR et al., 2016), além de existir o risco relacionado à anestesia geral (SAVARESE et al., 2004). O tratamento cirúrgico não é adequado para estados de hipersalivação temporários, por ser irreversível, devido as suas consequências permanentes (ELLIES et al., 1999; ELLIES et al., 2006a). As técnicas medicamentosas sistêmicas e cirúrgicas geram angústia para o paciente (procedimentos invasivos, com riscos e efeitos colaterais sistêmicos) (ELLIES et al., 2000; HEINEN, 2008).

O tratamento com radiação é eficiente desde que aplicada com os devidos cuidados e doses (ASSOULINE et al., 2013; SLADE e STANIC, 2015), não há relatos de problema de pele (BORG e HIRST, 1998). A exposição das glândulas salivares à radiação ionizante provoca uma hipofunção salivar (CHOI et al., 2009), sendo a xerostomia (redução do fluxo salivar) um dos efeitos colaterais conhecidos (AUGUSTO e PEREZ, 2006; LOPES et al., 2008), além de relatos de dores na mandíbula (WEIKAMP et al., 2016). Também pode induzir malignidade, mucosite e retardo de crescimento em crianças, não sendo indicado para as mesmas (TRUONG e BHIDAYASIRI, 2008).

Pesquisas clínicas apontam que o uso da toxina botulínica tipo A (BTX-A) em injeções percutâneas intraglandulares nas parótidas e submandibulares são eficazes e leva à diminuição da sialorreia, mantendo, dentre outros parâmetros, a boa saúde oral (ÇİFTÇİ et al., 2013; VASHISHTA et al., 2013; ALVARENGA et al., 2016). Estudos randomizados com crianças portadoras de PC e ELA, e utilizando a BTX-B também alcançaram bons resultados (COSTA et al., 2008; BASCIANI et al., 2011).

A prática atual é a prescrição de medicamentos como o tratamento de primeira linha, no entanto, profissionais consideraram que a toxina botulínica é mais eficaz e tem menos efeitos colaterais (CHALÉAT-VALAYER et al., 2016). O tratamento com BTX-A deve ser considerada como o tratamento inicial para sialorreia, antes de procedimentos cirúrgicos invasivos (ÇIFTÇI et al., 2013; MAHADEVAN et al., 2016). As indicações para tratamentos mais invasivos, só devem existir em casos de: persistência da salivação após 6 meses de tratamento sem sucesso; quando for considerada de nível moderado ou severo; ou então para pacientes cuja função cognitiva impede a sua participação em terapias funcionais (AUGUSTO e PEREZ, 2006).

De qualquer forma, indica-se a presença de uma equipe interdisciplinar composta por membros da área da saúde (pediatra, neurologista, otorrinolaringologista, cirurgião-dentista, cirurgião plástico, psicólogo clínico, fonoaudiólogo, fisioterapeuta, terapeuta ocupacional, enfermeiros, professores de educação especial, e uma assistente social médica) e de biotecnologia, para avaliar cada paciente individualmente, selecionar o paciente adequado para o tratamento específico (WONG, SUN, WONG, 2001) e escolher o tratamento mais seguro e adequado.

2.8. Toxina Botulínica

As toxinas bacterianas são estratégias evolutivas que estes microrganismos desenvolveram para sobreviver e muitas delas desempenham um papel importante na patogênese de doenças infecciosas em animais (BALFANZ, RAUTENBERG, ULLMANN, 1996). Historicamente, há mais de 100 anos, a toxina botulínica esteve associada apenas à paralisia muscular secundária à intoxicação alimentar, absorvidas pelo trato intestinal, ou por ferida infectada, sendo transportadas através do sistema linfático e sangue até as terminações nervosas, produzindo uma doença neurológica com risco de vida, o “*botulismo*”, caracterizada por uma grave paralisia muscular generalizada e bloqueio autonômico colinérgico (MIDURA, 1996; INTISO, 2012),

O botulismo é uma intoxicação devido à ingestão da toxina neurotóxica pré-formada em alimentos contaminados por bactérias do gênero *Clostridium* (botulismo alimentar). Também existe o botulismo infantil, que ocorre em criança de baixa idade

(menos de um ano de vida), cuja microbiota intestinal ainda não está totalmente madura, propiciando condições ideais para o desenvolvimento destas bactérias produtoras da toxina botulínica. Estas doenças têm como características a fraqueza e/ou paralisia muscular flácida descendente, que em geral inicia pelos músculos inervados pelos nervos cranianos, seguindo pelos músculos do pescoço, membros superiores, diafragma e membros inferiores. Distúrbios autônomos podem preceder a estes sinais clínicos (POULAIN e HUMEAU, 2003).

Apesar da toxina botulínica ter vitimado muitos indivíduos após um surto da doença botulismo (linguiça, do latim *botulus*) no final do século XVIII, as investigações só começaram posteriormente por Justinus Kerner em 1817 na Alemanha, descrevendo como causa uma toxina atribuída à linguiça, ou seja, uma doença causada por envenenamento de origem animal. Posteriormente, Muller, em 1870, denomina a doença de *botulismo*. Só em 1879, que o professor e pesquisador belga Emille Pierre van Ermengem, atribuiu a sua produção à esporos de um bacilo anaeróbio, denominando-o de *Bacillus botulinus* (VAN ERMENGEM, 1879; CARRUTHERS, 2002; BACHUR et al., 2009; COLHADO, BOEING, ORTEGA, 2009). Mais de meio século após, é que a bactéria foi descrita (CARRUTHERS, 2002). E por volta de 1949, foi visto que a toxina agia na junção neuromuscular (DÍA et al., 2014).

A toxina botulínica teve seu uso consolidado na década de 90, quando se torna uma alternativa de tratamento reconhecido para a espasticidade (CORTÉS-MONROY e SOZA, 2014). Foi a primeira toxina biológica licenciada para o tratamento de doenças humanas (DHAKED et al., 2010). Deste então, tem sido aproveitada clínica e terapeuticamente para uma série de contextos patológicos e estéticos (SIM, 2011). Ganhou um grande interesse na especialidade de dermatologia cosmética, por seus efeitos sobre as linhas faciais hiperkinéticas (WOLLINA, 2008). Em seguida, seu uso se estendeu para transtornos autonômicos, assimetria facial e tem sido estudado seu efeito analgésico na dor neuropática (CORTÉS-MONROY e SOZA, 2014). As aplicações da toxina botulínica podem ser divididas em: uso cosmético e não cosmético (WALKER e DAYAN, 2014). O uso terapêutico da toxina botulínica tem se expandido consideravelmente, sendo utilizada em várias especialidades médicas. 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).

A toxina botulínica é uma proteína, produzida como produto do metabolismo fermentativo do *Clostridium botulinum* (descrita por Prevot, 1953), uma bactéria gram-positiva anaeróbia, presente na água, na terra, e em alimentos industrializados enlatados (PREVOT, 1953; MELLING, HAMBLETON, SHONE, 1988; POULAIN, POPOFF, MOLGO, 2008; WHO, 2013). Esta espécie de bactéria abrange metabolicamente diversos organismos, e quatro grupos fenotípicos distintos são reconhecidos dentro deste táxon (designado grupos I-IV, quatro linhagens filogeneticamente distintas dentro da espécie) (COLLINS e EAST, 1998). Outras espécies de bactérias também produzem a toxina botulínica, como as *Clostridium butyricum*, *Clostridium argentinense* e *Clostridium baratii* (POULAIN, POPOFF, MOLGO, 2008; COLHADO, BOEING, ORTEGA, 2009).

As toxinas produzidas pela *Clostridium botulinum*, são exotoxinas, com vários tipos sorológicos de toxina, chamados de toxinas A, B, C1, D, E, F e G, abreviadas pelas sigas *BTX*, *TxB*, *TX*, *TB* ou *BoNT*, seguindo da letra que representa cada sorotipo (de *BTX-A* a *BTX-G*) (POULAIN, POPOFF, MOLGO, 2008; COLHADO, BOEING, ORTEGA, 2009; SPOSITO, 2009). Existem ainda alguns autores que citam um oitavo sorotipo, o C2 (BHAYANI e SUSKIND, 2008). Dos oito sorotipos diferentes, sete são consideradas neurotoxinas (POULAIN, POPOFF, MOLGO, 2008; COLHADO, BOEING, ORTEGA, 2009), pois alguns autores não consideram o tipo C2 como uma neurotoxina (SETLER, 2002). E sabe-se que existe dois subtipos da toxina botulínica tipo A (*BTX-A*), o subtipo 1 (*BTX-A1*) e subtipo 2 (*BTX-A2*), diferindo imunologicamente e biologicamente (PIER et al., 2011; MUKAI et al., 2014).

A toxina é sintetizada 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, 2009; DÍA et al., 2014). 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 (AOKI e GUYER, 2001; CARRUTHERS e CARRUTHERS, 2004; COBO et al., 2009). As toxinas do tipo E e F, possuem uma ação curta (CARRUTHERS, 2002). Estudos epidemiológicos anteriores, sobre a doença botulismo, sugeriram que o sistema nervoso humano é suscetível a cinco sorotipos de toxina (A, B, E, F e G) e resistente a dois (C e D) (COFFIELD et al., 1997). Um estudo antigo com toxina

botulínica tipo D, verificou bloqueio da transmissão neuromuscular em rãs (HARRIS e MILEDI, 1971).

A toxina botulínica é considerada a neurotoxina mais letal que existe (JOHNSON e BRADSHAW, 2001; BACHUR et al., 2009), com sua dose letal mediana (DL_{50}) de aproximadamente 0,4 a 1 ng/kg de peso corporal (dependendo da espécie animal considerada), sendo 10 milhões de vezes mais tóxico do que o cianeto (GILL, 1982; ZHANG e VARNUM, 2012). Purificada, 10 a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ é o suficiente para levar a óbito um camundongo (GILL, 1982). Um único grama da toxina cristalina, uniformemente dispersa e inalada, pode matar mais de um milhão de pessoas (DHAKED et al., 2010). Por conta disso, esta toxina pode ter utilizada com um possível agente de armas bioterroristas (POULAIN e HUMEAU, 2003; POULAIN, POPOFF, MOLGO, 2008; INTISO, 2012). Mas esta toxina torna-se segura quando utilizada dentro das doses recomendadas para as indicações clínicas (BACHUR et al., 2009).

Tornou-se foco de interesse para fins terapêuticos na década de 1920, mas somente na década de 50 que o primeiro lote de toxina botulínica cristalizada foi produzido (CARRUTHERS e CARRUTHERS, 2005a). Desde a década de 70, quando houve a introdução da toxina botulínica como uma ferramenta terapêutica, seu uso aumentou exponencialmente (ZALVAN et al., 2004), para fins estéticos e médicos (YOUNIS et al., 2013). Foi a primeira toxina bacteriana utilizada como um medicamento, tornando-se uma biodroga importante. Existem poucas moléculas que podem rivalizar com a toxina botulínica, no sentido de sua ampla aplicabilidade clínica (RAVICHANDRAN et al., 2006). A descoberta do uso clínico da toxina botulínica pode definir um marco na terapia médica, aproximando-se, inclusive, daqueles marcos do arsenal terapêutico, quando da descoberta e utilização de antibióticos e anestesia (TRUONG, STENNER, REICHEL, 2009), e deste então, tem-se estudado o seu potencial terapêutico (BACHUR et al., 2009).

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* (NIH) inclui a BTX-A na lista dos medicamentos seguros e eficientes (SPOSITO, 2004).

Em 1997, a formulação da toxina botulínica tornou-se familiar (CARRUTHERS e CARRUTHERS, 2005a; BHAYANI e SUSKIND, 2008). Inicialmente o sorotipo A da toxina botulínica 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, 2005a). Ao longo de um período de menos 100 anos, a neurotoxina botulínica evoluiu de um veneno para uma ferramenta clínica versátil com uma crescente variedade de usos (MARCHESE et al., 2008; BACHUR et al., 2009). Tem como vantagens seus efeitos serem transitórios, não destrutivos, dependente da dose e aplicação local, com o mínimo de efeitos secundários (MARCHESE et al., 2008).

A toxina botulínica utilizada terapeuticamente é um agente biológico obtido laboratorialmente, sendo uma substância cristalina estável, liofilizada, associada à albumina humana ou gelatina de origem bovina, e utilizada após diluição em solução salina (PROSIGNE[®], 2013 [Bula]; BOTOX[®], 2015 [Bula]). É uma droga que age na inibição da liberação de acetilcolina (ACh) na fenda pré-sináptica da junção neuromuscular (JNM) (agente anticolinérgico), promovem bloqueio pré-sináptico temporário de terminais nervosos colinérgicos, causando uma paralisia flácida e por isso também são denominadas de neurotoxinas (ALTER, 2010). Este bloqueio na junção neuromuscular, funciona como uma desnervação química (parassimpatectomia química ou neurólise química) do órgão-alvo da aplicação. É importante ter em mente que a quimiodesnervação é temporária, e que a toxina deve ser injetada próximo ao nervo que inerva e controla o órgão-alvo (AOKI, 2001).

A toxina não age apenas na junção neuromuscular, mas também em outros tecidos (WALKER e DAYAN, 2014), como, por exemplo, na junção neuroglandular (JNG) e produz uma redução do fluxo salivar, por diminuir a estimulação das células glandulares acinares (ELLIES et al., 2002b; TEYMOORTASH et al., 2007; ALTER, 2010; DRESSLER, 2013). No tecido muscular liso, foi descrito que BTX-A impede a exocitose de acetilcolina e noradrenalina, nos músculos da bexiga e da uretra, respectivamente (SMITH et al., 2003). O sorotipo B age de forma parecida. No entanto, a BTX-B tem uso mais restrito, sendo mais utilizada para algumas indicações especiais, como em casos que o paciente cria anticorpos contra a BTX-A (DRESSLER e ELEOPRA, 2006).

Embora os distintos sorotipos da toxina botulínica possuam estrutura, funcionamento (mecanismos de ação) e biossíntese semelhantes, estes parentes farmacológicos possuem ligações específicas nos terminais nervosos, diferentes sítios enzimáticos intracelulares (diferentes alvos de proteínas intracelulares), diferentes tamanhos do complexo de neurotoxina, diferentes durações de efeito, diferentes potências e diferentes sensibilidades para as diversas espécies de animais. Desta forma, cada sorotipo é uma única entidade farmacológica própria, por vezes devido a distintos processos de purificação e de fabricação (AOKI e GUYER, 2001; CALLAWAY, AREZZO, GRETHLEIN, 2002; POULAIN e HUMEAU, 2003; CARRUTHERS e CARRUTHERS, 2004; JONGERIUS et al., 2004b).

Atualmente, existem no mercado internacional, diferentes preparações comerciais de toxina botulínica do tipo A: *Botox*[®]/*Botox Cosmetic*[®]/*Onabotulinum toxin A* (Allergan Pharmaceuticals, Inc., Irvine, CA, USA); *Dysport*[®]/*Reloxin*[®]/*Azzalure*[®]/*Abobotulinum toxin A* (Speywood Pharmaceuticals Ltd., e Beaufour Ipsen Ltd, Maidenhead, United Kingdom); *Prosigne*[®]/*CBTX-A/Lantox*[®] (Lanzou Institute of Biological Products, Gansu, China); *Xeomin*[®]/*Bocoture*[®]/*Incobotulinum toxin A* (Mertz Pharmaceuticals GmbH, Frankfurt, Germany); *PurTox*[®] (Mentor Worldwide LLC, Santa Barbara, California); *Neuronox*[®] (Medy-Tox Inc., South Korea); e *CNBTX-A* (Nanfeng Medical Science and Technology Development Co. Ltd., China). Todas são produtos biológicos, com diferentes formulações, potências e dosagens. Do sorotipo B existe apenas a marca *MyoBloc*[®]/*NeuroBloc*[®]/*Rimabotulinum toxin B* (Solstice Neurosciences, San Francisco, CA, USA) (BHAYANI e SUSKIND, 2008; SIMPSON et al., 2008; LEBEDA et al., 2010; WALKER e DAYAN, 2014; DANIEL, 2015).

A marca *Prosigne*[®] é uma formulação de origem chinesa, produzida por empresa farmacêutica estatal *Lanzhou Institute of Biological Products* – LIBP, que extrai a toxina a partir da toxina bruta da cultura de cepas Hall de *Clostridium botulinum*, cultivada em um meio contendo tripsina, caseína e extrato de levedura. Em cada frasco de *Prosigne*[®] de 50 ou 100 U (UI) temos 5 mg de gelatina, 25 mg de sacarose e 25 mg de dextrana. No processo de purificação da BTX-A, uma quantidade estéril filtrada de 0,2 microns de toxina obtida é e liofilizada para comercialização (CRISTÁLIA, 2006; SPOSITO, 2010; PROSIGNE[®], 2013 [Bula]). Uma U da *Prosigne*[®], equivale, aproximadamente, cerca de 3 a 4 U da *Dysport*[®], e também, à 1 U do *Botox*[®] (SHAN et al., 2013).

O produto da marca *Prosigne*[®], consiste em um complexo cristalino consistindo de toxina ativa de alto peso molecular e uma hemaglutinina associada, com o diferencial de utilizar como estabilizador na liofilização, a gelatina de origem bovina, ao invés da albumina humana, prometendo alta pureza e baixa toxicidade. A gelatina utilizada 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; 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). Está relacionado com uma possível maior toxicidade (TANG e WAN, 2000).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) liberou a BTX-A da marca *Prosigne*[®] em 2003 para uso clínico (ANVISA, 2003). Além do mais, a marca *Prosigne*[®] tem um custo menor que a marca considerada padrão ouro, o *Botox*[®], o que é interessante sob o ponto de vista da “farmacoeconômico”, especialmente nos países em desenvolvimento (TANG e WAN, 2000; WU et al., 2011), embora, atualmente essa diferença de custos já tenha diminuído significativamente. Os estudos de Quagliato, Carelli, Viana (2010) e Wu et al. (2011), compararam a BTX-A da marca *Botox*[®], com a de origem chinesa (*Prosigne*[®]), usadas para blefaroespasmos e espasmo hemifacial, e concluíram que os resultados de ambas são parecidos e eficientes. A formulação americana é a mais antiga, servindo de base de comparação para as novas formulações que surgem no mercado farmacêutico, devido a seu perfil de segurança e sua eficácia.

2.8.1. Estrutura Química da Toxina Botulínica Tipo A

As toxinas produzidas por várias estirpes da bactéria *Clostridium botulinum* são uma mistura de proteínas contendo a toxina botulínica e várias proteínas não-tóxicas (proteínas hemaglutinina e não-hemaglutinina), formando um verdadeiro complexo proteico (SPOSITO, 2004; ZHANG e VARNUM, 2012), de elevado peso molecular, consistindo na somatória da neurotoxina propriamente dita, mais proteínas não-tóxicas adicionais, que funcionam para proteger a molécula de toxina (CALLAWAY, AREZZO, GRETHLEIN, 2002).

Algumas das proteínas não tóxicas que formam os complexos moleculares com a BTX, são as hemaglutininas (HA) e não-hemaglutinina (NTNH), conhecidas como proteínas de associação à neurotoxina (PANs), cuja função é ajudar na estabilização da neurotoxina e na proteção contra a degradação do ambiente hostil do trato gastrointestinal de mamíferos durante a invasão bacteriana do hospedeiro (VOLLAND et al., 2008; CHEN, 2012; DÍA et al., 2014).

O tipo e número de proteínas não-tóxicas, são determinados pelo subtipo de bactéria sintetizadora. Os complexos moleculares proteicos produzidos (toxina mais proteína não-tóxica), chamados de toxinas progenitoras ou complexo proteína-toxina, possuem massa molecular que oscilam entre aproximadamente 300 KiloDalton (kDa) e 900 kDa, dependendo da toxina e o correspondente tipo de associação (VOLLAND et al., 2008; DÍA et al., 2014).

O peso molecular é um fator importante para determinar a difusão da toxina no tecido alvo, assim como vai ajudar na intensidade de sua toxicidade. As proteínas não-tóxicas, têm a função de proteger a neurotoxina do efeito do meio ácido e proteases através do trato gastrointestinal, pois são estáveis em pH ligeiramente ácido e dissociam em soluções alcalinas (CALLAWAY, AREZZO, GRETHLEIN, 2002; VOLLAND et al., 2008; DÍA et al., 2014). A importância clínica são disputadas por determinadas variáveis, incluindo a composição de proteínas e tamanho molecular, bem como a metodologia de aplicação da droga, como o volume, dose, o método de injeção. Embora, mais recentemente, alguns autores tenham afirmado que nem o peso molecular, nem a presença de proteínas complexantes parecem afetar a difusão (BRODSKY, SWOPE, GRIMES, 2012). A diluição da toxina liofilizada pode influenciar na sua difusão dentro do tecido alvo, aumentando o raio de difusão a medida que a diluição em solução salina 0,9% (soro fisiológico) também aumenta (AOKI, 2001).

Cada complexo molecular proteico de toxina progenitora, consiste de uma neurotoxina de 150 kDa (composto de uma cadeia leve de 50 kDa e uma pesada de 100 kDa), que está ligada de forma não covalente às proteínas não-toxinas. O complexo proteína-toxina existe em três formas: complexo H ou M (300 kDa), complexo G ou L (500 kDa) e complexo LL (900 kDa), isolados a partir da formação da toxina botulínica tipo A. Os complexos de BTX-B, BTX-C e BTX-D têm duas formas (H e L), e os complexos de BTX-F e BTX-G ocorrem nas formas H e L, respectivamente. A neurotoxina isolada é nomeada de forma S (150 kDa), e para afetar suas ações nas células alvos,

estes complexos devem se dissociar, liberando-a (libertação eficiente da neurotoxina) (SPOSITO, 2004; VOLLAND et al., 2008; CHEN, 2012).

A neurotoxina botulínica consiste em um polipeptídeo de cadeia dupla, com uma cadeia pesada e uma cadeia leve unidas por uma ligação covalente dissulfídica (S-S), protease-sensível, e por ligações não covalentes, com massa molecular de aproximadamente 150kD. A estrutura cristalina da molécula é distinguida por três sequência peptídicas, que representam a cadeia leve (L de *light* ou N-terminal de 50kD, LC ou LC_{TX}) e a cadeia pesada (H de *heavy* ou C-terminal de 100kD, HC ou HC_{TX}), sendo ativada quando a cadeia polipeptídica é proteoliticamente quebrada nas cadeias pesada e leve (SPOSITO, 2004; CHEN, 2012; ZHANG e VARNUM, 2012).

A cadeia pesada (H ou HC) é responsável pela ligação da molécula ao terminal simpático, e é dividida em um domínio de translocação N-terminal de 50 kDa (Hn ou HNT, porção amino-terminal da cadeia pesada) e um domínio de ligação do receptor C-terminal de 50 kDa (Hc ou HCR, a porção carboxilo-terminal da cadeia pesada). A porção carboxilo-terminal da cadeia pesada, por sua vez, contém dois subdomínios 25 kDa cada (HCN e CHC). Já a cadeia leve (L ou LC) desempenha ação bloqueadora da acetilcolina, pois a mesma atua como uma enzima (protease), que quebra uma das proteínas de fusão da vesícula de acetilcolina à membrana pré-sináptica no terminal nervoso (SPOSITO, 2004; RAVICHANDRAN et al., 2006; ZHANG e VARNUM, 2012). A última fase da ação da neurotoxina, envolve a modificação de um substrato alvo intracelular (no terminal do axônio, botão sináptico), que regula a ancoragem e fusão das vesículas de acetilcolina (CALLAWAY, AREZZO, GRETHLEIN, 2002).

A cadeia peptídica de 150 kDa da toxina botulínica tem pouca atividade biológica. Só quando esta cadeia é clivada por proteases clostridiais, nas cadeias leve e pesada, a toxina passa a apresentar atividade biológica (CHEN, 2012). Cada sorotipo pode diferir pela sequência de aminoácidos em sua cadeia proteica, numa porcentagem que varia de 0,9 a 36%. Desta forma, tem-se alvos proteicos intracelulares e potências toxicológicas distintos. Isso permitiu dividir os sorotipos em quatro grupos, assim organizados: grupo I com os sorotipos A, B e F; grupo II com os tipos B, E e F; grupo III com as toxinas C e D; e grupo IV com o tipo G (WHITEMARSH et al., 2013).

Esta proteína neurotóxica, quando complexada com as proteínas não-tóxicas, possui a característica físico-química de estabilidade em meio ácido (pH 3,5 a 6,5), porém se dissociam em condições alcalinas, tendo sua atividade biológica inativada.

A toxina botulínica não suporta temperaturas altas, acima de 80-100°C, embora seus esporos sejam resistentes ao calor. Com base nestes fenômenos, a toxina pode ser separada do complexo proteína-toxina e ser purificada por cromatografia de permuta iônica (MIDURA, 1996; SHANNON, BORRON, HURNS, 2007).

2.8.2. Mecanismo de Ação da Toxina Botulínica Tipo A

Para que ocorra a exocitose da acetilcolina, existe uma cadeia de transporte das vesículas sinápticas contendo este neurotransmissor nos terminais nervosos (o sinaptossoma). Posteriormente ocorre a fusão da membrana da vesícula com a membrana do terminal nervoso, sendo mediada proteínas do complexo SNARE associado à membrana vesicular pré-sináptica (WOLLINA, 2008; MOSSERI et al., 2016).

Em condições normais para a liberação da acetilcolina nas fendas sinápticas, as vesículas contendo este neurotransmissor liga-se à membrana plasmática (celular) do termina nervoso (dendritos dos axônios) através de complexos proteicos, denominadas proteínas SNAREs (*Solubre N-ethyl-maleimide Sensitive Factor [NSF] Attachment Protein Receptor* / receptor anexo NSF solúvel), que desempenham papel central na especificidade do tráfego vesicular e no processo de fusão de vesículas secretórias (vesícula sináptica) com a membrana plasmática pré-sináptica ou neurolema. Muitas vesículas transportadoras só se formam se um tipo específico de proteína SNARE estiverem acopladas à sua membrana, permitindo assim que a vesícula se funda corretamente. As SNAREs podem ser de dois tipos: v-SNARE (*vesicle-SNARE*, presente na vesícula sináptica, como por exemplo, a proteína sinaptobrevina), t-SNARE (*target SNARE*, presente presentes na face citosólica da membrana pré-sináptica, como por exemplo, as proteínas SNAP-25 e sintaxina). A v-SNARE está incluída da membrana da vesícula secretória, enquanto que a t-SNARE está membrana plasmática alvo. A NSF (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor* / fator solúvel sensível à N-etilmalamida) é proteína de fusão sensível à N-etilmalamida, que se anexa ao complexo proteico receptor, uma espécie de chaperona solúvel no citoplasma, que pode agir, com a ajuda de proteínas adaptadoras, na separação de complexos v-t-SNARE de qualquer membrana (ZALVAN et al., 2004; ALTER, 2010).

As proteínas da família SNAREs mais conhecidas são: VAMP (*vesicle-associated membrane protein* / proteína de membrana transportadora de vesículas), como por exemplo, a sinaptobrevina; a SNAP-25 (proteína associada a sinaptossomas de 25 kDa); e a proteína syntaxina. São proteínas associadas às membranas das vesículas sinápticas ou à membrana plasmática, projetadas para o lado intracelular (citossólico), essenciais para a liberação de acetilcolina e neurotransmissão, pois são responsáveis pela fusão de vesículas sinápticas de acetilcolina com a membrana pré-sináptica, ou seja, são componentes essenciais desta maquinaria de exocitose. Quando uma vesícula sináptica ganha o sítio de fusão, uma VAMP se associa a uma SNAP-25 e a uma syntaxina da membrana plasmática pré-sináptica, formam um complexo ternário que aproxima a vesícula sináptica da membrana plasmática, as quais terminam por se fundir quando os íons cálcio se ligam a sinaptotagmina (ST) (AOKI e GUYER, 2001; ZALVAN et al., 2004; ALTER, 2010; DÍA et al., 2014; MOSSERI et al., 2016).

Quando a BTX-A é injetada na glândula, a droga entra na terminação nervosa por endocitose (WOLLINA, 2008). O domínio carbóximo-terminal da cadeia pesada (domínio HCR) da toxina liga-se às glicoproteínas (proteína transmembrana e gangliosídeo, receptores chamados SV2 [isoformas A, B e C da sinaptotagmina ou ST]) encontradas especificamente na membrana pré-sináptica da parte não mielinizada de terminais nervosos colinérgicos (é razão da elevada seletividade da toxina botulínica), de maneira irreversível, mecanismo conhecido como “dupla do receptor” (dois subdomínios que correspondem às duas classes de moléculas) (RAVICHANDRAN et al., 2006; COBO et al., 2009; COLHADO, BOEING, ORTEGA, 2009; ZHANG e VARNUM, 2012). A sinaptotagmina (ST) realiza a transdução da entrada de íons cálcio na terminação nervosa, promovendo a fusão das vesículas sinápticas com a membrana pré-sináptica. Nesta fusão, o domínio intravesicular da ST fica exposto na superfície do neurônio, sendo reconhecido pelo domínio HCR da BTX-A (D'ALMEIDA, 2004). A internalização é evidenciada após 20 minutos, tornando-se máxima após 90 minutos (GÖSCHEL et al., 1997), através do processo de endocitose (via endocítica ou endocitótica/lisossômica ou lisossomal) do complexo receptor-toxina específico, mediado por receptor, com afinidade elevada para um determinado sorotipo (BRIN, 1997; EDGAR, 2001).

Quando ocorre a reciclagem das vesículas sinápticas, e os receptores sofrem endocitose juntamente com a neurotoxina, a toxina fica localizada dentro de um compartimento intracelular, mas ainda inativa. Para promover o bloqueio da fusão da vesícula sináptica com a membrana plasmática, a cadeia leve (propriedade catalítica) da toxina deve sair do interior da vesícula de endocitose e alcançar o citosol do terminal nervoso (POULAIN e HUMEAU, 2003). Para permitir a redução da ligação dissulfídica e saída ou translocação da cadeia leve, o pH no interior da vesícula de endocitose torna-se ácido, e a toxina botulínica sofre um rearranjo molecular, onde o domínio de translocação (HNT) modifica-se para permitir o transporte da cadeia leve através da membrana da vesícula para o citosol (EDGAR, 2001; BACHUR et al., 2009; ZHANG e VARNUM, 2012).

A cadeia leve da toxina botulínica apresenta a sequência "His-Glu-XX-His" que caracteriza uma porção catalítica metalo-endopeptidase ou metaloproteinases (protease dependente de zinco), que cliva ligações peptídicas (clivagem proteolítica, proteólise) de alguma proteína específica de ancoragem da vesícula sináptica colinérgica à membrana celular do terminal nervoso pré-sináptico, não permitindo mais as fusões das membranas e a liberação da acetilcolina (inibe a ancoragem de vesículas à membrana pré-sináptica) (BLITZER e SULICA, 2001; ELLIES et al., 2003; POULAIN e HUMEAU, 2003; RAVICHANDRAN et al., 2006; WOLLINA, 2008; WALKER e DAYAN, 2014; MOSSERI et al., 2016). O impulso nervoso chega até a terminação nervosa, mas não é transferido para a célula seguinte. A síntese e armazenamento de ACh pelo neurônio continuam intactos (D'ALMEIDA, 2004).

Todos os sorotipos de neurotoxina botulínica interferem com exocitose da ACh nos neurônios motores, mas agem em diferentes alvos intracelulares, sendo absolutamente específicas para clivagem de apenas uma ligação peptídica dentro de um determinado substrato proteico. A BTX-A e BTX-E tem como alvo a proteína SNAP-25. As BTX-B, BTX-D, BTX-F e BTX-G, clivam a VAMP/Sinaptobrevina. A BTX-C cliva tanto a SNAP-25 quanto a syntaxina. Ou seja, a toxina botulínica ataca distintamente as VAMP1s ou SNAP-25 ou syntaxina (AOKI e GUYER, 2001; EDGAR, 2001; POULAIN e HUMEAU, 2003; MOSSERI et al., 2016).

Em síntese, a sequência da ação da toxina botulínica inclui quatro etapas após a difusão no espaço intersticial: a – ligação específica pela cadeia pesada à receptores na membrana pré-sináptica dos nervos colinérgicos (nas terminações nervosas

motoras), conhecido como neurotropismo; b – endocitose, que é 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 ACh com a membrana pré-sináptica, que é a toxicidade intracelular (TURTON, CHADDOCK, ACHARYA, 2002; COLHADO, BOEING, ORTEGA, 2009). Além da ACh, também bloqueia a liberação de mediadores químicos da dor, como glutamato e a substância P em fibras tipo C nociceptivas, aumentando sua utilização clínica (ZALVAN et al., 2004).

Uma recente revisão de literatura juntou evidências da ação da toxina botulínica tipo A não apenas sobre a SNAP-25, e conseqüentemente sobre a neuroexocitose, mas também sobre outros efeitos farmacológicos da droga, atuando sobre a via do ácido araquidônico (presente nos fosfolipídios de membrana plasmática, que pode gerar diversos metabólitos biologicamente ativos, como os eicosanoides e depois as prostaglandinas), neuritogênese (emissão de neuritos a partir do corpo celular do neurônio), ciclo celular e apoptose (atividade pró-apoptóticas e antitumoral), além da expressão gênica, envolvidos em vias inflamatórias, degradação proteossomal, doença de Huntington, via de sinalização de cálcio etc. (MATAK e LACKVIĆ, 2015).

A ação da BTX-A pode ser bloqueada pela formação de anticorpos antitoxina (resposta imune), que bloqueiam os efeitos terapêuticos da droga (anticorpos neutralizantes), sendo esta considerado um obstáculo ao tratamento com esta droga. A imunorresistência, inerentes à utilização de uma terapêutica à base de proteínas (proteínas estranhas ao organismo), é relatada em casos de utilização de grandes doses do produto ou não quando não se respeita o tempo mínimo de intervalo entre as aplicações (CARRUTHERS, 2002; COLHADO, BOEING, ORTEGA, 2009; DHAKED et al., 2010; INTISO, 2012; CAVALLINI, 2014); além das características próprias de cada paciente; e as propriedades imunológicas das diferentes marcas de preparações utilizadas, sendo mais comum a imunorresistência à BTX-B (BRIN, 1997; DRESSLER e HALLETT, 2006). A resistência é caracterizada pela ausência de qualquer efeito da droga (BRIN, 1997). Na ausência de efeito, pode-se substituir a BTX-A pela BTX-B, com bons resultados por possuírem perfis de ação comparáveis. Ou seja, os anticorpos neutralizantes desenvolvidos contra um sorotipo, não bloqueiam a atividade biológica de um outro sorotipo (BRIN, 1997; AGUILAR-REBOLLEDO, 2005; CAVALLINI, 2014).

2.8.3. Tempo de Ação da Toxina Botulínica Tipo A

Em tecido muscular, já na primeira hora após a aplicação da toxina botulínica provoca o bloqueio prolongado da sinapse nervosa ao ligar-se de forma específica e irreversível na membrana pré-sináptica dos neurônios (OLIVEIRA et al., 2013; YOON et al., 2010). Alguns autores relatam que os efeitos clínicos podem aparecer em um período que varia 1 a 7 dias após a administração, sendo comumente notados entre 1 e 3 dias. Segue-se um período que varia até a 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).

O consenso geral propõe que seus efeitos com resposta benéfica duram, na maioria dos casos, em torno de 3 a 4 meses, mas ainda há um grupo de pacientes em que o efeito dura de 6 semanas até mais 6 meses (CORDIVARI et al., 2004; ELLIES et al., 2004; ELLIES et al., 2006b; CH, 2010), dependendo da resposta individual, condição clínica do paciente, da dose e sorotipo administrados (YOON et al., 2010).

Existem evidências de que a toxina botulínica parece ter uma duração de ação maior em terminais nervosos autonômicos (variando de 6 a 9 meses) quando comparado com terminais nervosos motores somáticos (de 3 a 4 meses) (WALKER e DAYAN, 2014). 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).

Em glândulas salivares, a resposta inicial pode ser observada a partir do 3º ou 5º dia após a aplicação da toxina (DANIEL, 2015), com uma ação que pode se estender por até 6 meses (ELLIES et al., 2006b; CH, 2010). Durações maiores de efeito estão relacionadas também a doses maiores, porém, nesses casos, pode-se ter reações adversas (GAMA, 2010). No geral, a duração média da ação da toxina botulínica, a partir de estudos clínicos, é de aproximadamente 3 meses, entretanto, já foi observado que em alguns pacientes o sucesso terapêutico, pode ser mais curto ou mais longo (ELLIES, QUONDAMATTEO, LASKAWI, 2007).

O processo de recuperação funcional do terminal nervoso após a injeção de toxina não é totalmente compreendido, sugerindo-se brotamento colateral de novos

terminais (ramificação dendríticas ou formação de uma ampla rede de brotos terminais nervosos), ao lado do terminal nervoso principal (CARRUTHERS e CARRUTHERS, 2005a; EDGAR, 2001; DÍA et al., 2014), formando novas conexões sinápticas, fenômeno conhecido como "*end sprouting*" (processo de reparação e reabilitação sináptica), é reversível e desaparece junto com o passar do efeito da toxina botulínica (OLIVEIRA et al., 2013). Muitos autores afirmam que estes novos axônios colaterais aparecem por volta do 28º dia, ficando os mesmos responsáveis por toda a condução nervosa deste então (SIDEBOTTOM, PATEL, AMIN, 2013).

Outros 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 (SPOSITO, 2004; SIM, 2011), acompanhada pela involução dos novos brotos dendríticos (EDGAR, 2001; 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 5 a 10 semanas para se completar (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, HOU, 2009).

Especula-se que esses novos terminais nervosos sejam apenas transitórios, e a neurotransmissão voltaria a ser realizada pelo terminal nervoso principal, sendo restaurado ao estado anterior (CARRUTHERS e CARRUTHERS, 2005a). Diante do descrito, supõem-se que este brotamento neuronal não ocorre com a mesma intensidade nas divisões eferentes do sistema nervoso (somático e autônomo), sendo mais lenta no sistema nervoso autônomo (WALKER e DAYAN, 2014).

2.8.4. Estabilizantes da Toxina Botulínica Tipo A

A gelatina de origem animal é um produto obtido da hidrólise parcial da proteína colágeno, a principal proteína estrutural no tecido conjuntivo da pele e dos ossos. Está contida em inúmeros produtos utilizados na 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 estabilizante 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, HTLV, Hepatite B e C, ou seja, não tem capacidade de transmitir doenças priônicas, pois a gelatina é certificada como “*príon free*” (CRISTÁLIA, 2006).

Por ser de origem animal, a gelatina bovina poderia ser altamente alergênica. Na bula da marca Prosigne® é contraindicado seu uso no tratamento de indivíduos com histórico de reações anafiláticas, enquanto que na bula de outras marcas, como Botox®, que utiliza a albumina humana, não apresenta tal contraindicação (PROSIGNE®, 2013 [bula]; BOTOX®, 2015 [bula]). Ainda não houveram notificações de reações adversas ao medicamento, incluindo seus componentes excipientes. A gelatina que funciona apenas como excipientes de conservação do produto, e por isso não possuiria princípio ativo e logo seria irrelevante e inerte quanto aos objetivos terapêuticos a serem atingidos.

2.8.5. Metabolização e Excreção da Toxina Botulínica Tipo A

Ainda existem lacunas na literatura, com pouca informação disponível, sobre os mecanismos naturais para metabolização e eliminação da toxina botulínica. Não existe nenhuma informação sobre os mecanismos farmacologicamente induzidos para metabolismo e eliminação da toxina (RAVICHANDRAN et al., 2006).

Alguns autores afirmam que após a aplicação da toxina botulínica e difusão no tecido ou órgão alvo através do espaço intersticial até atingir seu receptor alvo nas

terminações nervosas, a toxina botulínica excedente é absorvida para a circulação sanguínea e pode provocar efeitos sistêmicos, mesmo que mínimos. Vale ressaltar que, devido ao alto peso molecular, a droga não ultrapassa a barreira hematoencefálica (SPOSITO, 2004). Em casos de tratamento de botulismo, por exemplo, dados exatos e confiáveis sobre suas taxas de metabolização e eliminação não estão disponíveis (RAVICHANDRAN et al., 2006). Alguns estudos realizados em musculatura de animais (ratos), demonstrou que mesmo após a aplicação da droga, ocorre difusão pelo músculo, sugerindo a metabolização sistêmica e excreção urinária. A metabolização sistêmica ocorreria através de proteases (SPOSITO, 2004).

Já foi verificado que o sangue não produz alterações estruturais importantes na toxina botulínica e não interfere na sua atividade enzimática catalítica, mantendo a sua capacidade para bloquear a transmissão neuromuscular. E ainda foi observado que, quando na corrente sanguínea, apenas cerca de 27% da droga estava ligada à albumina plasmática, restando mais de 70% livre para ser redistribuída pelo organismo. E enquanto a toxina atinge seu tempo de meia-vida, não há evidência de metabolismo significativo sobre a mesma. Quando a toxina é inativada por anticorpo, a depuração da mesma ocorre no fígado e no baço, tornando-se indisponível para promover efeitos nas terminações nervosas (RAVICHANDRAN et al., 2006).

Porém, devido às pequenas quantidades de toxinas que são administradas com fins terapêuticos, e por sua aplicação local, faltam critérios para avaliar fisiologicamente *in vivo* as taxas de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (SAMPAIO, COSTA, FERREIRA, 2004; LEBEDA et al., 2010).

2.9. Tratamento da Sialorreia com Toxina Botulínica

A toxina botulínica tipo A (BTX-A) e B (BTX-B) para o tratamento da sialorreia é uma opção terapêutica, cada vez mais utilizada e difundida. A BTX-A tem sido aplicada em glândulas salivares (submandibular e parótida) na prática clínica, no tratamento da sialorreia (TRUONG e JOST, 2006), pois é capaz de deprimir a atividade secretora das glândulas salivares, como uma paralisia neurosecretora (BOTHWELL et al., 2002; ELLIES et al., 2004). A utilização da toxina para tratar

sialorreia surgiu com a necessidade de uma forma terapêutica mais conservadora, menos invasiva, sem que haja a realização de procedimentos cirúrgicos.

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 salivacção, era bloqueado em gatas infectadas pelo *Clostridium botulinum* (DICKSON e SHEVSKY, 1923; ELLIES et al., 1999; SAVARESE et al., 2004). Em experimentos pioneiros feitos com gatos, onde se realizaram injeção retrógrada da toxina botulínica através dos ductos excretores de glândulas submandibulares e parótidas, verificou-se uma diminuição da salivacção, significativamente menor quando comparada com a glândula não tratada, semelhante a uma desnervação parassimpática das glândulas, inferindo-se a hipótese de que o resultado era devido à falta de alguma ação da acetilcolina sobre as células glandulares (EMMELIN, 1961; EKSTRÖM et al., 1977).

Diante das complicações apresentadas com os procedimentos cirúrgicos e medicação anticolinérgica para o tratamento da sialorreia, o tratamento local através da aplicação da BTX-A ou B em glândulas salivares pode ser uma grande ajuda (SAVARESE et al., 2004; LAGALLA et al., 2009; INTISO, 2012). A *Academia Europea de Neurologia* afirmou que a toxina botulínica deve ser considerada uma opção de tratamento (ALTER, 2010), sendo cada vez mais indicada. Não possui os efeitos colaterais das medicações anticolinérgicas e não possui os riscos dos tratamentos cirúrgicos (BOTHWELL et al., 2002).

Desta forma, a BTX-A vem sendo amplamente promovida, enquanto que outras drogas orais estão mais propensas à julgamentos (BLASCO, 2010). Desde 1997, a BTX-A passou a ser descrita como método eficaz de tratamento da sialorreia, sob a forma de injeção intraglandular (SAVARESE et al., 2004), inclusive em quadros de sialorreia extensa (CORSO et al., 2011; KHAN et al., 2011).

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). Embora, a duração do efeito terapêutico seja limitada no tempo, durando alguns meses. No entanto, as injeções podem ser repetidas na recorrência da sialorreia (BREHERET et al., 2011).

O tipo de sialorreia não influencia à resposta ao tratamento com BTX-A e consiste em aplicação local intraglandular percutânea da toxina diluída em solução

salina fisiológica em glândulas salivares parótidas e/ou submandibulares. Ensaios clínicos realizados em humanos, guiadas ou não pelo método de ultrassonografia (USG), com ou sem placebo, revelaram a melhora dos sintomas de sialorreia na maioria dos pacientes tratados (SAVARESE et al., 2004; BHAYANI e SUSKIND, 2008; BREHERET et al., 2011). 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; COSTA e FERREIRA, 2008; GOMES-CARAVACA et al., 2015; MALCHER et al., 2015; MAHADEVAN et al., 2016). As aplicações podem ser feitas em adultos ou em crianças, trazendo benefícios não só aos pacientes, mas também aos familiares (GERLINGER et al., 2007; BREHERET et al., 2011; ÇIFTÇ et al., 2013).

A necessidade de injeções repetidas (BOTHWELL et al., 2002; WALKER e DAYAN, 2014), ou aumento das doses para ter um bom resultado (GOK et al., 2013), são fatores considerados como desvantagens, principalmente em doenças crônicas (MENDES et al., 2010; WALKER e DAYAN, 2014). Além disso, para as injeções repetidas, é necessária maior cooperação dos pacientes e seus cuidadores (SILLANPÄÄ et al., 2015). Porém, a repetição de injeções pode proporcionar efeitos mais duradouros (BHAYANI e SUSKIND, 2008). O tratamento pode ser repetido durante vários anos em algumas doenças, como por exemplo, a doença de Parkinson (DP) e a lesão cerebral (LC). No entanto, outros 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). O uso de BTX-B em longo prazo pode fazer a eficácia desaparecer com o tempo (MØLLER et al., 2015), mas segundo Sillanpää et al. (2015), aplicações repetidas na glândula submandibular de humanos, continua com efeito adequado. Uma nova aplicação não é recomendada antes de completar 3 meses da última dose, sendo que a dosagem deve ser personalizada para a gravidade e problema clínico do paciente (ALTER, 2010). Faz-se necessários mais estudos sobre o uso crônico da toxina.

Este tratamento promete poucos efeitos colaterais, além de permitir que a secreção salivar mantenha o umedecimento da cavidade oral adequadamente (ERASMUS et al., 2010). 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). A severidade e a frequência da sialorreia pode ser mensurado pela tabela de Thomas-Stonell e Greenberg e pelos critérios de Wilkie e Brody (SAGAR et al., 2016).

Foi verificado, através de um estudo morfológico macroscópico por imagens ultrassonográficas das glândulas parótidas e submandibulares humanas, não haver alterações das mesmas após o terceiro mês da aplicação da BTX-A (COSTA e FERREIRA, 2008). Porém, um estudo recente descreve ter ocorrido redução no volume de glândulas injetadas (MATSUOKA et al., 2016), reafirmando a ideia de muitos dados científicos ainda controversos.

A injeção pode ser feita na glândula submandibular, na parótida ou em ambas, simultaneamente. Injetar apenas as glândulas submandibulares parece ser uma abordagem promissora e mais eficiente, uma vez que estas glândulas 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 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). Alguns autores propõem, então, que as aplicações sejam guiadas por ultrassom de ambas as glândulas submandibulares e glândulas parótidas (BREHERET et al., 2011). A glândula sublingual é raramente injetada (TRUONG e JOST, 2006).

A injeção intraglandular da BTX é feita através de três diferentes técnicas, que são: através do método palpatório, usando marcos anatômicos com palpação da glândula; aplicação orientada por ultrassonografia (USG); aplicação orientada por eletromiografia (EMG) (MONTGOMERY et al., 2014; DANIEL, 2015); e como a estimulação elétrica transcutânea (TENS) (BRODSKY, SWOPE, GRIMES, 2012; CAVALLINI, 2014). É preferível o uso de aplicação orientada por USG (JOST, 2016), pois até 65% dos pacientes podem apresentar alguma variação anatômica da glândula salivar (QUEZADA-GAON et al., 2016). Este é útil não só para isolar as glândulas, mas para evitar atingir os músculos adjacentes envolvidos na mastigação, deglutição e estruturas vasculares, permitindo identificar o melhor local para a aplicação (ALTER, 2010; MATSUOKA et al., 2016).

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 USG auxilia na visualização da dispersão da toxina através da glândula (AUGUSTO e PEREZ, 2006), tornando a aplicação um método mais seguro, que garante um efeito clínico ideal e evita possíveis efeitos colaterais prejudiciais (JONGERIUS et al., 2003; LUNGREN et al., 2016). Muito embora, não há nenhuma exigência para a orientação de ultrassom (GOMES-CARAVACA et al., 2015). Vale ressaltar, entretanto, que nem sempre os aparelhos de ultrassonografia são de fácil acesso (LEE et al., 2010), devendo-se aplicar pela palpação direta da glândula salivar (VAILE e FINLAY, 2006; ALTER, 2010) e por sua localização anatômica (CORDIVARI et al., 2004; LEE et al., 2010).

Nas glândulas salivares, a BTX-A além de diminuir o fluxo salivar e atrofia glandular, promove uma diminuição do nível da expressão das proteínas SNAP-25 e enzima AChE, e aumento a expressão dos receptores M3 (XU et al., 2013). Também já foi descrito que há uma diminuição da expressão e inibição da translocação de AQP5 a partir do citoplasma para a membrana plasmática apical. Estes efeitos são recuperados com o passar do tempo (XU et al., 2013; XIE et al., 2016).

Apesar da duração limitada de sua ação, é considerado um procedimento pouco invasivo, relativamente indolor e rápido (BHAYANI e SUSKIND, 2008; MENDES et al., 2010; GOK et al., 2013). 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 medida em que a seringa for sendo retirada.

O procedimento de injeção nas glândulas pode ser realizado sob anestesia local ou geral (MONTGOMERY et al., 2014; DANIEL, 2015). A sedação (sedação intravenosa ou não, principalmente em crianças) 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; ÇIFTÇI et al., 2013). Entretanto, alguns autores recomendam anestesia geral para determinado grupos de pacientes, principalmente em crianças, sendo uma desvantagem para essa opção terapêutica (JONGERIUS et al.,

2004b, VAILE e FINLAY, 2006; GOK 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).

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 BTX- A sobre glândulas salivares em longo prazo (VASHISHTA et al., 2013), da combinação de glândulas salivares injetadas no mesmo paciente (JONGERIUS et al., 2004b), bem como a dose ideal para alcançar os resultados satisfatórios (VASHISHTA et al., 2013), com o mínimo de efeitos adversos para os pacientes. Diante de todo o exposto, a aplicação da BTX-A, deve ser considerada uma alternativa terapêutica válida antes de se optar por outro tratamento mais invasivo (CAPACCIO et al., 2008).

2.10. Efeitos Adversos do Tratamento da Sialorreia com Toxina Botulínica

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). Logicamente pode-se pensar que, como a toxina botulínica é injetada localmente, isso evita os efeitos colaterais sistêmicos observados com os medicamentos anticolinérgicos (DANIEL, 2015). Com a BTX-A, os efeitos adversos são uma consequência do seu mecanismo de ação longe ou próximo do alvo, podendo ser tolerados ou mitigados através de alterações da dose (BRIN, 1997).

Embora alguns estudos clínicos mostrem que a aplicação da toxina botulínica para o gerenciamento da sialorreia pode trazer efeitos adversos, estes são menores que outras opções atuais de tratamento (VASHISHTA et al., 2013), sendo leves e pouco frequentes (GOMES-CARAVACA et al., 2015). Os efeitos colaterais, quando existentes, são classificados como locais e/ou sistêmicos, estando alguns deles relacionados com o mecanismo de ação da própria droga (CARVALHO, JANKOVIC, PAPPERT, 2011).

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). Seu uso em crianças e adultos é seguro. Quando se trata de fins cosméticos, no qual se utilizam doses bastante modestas, essa segurança é ainda maior (CARRUTHERS e CARRUTHERS, 2005b). Mesmo assim, apesar da aplicação local prometer ser uma medida terapêutica segura, podem ser observados alguns efeitos colaterais.

Estes efeitos, na maioria das vezes, ocorrem por erro de aplicação ou por conta da difusão da toxina pelo espaço intercelular até atingir seu alvo, mas também para regiões vizinhas (pela punção na cápsula da glândula) e/ou devido os efeitos resultantes da disseminação e absorção hematogênica (corrente sanguínea), possivelmente devido ao volume de fluido injetado, com distribuição sistêmica, podendo causar efeito colateral neste nível (CARVALHO, JANKOVIC, PAPPERT, 2011; BRODSKY, SWOPE, GRIMES, 2012; TIGHE et al., 2014). Assim, a utilização de USG pode reduzir esses riscos, especialmente para injeções na glândula submandibular (ÇİFTÇİ et al., 2013; QUEZADA-GAON et al., 2016; SHARIAT-MADAR et al., 2016).

Os efeitos indesejados locais geralmente se originam em decorrência da própria aplicação e é possível observar dor, edema, eritema e disfagia (LU e LIPPITZ, 2009). Deve ser evitada em áreas de infecções ativas (CARRUTHERS e CARRUTHERS, 2005b). Também já foram observados pneumonia aspirativa, disfagia grave e perda do controle motor da cabeça (CHAN et al., 2013), por paralisia motora, com a colocação de sonda nasogástrica ou admissão hospitalar devido a dificuldades respiratórias (SHARIAT-MADAR et al., 2016).

No tratamento da sialorreia, em alguns casos, a BTX-A pode provocar a produção de uma saliva espessada (mudança na viscoelasticidade de saliva), fazendo com que a mastigação e deglutição fiquem prejudicadas. A desnervação parassimpática diminui o componente aquoso da saliva, e dessa forma, aumentando a concentração de mucinas. Entretanto, o fenômeno oposto pode indicar que o aumento reflexo da secreção salivar provém de outras glândulas salivares (fluxo compensatório), ou em uma condição de não responsividade da glândula tratada. Mas é impossível prever como o paciente irá responder ao tratamento (ERASMUS et al., 2011).

Quando a aplicação é realizada de maneira ineficiente, sem conhecimento da sua administração e doses, pode gerar diminuição do fluxo salivar, como por exemplo a xerostomia (“boca seca”) (ADRIENN, 2006; GAMA, 2010; REDDIHOUGH et al., 2010), causando desconforto para o paciente, onde alguns microrganismos podem proliferar, resultando em doenças oportunistas (SREEBNY, 2000). Um contra-argumento para a xerostomia, é a preservação dos terminais nervosos adrenérgicos, o que sustentaria a atividade secretora basal (secreção residual de saliva) (ELLIES et al., 2004; GERLINGER et al., 2007).

A xerostomia é geralmente acompanhada por infecções crônicas da mucosa bucal, aumento do índice e recorrência de cáries, alta taxa de progressão da desmineralização dentária, tártaros e doenças periodontais (gengivite e periodontite), alterações na mucosa, alteração do paladar (acuidade gustativa), fala ou fonação dificultada, problemas de mastigação, disfagia, mau hálito, outras disfunções estomatognáticas, problemas de digestão e absorção de alimentos e infecção por bactérias e fungos, principalmente do gênero *Candida spp.* Pode ainda conduzir o indivíduo a um estado de depressão e piora da qualidade de vida (AMANTÉA et al., 2003; GERLINGER et al., 2007; MELFI e ALLEY, 2010).

Foi observado que, com a diminuição do fluxo salivar, aumento a concentração de Na^+ , Cl^- e a proteína total. O aumento da viscosidade da saliva pode ser consequência do aumento das proteínas totais e a algum mecanismo compensatório sobre a ação do receptor β -adrenérgicos (ação simpática) (MØLLER et al., 2015; PETRACCA et al., 2015). Alterações na saliva, podem levar a uma função diminuída de agregação bacteriana e aumentar a susceptibilidade a cárie dentária (ANDERSON et al., 1994; CORDIVARI et al., 2004). A diminuição do efeito tampão, que a saliva realiza quando em quantidades normais, leva a um pH ótimo para a proliferação de microrganismos causadores de doenças oportunistas (SANIOTO et al., 2013). O paciente deve ser informado a respeito do cuidado dental e oral devido à salivagem reduzida (TRUONG e JOST, 2006).

Foram citados sensação de pressão na glândula durante as refeições, aumento transitório da sialorreia, ou início de inchaço glandular secundário a injeção de grandes volumes, mas o paciente pode realizar uma massagem sobre a glândula (GERLINGER et al., 2007; KRUEGEL et al., 2010; REDDIHOUGH et al., 2010); formação de sialolitíase e sialodenite subsequentes a aplicação intraglandular da

toxina. O inchaço dos tecidos subjacentes da sialodenite aguda pode levar a compressão das vias aéreas (YUAN e SHELTON, 2011).

Outras reações locais são relatadas como sangramento, hematoma e infecção no local da aplicação, além de inclinação facial temporária (CORDIVARI et al., 2004; CH, 2010). Em caso de difusão ou injeção em músculos vizinhos, como os músculos da faringe e esternocleidomastoideo, pode causar disfagia secundária (JONGERIUS et al., 2003; CH, 2010; REDDIHOUGH et al., 2010). Os sintomas da disfagia se manifestam em torno de uma semana após a injeção e melhora por volta da 6ª a 8ª semana (TIGHE et al., 2014). Outro possível efeito, é a luxação recorrente do osso mandíbula após o tratamento da sialorreia com BTX-A (TAN et al., 2001), fraqueza músculo do masseter, lesão do nervo facial e pode se espalhar atingindo os músculos oculares (CORDIVARI et al., 2004; TURK-GONZALES e ODDERSON, 2005).

Sistemicamente a toxina irá ter tropismo por terminações nervosas colinérgicas, que pode causar enfraquecimento muscular longe do local de aplicação. A cinética de difusão da toxina no interior do tecido, depende da composição de proteínas, tamanho molecular, volume injetado, dose aplicada, método de injeção, calibre da agulha, distância da ponta da agulha à junção neuromuscular, número de injeções, e, no caso de musculatura, da seleção do músculo alvo (BRODSKY, SWOPE, GRIMES, 2012).

Os efeitos sistêmicos incluem náusea, fraqueza muscular, fadiga, mal-estar, irritação, erupção cutânea, ptose e sintomas gripais. Efeitos sistêmicos são raramente observados, mas quando presentes são relatados náuseas, fadiga, indisposição e fraqueza generalizada. Os sintomas relacionados à gripe são febre, dores de cabeça, queimação, fastio, tosse, inflamação da garganta, mal-estar geral e fadiga, podem aparecer em torno de um mês após a aplicação, mas não trazem qualquer fator de risco, sendo considerados leves ou moderados, que duram menos de 2 semanas, com tratamento convencional para gripe (BAIZABAL-CARVALLO, JANKOVIC, PAPPERT, 2011; CARVALHO, JANKOVIC, PAPPERT, 2011). Já foi relatado situação rara de ação sobre o sistema cardiovascular, incluindo arritmica e infarto cardíaco. Mas o paciente já havia a doença de base, porém não se sabe a relação com a BTX-A (PROSIGNE®, 2013 [Bula]).

3. JUSTIFICATIVA

As glândulas salivares são sede de variados processos patológicos, seja por uma causa local, ou constituindo epifenômenos de enfermidades sistêmicas, as quais podem manifestar distúrbios na secreção salivar. Como se sabe da importância da saliva e das glândulas salivares, conhecer sua morfofisiologia e compreender os diversos estados fisiopatológicos que acometem estes órgãos são fundamentais.

Muitas das desordens neuromotoras traz como sinal clínico a sialorreia. O tratamento da sialorreia em pacientes com desordens neurológicas se faz necessário pelo constante risco de infecção pulmonar, dermatite perioral, dificuldade de higiene, perda de fluidos e eletrólitos, dificuldades para falar, isolamento social, dentre outros agravos para a saúde geral, assim como diminuição da qualidade de vida e baixa autoestima do paciente e de seus familiares, com prejuízo psicológico.

Diversos os tratamentos são possíveis para sialorreia, desde a administração de medicamentos, terapias oromotoras, tratamento com radiação e cirurgias. Porém estes cuidados trazem ou acarretam efeitos colaterais graves, são pouco eficientes ou muito invasivos para o paciente. Diante disso, uma nova opção terapêutica surge com a aplicação da toxina botulínica A (BTX-A) em glândulas salivares.

São poucos os estudos descrevendo pormenorizadamente a ação da toxina botulínica no tecido glandular, assim como as consequências dos seus possíveis efeitos colaterais. O melhor conhecimento sobre os aspectos histofuncionais das glândulas salivares sob a influência da toxina e da eficácia do seu estabilizante, contribui diretamente para sua aplicação clínica e para a confiabilidade dos profissionais em recomenda-la a seus pacientes com sialorreia. Também são escassos estudos sobre a influência da BTX-A em aplicação glandular no microbioma oral, trazendo a necessidade de estudos mais acentuados da microbiota oral. O mesmo se aplica à ação da droga em nível sistêmico, inexistindo dados concisos sobre o metabolismo e excreção da toxina.

O presente projeto traz benefícios a sociedade, uma vez que visa fornecer maiores esclarecimentos sobre a segurança da BTX-A da marca Prosigne[®], que tem vasta indicação na saúde pública, além de avaliar a possibilidade de incorporação de marcas comerciais menos dispendiosas nessa conduta clínica.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar se o tratamento com injeção intraglandular de toxina botulínica tipo A no complexo submandibular-sublingual de ratas promove alterações histológicas na glândula, bem como, alterações bioquímicas na saliva e no soro sanguíneo, mudanças na microbiota fúngica oral e alterações toxicológicas no metabolismo hepático e renal destes animais.

4.2. Objetivos Específicos

Nos grupos com complexos submandibulares-sublinguais tratados com BTX-A da marca Prosigne® (Cristália, Itapira, SP, Brasil) e gelatina de origem bovina (Gelita do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil):

A – Verificar a presença de apoptose pelo método TUNEL;

B – Observar os aspectos histológicos dos complexos submandibulares-sublinguais e dos linfonodos submandibulares;

C – Analisar qualitativamente a microbiota fúngica da cavidade oral das ratas;

D – Comparar a composição bioquímica proteica da saliva total dos grupos de estudo;

E – Mensurar bioquimicamente os eletrólitos da saliva e do soro sanguíneo dos animais;

F – Verificar as funções hepáticas e renais através de exames de bioquímicos sorológicos das ratas;

G – Observar e descrever os achados histopatológicos dos tecidos hepáticos e renais de ratas.

5. HIPÓTESES

H0 – O uso de BTX-A não promove apoptose na glândula submandibular e sublingual dos animais tratados;

H1 – O uso de BTX-A promove apoptose na glândula submandibular e sublingual dos animais tratados;

H2 – O uso de BTX-A para tratamento da sialorreia não altera a composição bioquímica proteica da saliva dos animais tratados;

H3 – O uso de BTX-A para tratamento da sialorreia altera a composição bioquímica proteica da saliva dos animais tratados;

H4 – O uso de BTX-A para tratamento da sialorreia não altera a microbiota fúngica oral dos animais tratados;

H5 – A BTX-A para sialorreia altera a microbiota fúngica oral dos animais tratados;

H6 – A BTX-A para sialorreia não altera as funções renais dos animais tratados;

H7 – A BTX-A para sialorreia altera as funções renais dos animais tratados;

H8 – A BTX-A para sialorreia não altera as funções hepáticas dos animais tratados;

H9 – A BTX-A para sialorreia altera as funções hepáticas dos animais tratados;

H10 – O uso de BTX-A para tratamento da sialorreia não altera a concentração de íons presentes na saliva dos animais tratados;

H11 – O uso de BTX-A para tratamento da sialorreia altera a concentração de íons presentes na saliva dos animais tratados;

H12 - O uso de BTX-A para tratamento da sialorreia não altera a concentração de íons presentes no soro sanguíneo dos animais tratados;

H13 - O uso de BTX-A para tratamento da sialorreia altera a concentração de íons presentes no soro sanguíneo dos animais tratados;

H12 – O uso de BTX-A para tratamento da sialorreia altera os linfonodos submandibulares dos animais tratados;

H13 – O uso de BTX-A para tratamento da sialorreia não altera os linfonodos submandibulares dos animais tratados.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Considerações Éticas

Este projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Biociências (CB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob o parecer de número 23076.023152/2014-14, ofícios 58/14 (Anexo I) e 11/17 (Anexo II). O cuidado com os animais foi baseado seguindo das recomendações da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ (ANDRADE, PINTO, OLIVEIRA, 2002), Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2013, 2015), “*Guide for Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition*” publicado pelo *National Institute of Health, USA* (NIH, 2011), Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), *Council for International Organizations for Medical Science, USA* (CIOMS, 2012) e *International Council for Laboratory Animal Science, USA* (ICLAS, 2012).

6.2. Tipo, Caracterização e Localização do Estudo

O presente estudo, do tipo pesquisa aplicada, experimental, descritiva e analítica, foi realizado no laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Núcleo de Cirurgia Experimental (NCE) do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia (PPGC) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Anatomia do Departamento de Anatomia do Centro de Biociências (CB, UFPE), Laboratório de Proteínas do Departamento de Bioquímica (CB, UFPE), Laboratório de Micologia Médica do Departamento de Micologia (CB, UFPE), Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário Escola (HOVET, UFRPE) do Departamento de Medicina Veterinária (DMV, UFRPE) e Centro de Apoio à Pesquisa (CENAPESQ) da UFRPE.

6.3. Obtenção e Cuidados com os Animais

Foram utilizadas 32 ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, classe Mammalia, ordem Rodentia, família Muridae, subfamília Murinae), fêmeas, aparentemente saudáveis, adultas (idade em torno de 217 dias e desvio padrão de $\pm 20,65$) (SENGUPTA, 2013), pesando entre 200-300 g (média de 239,87 g e desvio padrão de $\pm 13,82$), provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e mantidos no Biotério do Núcleo de Cirurgia Experimental (NCE, PPGC, CCS, UFPE). O biotério apresentava fluxo de pessoas e insumos definidos, e era protegido por barreiras sanitárias (sistema de filtração de exaustão na altura das gaiolas).

Os animais tiveram livre acesso a água filtrada via oral e comida (*ad libitum*), com dieta balanceada padrão para roedores do biotério (Presence® Nutrição Animal para Ratos e Camundongos, São Paulo, SP, Brasil). Mantidos em gaiolas apropriadas (4 animais por gaiola de polipropileno com dimensão de 41 x 34 x 16 cm), temperatura de 22 ± 2 °C, ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes acesas das 6:00 as 18:00 horas), umidade relativa em torno de 50%, exaustão de ar e aclimatados um mês antes da realização dos procedimentos, segundo as recomendações éticas. Todas as manipulações experimentais foram realizadas entre 7:00 e 10:00 horas.

6.4. Definições dos Grupos de Estudo

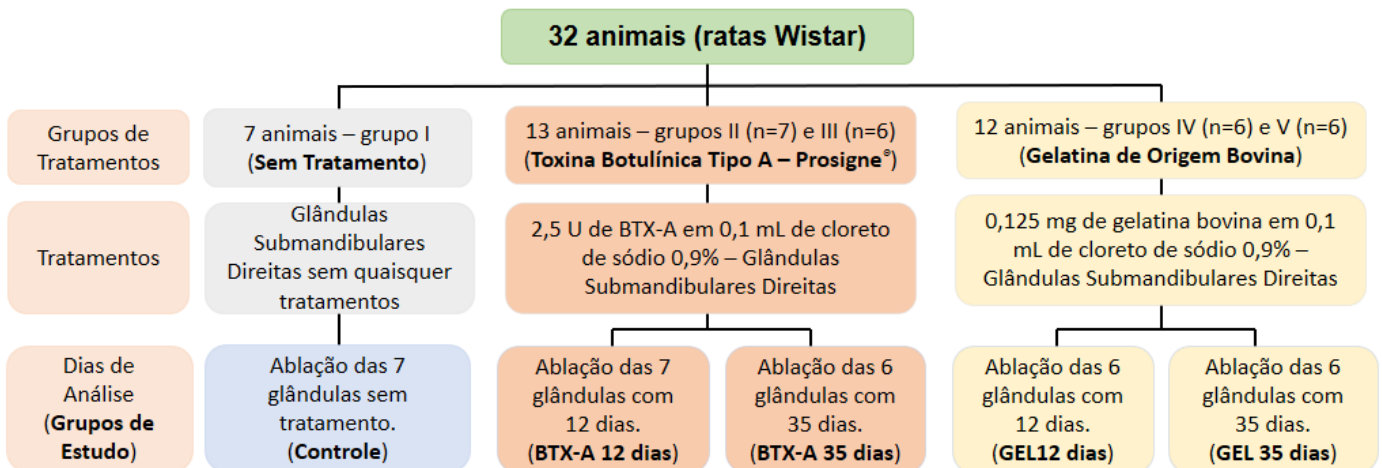
O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 5 (cinco grupos), sendo um grupo controle e mais quatro grupos tratados, com o mínimo de seis repetições por grupo estudado. Os animais foram divididos aleatoriamente:

- Grupo I (Controle): 7 animais sem qualquer tratamento;
- Grupo II (BTX-A 12): 7 animais, cujas glândulas submandibulares direitas receberam injeção de toxina botulínica tipo A (BTX-A) da marca Prosigne® (Cristália, Itapira, SP, Brasil). As amostras para as análises foram coletadas 12 dias após o tratamento;

- Grupo III (BTX-A 35): 6 animais, cujas glândulas submandibulares direitas receberam injeção de toxina botulínica tipo A (BTX-A) da marca Prosigne® (Cristália, Itapira, SP, Brasil). As amostras para as análises foram coletadas 35 dias após o tratamento;
- Grupo IV (GEL 12): 6 animais com glândulas submandibulares direitas tratadas com injeção de gelatina de origem bovina, um estabilizante da BTX-A (Gelita do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil). As amostras para as análises foram coletadas 12 dias após o tratamento;
- Grupo V (GEL 35): 6 animais com glândulas submandibulares direitas tratadas com injeção de gelatina de origem bovina (Gelita do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil). As amostras foram coletadas 35 dias após o tratamento.

As glândulas submandibulares de ratos integram o complexo submandibular-sublingual. Os períodos de 12 e 35 dias são referentes respectivamente ao pico de ação da droga e término do efeito em ratos segundo Wen, Yuan e Hou (2009). O estudo envolveu procedimentos experimentais de baixo risco, e desta forma não houveram perdas animais.

6.4.1. Organograma da distribuição dos grupos de estudo:



6.5. Tratamento dos Animais

Inicialmente, os animais foram pesados em balança digital (Fanem® Ltda., São Paulo, São Paulo, Brasil) para determinação da quantidade de solução anestésica a ser utilizada individualmente, anestesiados com cloridrato de quetamina (50 mg/kg de

peso – Clortamina[®], BioChimico, Itatiaia, Rio de Janeiro, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg de peso – Rompun[®], Bayer S.A., São Paulo, São Paulo, Brasil) como relaxante muscular, na proporção de 1:1 associados na mesma seringa, de acordo com o peso dos animais e administrados por via intramuscular.

Após anestesia, foi realizada antissepsia com digluconato de clorexidina a 2% (FGM do Brasil[®], Joinville, Santa Catarina, Brasil) e tricotomia da região cervical dos animais. Nos animais dos grupos BTX-A, as glândulas submandibulares direitas dos complexos submandibulares-sublinguais, receberam dose única de injeção intraglandular com 2,5 U de toxina botulínica tipo A (*Prosigne*[®], Cristália, São Paulo, Brasil), reconstituída em 0,1 mL de solução de cloreto de sódio 0,9% (dia 0). A diluição da droga em cloreto de sódio 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; PROSIGNE[®], 2013 [Bula]).

Posteriormente foi realizada nos grupos de gelatina bovina (GEL) a administração da injeção intraglandular de 0,125 mg de gelatina de origem bovina (Gelita do Brasil Ltda.) diluída em 0,1 mL de cloreto de sódio 0,9% (solução salina ou soro fisiológico convencional) na glândula submandibular direita do complexo submandibular-sublingual, em dose única (dia 0).

Para as aplicações utilizou-se seringa de insulina de 1 mL/cc ultrafina, com agulha de calibre de 8 mm (5/16") x 0,3 mm (30G) (BD, Curitiba, Paraná, Brasil) e foram realizadas pelo método palpatório e pela localização anatômica do complexo submandibular-sublingual.

6.6. Obtenção dos Isolados Fúngicos da Cavidade Oral dos Animais

Após a realização do procedimento anestésico e verificação da efetividade da mesma, posicionou-se o animal em decúbito dorsal em mesa previamente preparada e coberta com um campo cirúrgico esterilizado (ARAÚJO et al., 2007). A cavidade oral do animal foi aberta com o auxílio de uma pinça clínica. Procedeu-se com um exame clínico para verificar se os animais apresentam lesões na mucosa oral.

Após a referida anamnese, a língua foi tracionada anteriormente, com auxílio de gaze estéril e foi realizada coleta da microbiota fúngica do dorso da língua, palato e mucosa jugal da cavidade oral das ratas através de um *swab* estéril friccionado por 2 minutos pela mucosa oral. As amostras coletadas foram transferidas para tubos de ensaio estéril e vedado contendo 5 mL de água adicionada de 50 mg/L cloranfenicol.

Posteriormente, para a realização da microscopia direta, foram preparadas lâminas por esfregaço a partir do material biológico coletado pela fricção de novo *swab* pela mucosa oral, gotejado o corante Azul de Amann, clarificado com solução aquosa a 20% de hidróxido de potássio e observação no microscópio óptico Olympus Cx21 (Olympus Optical do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Além disso, foram feitas coletas da cama de maravalha das gaiolas e da ração padrão do biotério de alimentação dos animais como forma de controle.

6.7. Colheita de Saliva Total dos Animais

Após a realização da anestesia (conforme descrito no item 6.4) e coleta da microbiota oral (item 6.5), prosseguiu-se com a estimulação do fluxo salivar para coleta da saliva. A secreção salivar foi estimulada com solução aquosa de Cloridrato de Pilocarpina a 0,5% (Fórmula Manipulada. Pharmapele, Recife, PE, Brasil), na dose de 0,4 mg/Kg de peso corporal, injetada por via intraperitoneal. Posteriormente os animais foram colocados em um detentor de animais multiunidade projetado para permitir o recolhimento de vários animais ao mesmo tempo em posição de decúbito ventral, inclinado para frente dos animais em torno de 8 graus, impedindo que os animais engolissem a saliva (BENARD et al., 1956).

Para cada animal, foi verificado, desde o momento da injeção intraperitoneal da pilocarpina, o tempo que se levou para iniciar a salivação (*fase lag*), seguindo do tempo de fluxo máximo, por um período de 40 minutos. A saliva mista foi coletada diretamente da boca dos animais através de gotejamento em pote coletor universal de 80 mL. O período entre a injeção da pilocarpina e a primeira gota de saliva foi considerado como *fase lag* (LÓPEZ-SOLÍS et al., 2001). Posteriormente 1 mL da saliva secretada foi alíquotada com pipetador automático (Eppendorf do Brasil, São Paulo, SP, Brasil), armazenada em tubos de microcentrífuga de 2 mL estéreis

(Eppendorfs, São Paulo, SP, Brasil), mantidos em gelo e centrifugada à 5000 rpm por 5 minutos, para remover possíveis células da mucosa oral. O precipitado foi descartado e o sobrenadante transferido para novos tubos estéreis e congelados em *freezer* na temperatura de -20°C , até o momento das análises.

6.8. Colheita e Fixação do Complexo Submandibular-Sublingual e Linfonodos

Nas respectivas datas de cada subgrupo (12 e 35 dias após as injeções intraglandulares), os animais foram novamente pesados e anestesiados com injeção intramuscular de xilazina e quetamina, conforme descrito anteriormente, e a saliva novamente coletada. Após a coleta da saliva, foi realizada antissepsia da região cervical dos animais com digluconato clorexidina a 2%, seguida de incisão cervical mediana com lâmina de bisturi n.º 15 (Embramed, Medjet – produtos para Saúde Glória, Joinville, Santa Catarina), divulsão dos tecidos com tesoura de ponta romba, exposição do complexo submandibular-sublingual e linfonodos associados, e posteriormente sua excisão (sialoadenectomia unilateral) (JONJIC, 2001).

Imediatamente os complexos submandibulares-sublinguais foram seccionados transversalmente e juntamente com os linfonodos, fixados em formol 10% tamponado, pH 7,2 por 48 horas, para processamento histológico convencional (TIMM, 2005).

6.9. Colheita de Sangue, Fígado e dos Rins

Após a sialoadenectomia da glândula submandibular direita, procedeu-se com a abertura da cavidade torácica do animal com a exposição do coração. Com seringa descartável de 5 mL (Luer Lock, Descarpack, Fibra Cirúrgica, Joinville, Santa Catarina, Brasil), foi feita punção cardíaca de 4 mL a 5 mL de sangue, armazenado em tubos tipo Falcon estéril de 15 mL (Global Trade, Monte Alto, São Paulo, Brasil) sem anticoagulante ou ativador de coágulos e mantido em repouso (COSTA et al., 2012). Para o procedimento, os animais não estavam sob jejum (CASTRO et al., 2014). Posteriormente foi realizada uma incisão na cavidade abdominal dos animais, o fígado

e rins foram removidos (MÖLLER e VAZQUEZ, 2011), fixados em formol 10% tamponado, pH 7,2. Os animais foram descartados seguindo as normas do COBEA.

Após a retração completa do coágulo, deixados a temperatura ambiente por 30 minutos, as amostras foram centrifugadas à 3000 rotações por minuto (rpm), a 22 °C, durante dez minutos para separação do plasma e obtenção do soro sanguíneo, e assim realizar as dosagens dos parâmetros bioquímicos. O soro sobrenadante foi acondicionado em tubos de polipropileno (Eppendorfs do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) e congelado a -20°C até o momento das análises. O congelamento ocorreu para fazer as análises de todas os grupos em um único momento. Todas as amostras foram descongeladas apenas no momento de processamento.

6.10. Confeção das Preparações Histológicas

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 min), banho de álcool e xilol (proporção de 1:1), diafanização com xilol (dois banhos de 40 min), embebição (3 banhos de 1 h) e inclusão em parafina histológica. Cortes histológicos semisseriados (1:5) foram obtidos com aproximadamente 5 µm, através de um micrótomo LEICA RM 2125 RT (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Alemanha), utilizando-se navalha LEICA 818 (Leica Biosystems). Os cortes foram estirados em banho-maria histológico (Lup-tec, São Carlos, SP, Brasil), dispostos em lâminas de vidro 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), montados em Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) (TIMM, 2005).

6.11. Estudo Histológico do Complexo Submandibular-Sublingual

As preparações histológicas coradas em hematoxilina e eosina (HE) foram observadas, analisadas qualitativamente e fotografadas em fotomicroscópio binocular de luz LEICA ICC50 HD® (Leica Microsystems, São Paulo, Brasil) acoplado a uma

câmera digital, conectado a um computador com placa de captura de imagem (ATI) através do *software* de captura Leica LAS EZ[®] (Leica Microsystems, Buffalo Grove, EUA). As imagens obtidas possuem 2048 pixels de largura por 1536 pixels de altura (3.145.728 pixels total de resolução). O *software* de captura Leica LAS EZ[®] (Leica Microsystems) convertia as unidades de medida (pixels) em unidades de micrometros (μ). O brilho e o contraste de algumas imagens obtidas foram ajustados através do *software* Adobe[®] Photoshop CC[®] (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, EUA).

Dois examinadores calibrados, através do uso de mascaramento (estudo duplo-cego), fizeram a descrição das estruturas glandulares, observando: 1 – aspectos morfológicos dos ácinos serosos e mucosos; 2 – aspectos dos ductos intercalares, granuloso e estriado; 3 – aspectos e abundância do estroma glandular; e 4 – presença ou ausência de infiltrado inflamatório.

6.12. Técnica de TUNEL por Fluorescência

Os cortes histológicos foram dispostos em lâminas silanizadas a 4% (3-aminopropil-trietoxi silano), tratada com um adesivo de Poly-L-Lisina, (StarFrost[®], Adhäsiv-Silan, Knittel, Alemanha), desparafinizados em xilol, re-hidratados e submetidos ao procedimento TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*). Para detecção da atividade apoptótica, foi utilizado o *ApopTag[®] Red in Situ Apoptosis Detection Kit* (Chemicon[®], Merk Millipore, Darmstadt, Alemanha), segundo protocolo do fabricante. O método TUNEL foi realizado com base nas publicações de Gavrieli, Sherman, Ben-Sasson (1992), Negoescu et al. (1996, 1998) e Darzynkiewicz, Galkowski, Zhao (2008), aprimorados com a incorporação de dUTP (*2'-Deoxyuridine-5'-Triphosphate*) modificados com fluoróforos.

O protocolo consistiu em imergir os cortes em uma solução de 800U/mL de Proteinase K em solução salina tampão fosfato (PBS 0.01M, pH 7,4) por 15 minutos e incubados em uma solução contendo deoxinucleotidil-transferase (TdT), e nucleotídeos, por 60 minutos a 37°C. Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo antidigoxigenina conjugado à rodoamina. Posteriormente foram contracolorados com o DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) (Sigma-

Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA) e montado utilizando um meio *antifading* (ProLong® Diamond Antifade Mountant, Merk Millipore, Darmstadt, Alemanha).

As lâminas foram observadas utilizando um microscópio de fluorescência Axioplan Zeiss® (Zeiss, Göttingen, Germany), à magnificação de 200x, utilizando os seguintes filtros: 488 nm (TUNEL) e 350 nm (DAPI). As imagens foram adquiridas utilizando a câmera digital AxioCam MRm® e *software* de imagem AxioVision® (Zeiss, Germany). A análise qualitativa foi realizada com mascaramento (estudo duplo-cego).

6.13. Análise Bioquímica da Saliva

6.13.1. Atividade Proteolítica Total

A atividade proteolítica foi determinada utilizando azocaseína como substrato, de acordo com Azeez et al. (2007). Alíquota da amostra (20 µL) mais 80 µL de água destilada foram incubadas com 300 µL de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5, contendo azocaseína a 0,6% (p/v). Após adição de 100 µL de Triton X-100 0,1% (v/v), a mistura foi incubada a 37°C por 3 horas. A reação foi interrompida com a adição de 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) à 10% (p/v) e a mistura foi incubada a 4°C por 30 minutos. Em seguida, realizou-se centrifugação (9.000 rpm por 10 min) e a absorbância a 366 nm do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro GeneQuant 1300 (Exon Biotec, Belo Horizonte, MG, Brasil). Os ensaios-controle diferiram dos ensaios-teste apenas no momento da adição do TCA, a qual foi realizada antes da incubação a 37°C por 3 horas. Atividade proteolítica específica foi calculada através da razão entre a atividade enzimática (U), que corresponde à quantidade de enzima que aumenta em 0,01 a absorbância em relação ao teste controle, e a quantidade de proteínas (mg) utilizada no teste. Os ensaios foram realizados simultaneamente em triplicata, para se obter o máximo de padronização, e os valores foram expressos como média ± DP.

6.13.2. Dosagem de Proteínas

A estimativa da concentração de proteínas foi realizada de acordo com Lowry et al. (1951), utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina (31,25 a 500 µg/mL). A amostra (0,2 mL) foi incubada por 10 minutos com 1 mL de uma solução

alcalina de cobre (1 mL de sulfato de cobre 0,5% [p/v] em citrato de sódio 1% [p/v]) e 50 ml de solução de carbonato de sódio 2% (p/v) em hidróxido de sódio 1% (p/v). Após incubação a 28°C, 0,1 mL do reagente de Folin-Ciocalteus (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), diluído 1:1 com água, foram adicionados e, após 30 minutos, a concentração do produto final da reação, de cor azul, a absorbância a 720 nm foi determinada em espectrofotômetro DR 5000 (Hach Company, Loveland, Colorado, EUA). As dosagens foram realizadas simultaneamente em duplicata para se obter o máximo de padronização, e os valores foram expressos como média \pm DP.

6.13.3. Detecção de α -Amilase

A detecção da atividade de α -Amilase foi realizada com base no método descrito por Bernfeld (1955), utilizando amido como substrato. Amostras de saliva (100 μ L) foram incubadas a 50°C por 10 minutos contendo 400 μ L de uma solução de amido 1% em acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5 contendo CaCl_2 0,02 M e NaCl 0,15 M. A reação foi bloqueada pela adição de 500 μ L de DNS (ácido dinitrosalicílico, ácido 3-amino-5-nitrosalicílico). Após, os ensaios foram aquecidos a 100°C em água fervente por 6 minutos e imediatamente resfriados em gelo por 15 minutos. A absorbância a 540 nm foi determinada em espectrofotômetro de microplacas EpochTM, gerenciado pelo *software* Gen5 2.06 (Biotek, Winooski, VT, EUA). A quantidade de açúcares redutores liberados foi determinada por uma curva de calibração de glicose na qual $y = 0,0026x + 0,4153$. Uma unidade de atividade de α -Amilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para gerar 1 μ mol de glicose por minuto. As reações dos brancos foram realizadas sem o uso de amido ou das amostras. Todas as análises foram realizadas simultaneamente em duplicata para obter o máximo de padronização, e os valores foram expressos como média \pm DP.

6.13.4. Ionograma da Saliva

Alíquotas 150 μ L de cada amostra foram pré-diluídas, depositas em cubetas plásticas de 5 mL e analisadas automaticamente por um analisador para testes bioquímicos e imunoquímicos, o LabMax 240[®] (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil) a temperatura de 37°C, e com controle interno de qualidade e re-

testagem. A metodologia seguiu o Procedimento Operacional Padrão (POP) da empresa Labtest Diagnóstica S.A.

O ionograma constou da mensuração dos seguintes eletrólitos: cálcio total, cloreto, fósforo, potássio e sódio. Para a dosagem, foram utilizados os reagentes: Cálcio Arsenazo Liquiform, Cloreto Liquiform, Fósforo, Potássio Enzimático e Sódio Enzimático (Labtest®, Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil). As análises foram realizadas num mesmo período, de maneira a se obter o máximo de padronização.

6.14. Análise Fúngica

6.14.1. Preparação para o Diagnóstico Micológico

As amostras de isolados fúngicos coletadas foram semeadas na superfície do meio Ágar Sabourand dextrose (DIFCO, Maryland, EUA) suplementado de 50 mg/L de cloranfenicol contido em placas de Petri, mantidas à temperatura de 37°C por até 15 dias. Após o surgimento das colônias, estas foram purificadas a partir de suspensões com água destilada esterilizada adicionada de 50mg/L de cloranfenicol e semeadas em estrias para posterior identificação.

6.14.2. Identificação dos Isolados

Os isolados foram identificados a nível de gênero de acordo com as características morfológicas macroscópicas e microscópicas, bem como pela sua capacidade de crescimento em meio de cultura (Ágar de Sabourand), de acordo a taxonomia clássica e auxílio de manuais de identificação.

- Características macroscópicas: fragmentos da cultura foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo os meios Ágar Sabourand, Ágar Extrato de Malte e Ágar Batata Dextrose (BDA) (LACAZ et al., 2002), acordo com o fungo em estudo. As placas foram mantidas a 30°C e a 37°C por até 15 dias e após este período, foram realizadas as diferentes análises fenotípicas como diâmetro, bordas, textura e coloração do verso e reverso das colônias, produção de pigmentos e tempo de crescimento (RAPPER e FENNEL, 1977;

BARNETT, PAYNE, YARROW, 2000; HOOG et al., 2000; KLICH, 2002; SIDRIM e ROCHA, 2004);

- Características microscópicas: a verificação de microestruturas somáticas e reprodutivas foi realizada pela técnica de microcultivo de Dalmau (1929) (cultivo em lamínula), na qual fragmentos das colônias foram semeados em três pontos equidistantes em placas Petri contendo o meio de cultura específico para cada grupo de fungos, e sobre estas colocadas lamínulas previamente esterilizadas. A preparação permaneceu a temperatura de 37°C por aproximadamente 7 a 15 dias, conforme a espécie em estudo. As lamínulas do cultivo foram retiradas e invertidas sobre uma lâmina de vidro, contendo 40 µL de Azul de Amann e observação através de um microscópio óptico biológico Olympus Cx21 (Olympus Optical do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) (CARRANZA, 1949; RAPPER e FENNEL, 1977; BARNETT, PAYNE, YARROW, 2000; HOOG et al., 2000; KLICH, 2002; SIDRIM e ROCHA, 2004).

6.14.3. Perfil de Sensibilidade *in vitro* a Antifúngicos

O ensaio de sensibilidade a antifúngicos foi desenvolvido segundo a técnica de microdiluição em caldo, por meio do protocolo M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), modificado. Foram utilizados 3 antifúngicos disponíveis comercialmente, de classes diferentes: Cetoconazol (KTC) (Química Farmacêutica, Bayer, Barcelona, ESP), Ciclopirox Olamina (CPOA) (Aventis, Dermik Laboratories, Berwyn, PA, EUA), Anfotericina B (AMB) (UNIANF®, SP, BRA).

A solução-estoque dos antifúngicos foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO; Vetec, Brasil) e, posteriormente, realizaram-se diluições no meio RPMI 1640 (Meio de cultura desenvolvido por *Roswell Park Memorial Institute*, Sigma, St. Louis, MO, EUA) tamponado a pH 7,0 com 165 mM de ácido morfolino-propanosulfônico (MOPS; Sigma, Vetec, Brasil), para obter as concentrações (doses) máximas e mínimas das drogas: para KTC, 64 a 0,125 µm/mL; e para a AMB e CPOA, 0,03 a 16 µm/mL.

Os isolados que cresceram em placas, foram repicados em Ágar batata-dextrose (DIFCO, Detroit, MI, EUA), acrescidos de 2% de farinha de arroz (Maninho, Brasil) e mantidos a 28°C por 2 dias. Após isso foi recolhida uma amostra de celularidade de cada isolado e realizada uma suspensão em 5 mL de solução salina 0,85%

e ajustada em espectrofotômetro (Shanghai Spectrum Instruments Co., Ltd., Xangai, China) até atingir densidade celular com transmitância de 80-82% a 530 nm.

Em placas de microtitulação de fundo chato com 96 poços, foram dispostos 100 μ L de meio RPMI 1640 mais o MOPS (RPMI-MOPS), distribuídos nas colunas 11 e 12, as quais foram utilizadas como controle de crescimento (controle positivo, só o fungo) e de esterilização (controle negativo, só a droga), respectivamente. No poço 1 foi colocada a dose máxima de cada droga: KTC, 64 μ m/mL; AMB, 16 μ m/mL; e CPOA, 16 μ m/mL. Em seguida, a dose máxima foi diminuída pela metade em cada poço subsequentemente, até chegar no poço 10 com a dosagem mínima da droga: KTC, 0,125 μ m/mL; AMB, 0,03 μ m/mL; e CPOA, 0,03 μ m/mL. O volume de 100 μ L de cada uma das diluições das drogas foram depositados nas colunas de 1 a 10.

Em seguida, 100 μ L do inóculo padronizado foram adicionados aos poços com o meio RPMI-MOPS das colunas 1 a 11, diluído na proporção 1:50, sendo as microplacas incubadas a 35°C por 48 horas. As placas de microtitulação foram incubadas a 28°C por 3 dias. A cepa de *Candida krusei* ATCC 6258 foi utilizada como controle de qualidade dos testes. Os testes foram realizados em duplicata.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM ou MIC, ou seja, a quantidade de droga necessária para não haver crescimento de células fúngicas) foi realizada visualmente por comparação com o crescimento do controle livre de fármaco. A MIC foi definida como a menor concentração de fármaco capaz de inibir totalmente o crescimento fúngico para as drogas utilizadas. Após a realização dos testes de sensibilidade antifúngica, o perfil de sensibilidade foi analisado tendo como referência o protocolo M38-A2 do CLSI (2008).

6.15. Análise Bioquímica Sérica

Foram realizados os seguintes exames bioquímicos sorológicos para determinação das funções hepáticas: alanina aminotransferase (ALT ou TGP), aspartato aminotransferase (AST ou TGO), gama-glutamil transferase (Gama-GT ou GGT), fosfatase alcalina (FA) e albumina sérica. Para determinação das funções renais, realizaram-se análises de creatinina e ureia séricas.

As análises bioquímicas foram realizadas no Analisador Bioquímico Semiautomático Bio-200F (Bioplus[®], Barueri, São Paulo, Brasil) a temperatura de 37°C, utilizando kits bioquímicos comerciais específicos da Doles[®] Reagentes (Goiânia, Goiás, Brasil), seguindo a orientação do fabricante. Os kits utilizados foram: ALT/TGP Cinética; AST/TGO Cinética; Glutamiltransferase; Fosfatase Alcalina Cinética; Creatinina; Ureia UV; e Albumina. Todas as análises foram realizadas num mesmo período, de maneira a se obter o máximo de padronização.

Para as análises das enzimas hepáticas (ALT, AST e GGT), foram utilizados 100 µL da amostra para 1 mL do reagente de trabalho. Para a FA, utilizou-se 20 µL da amostra para 1 mL do reagente de trabalho. Os valores de TGO, TGP, GGT e FA foram expressos em U/L, de acordo com o kit utilizado. Para determinação dos valores de albumina, foram utilizados 10 µL da amostra para 2 mL do reagente de trabalho. A amostra foi incubada na temperatura ambiente por 2 min, com posterior realização da leitura, onde os valores foram expressos em g/dL, de acordo com o kit utilizado.

Para avaliação da função renal, os valores de ureia foram obtidos utilizando 10 µL do soro sanguíneo para 1 mL do reagente de trabalho. A determinação da ureia sérica utilizou-se um sistema enzimático por fotometria UV e cinética de dois pontos, onde resultados foram calculados a partir da diferença de absorvância entre os dois períodos de tempo e expressos em mg/dL. Já para a determinação dos valores da concentração de creatinina, utilizou-se 100 µL da amostra para 1 mL do reagente de trabalho, através de um procedimento cinético otimizado em dois pontos, sendo os resultados expressos em mg/dL, de acordo com o kit utilizado (CASTRO et al., 2014).

6.16. Ionograma do Soro Sanguíneo

Foram utilizadas 150 µL de cada amostra do soro sanguíneo, pré-diluídas, colocadas em cubetas plásticas de 5 mL e analisadas automaticamente por um analisador para testes bioquímicos e imunoquímicos, o LabMax 240[®] (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, MG, Brasil) a temperatura de 37°C. Foram dosados os íons fósforo, cálcio, cloreto, sódio e potássio, utilizando os reagentes específicos da Labtest Diagnostica AS (Lagoa Santa, MG, Brasil). Todas as análises foram realizadas

num mesmo período e em duplicata, de maneira a se obter o máximo de padronização, minimizando a variabilidade analítica.

6.17. Análises Histopatológicas do Fígado e dos Rins

Assim como descrito no item 6.9, fragmentos dos fígados e metade de cada rim dos animais foram processados para a técnica histológica convencional, corados com hematoxilina e eosina (HE). O diagnóstico histopatológico se deu pela observação em microscópio de luz LEICA ICC50 HD[®], sob foco fixo e clareza de luz. A análise descritiva e qualitativa foi realizada por dois examinadores calibrados, e através do uso de mascaramento (estudo duplo-cego).

6.18. Análise Estatística

Os dados obtidos dos resultados dos testes bioquímicos salivares e sorológicos foram tabulados em planilha do programa *Microsoft Office Excel 2016* para *Windows 10* (*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. Para avaliar as diferenças entre os grupos de estudo, os dados paramétricos foram submetidos ao teste Análise de Variância (ANOVA) com de comparações múltiplas *post-Hoc de Tukey*. Quando os dados não foram considerados normais, utilizou-se o *Kruskal Wallis Test*, com verificação dois a dois para amostras independentes através do *Mann-Whitney U Test*, em caso de diferenças significativas.

O software *SPSS Statistics Desktop*[®] 22.0 (*IBM, International Business Machines Corp.*, New York, EUA) foi usado para a realização das análises estatísticas. Todas as conclusões levaram em consideração o nível de significância de 0,05 (5%), ou seja, *p*-valor menor ou igual a 0,05 (intervalo de confiança de 95%). Os dados foram apresentados como média aritmética \pm SD (desvio padrão) (FIELD, 2009).

REFERÊNCIAS

- ABARCA, M.L.; BRAGULAT, M.R.; BRUGUERA, M.T.; CABAÑES, F.J. Saprophytic fungi on hair and feathers from apparently healthy animals. *Microbiologia*, v. 5, n. 2, p.121-125, 1989.
- ADRIENN, B. *Examination of amylase secretion in rat parotid gland*. 15 f. (Tese - Doutorado em Pesquisa Dentária). Semmelweis University, Budapest, 2006.
- AFFONSO, S.Q.; CRUZ, S.E.B. Disfunções salivares medicamentosas e suas implicações no paciente odontogeriátrico. *ROPLAC*, v. 3, n. 1, p. 52-60, 2013.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Prosigne*[®]. Distrito Federal, 2003. Disponível em <http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto/consulta_medicamento.asp>. [Acesso em 13 jul. 2016].
- ALAM, S.Q.; ALAM, B.S. Fatty Acid Composition of Submandibular Salivary Gland Lipids in Essential Fatty Acid Deficient Rats. *J. Nutr.*, v. 108, p. 1642-1651, 1978.
- ALLEN, C.M. Diagnosing and Managing Oral Candidiasis. *J. Am. Dent. Assoc.*, v. 123, n. 1, p. 77-82, 1992.
- ALMEID, O.P.; SCULLY, C. Fungal infections of the mouth. *Braz J Oral Sci*. v. 1, n. 1, p. 19-26, 2002.
- ALTER, K.E. High-Frequency Ultrasound Guidance for Neurotoxin Injections. *Phys Med Rehabil Clin N Am.*, v. 21, p. 607-630, 2010.
- ALVARENGA, A.; CAMPOS, M.; DIAS, M.; MELÃO, L.; ESTEVÃO-COSTA, J. BOTOX-A injection of salivary glands for drooling. *J Pediatr Surg.*, p. 1-4, 2016.
- AMANO, O.; MIZOBE, K.; BANDO, Y.; SAKIYAMA, K. Anatomy and histology of rodent and human major salivary glands: overview of the Japan salivary gland society-sponsored workshop. *Acta Histochem Cytochem*, v. 45, n. 5, p. 241-250, 2012.
- 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. *J. bras. oclusão, ATM dor orofac.*, v. 3, n. 10, p. 170-173, 2003.
- ANDERSON, L.C.; GARRETTT, J.R.; ZHANGT, X.S.; PROCTORT, G.P.; SHORIT, D.K. Submandibular granular ducts require different sympathetic impulse pattern for secretion than acini in anaesthetized rats. *J. Physiol.*, p. 59, 1994.
- ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p.
- AOKI, K.R.; GUYER, B. Botulinum toxin type A and other botulinum toxin serotypes: a comparative review of biochemical and pharmacological actions. *Eur. J. Neurol.*, v. 8, Suppl. 5, p. 21-29, 2001.

AOKI, K.R. Pharmacology and immunology of botulinum toxin serotypes. *J Neurol*, v. 248, suppl. 1, p. I/3-I/10, 2001.

ARAUJO, F.R.G.; CASTRO, C.M.M.B.; SEVERO, M.S.; DINIZ, M.F.A.; VIANA, M.T.; EVÊNCIO, L.B. Normal microbiota of the perialveolar region of incisors of rats. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 59, p. 1586-1588, 2007.

ARELLANO-SALDAÑA, M.; RODRÍGUEZ-SILVERIO, J.; MORALES-OSORIO, M.G.; ARENAS-SORDO, M.L. Eficacia clínica de la aplicación de toxina botulínica tipo A en las glándulas submaxilares para el tratamiento de la sialorrea profusa en pacientes pediátricos con parálisis cerebral. *Investigación en Discapacidad*, v. 3, n. 3, p. 101-105, 2014.

AUB, D.L.; PUTNEY JR., J.W. Mobilization of intracellular calcium by methacholine and inositol 1,4,5-triphosphate in rat parotid acinar cells. *J. Dental Res.*, v. 66, p. 547-551, 1987.

AUGUSTO, A.G.; PEREZ, A.C. Babação. Investigação quanto aos melhores métodos terapêuticos. *Acta ORL*, v. 24, n. 1, p. 1-6, 2006.

AURE, M.H.; RUUS, A.-K.; GALTUNG, H.K. Aquaporins in the adult mouse submandibular and sublingual salivary glands. *J Mol Histol.*, v. 45, n. 1, p. 69-80, 2014.

AZEEZ, A.; SANE, A.P.; BHATNAGAR, D.; NATH, P. Enhanced expression of serine proteases during floral senescence in *Gladiolus*. *Phytochemistry*, v. 68, p. 1352-1357, 2007.

BACHUR, T.; VEÍSSIMO, D.; SOUZA, M.; VASCONCELOS, S.; SOUSA, F. Toxina Botulínica: de Veneno a Tratamento. *Revista Eletrônica Pesquisa Médica*, v. 3, n. 1, p. 9-19, 2009.

BAIZABAL-CARVALLO, J.F.; JANKOVIC, J.; PAPPERT, E. Flu-like symptoms following botulinum toxin therapy. *Toxicon*, v. 58, p. 1-7, 2011.

BALFANZ, J.; RAUTENBERG, P.; ULLMANN, U. Molecular Mechanisms of Action of Bacterial Exotoxins. *Zbl. Bakt.*, v. 284, p. 170-206, 1996.

BANERJEE, K.J.; GLASSOM, G.; O'FLAHERTY, S.J. Parotid and submandibular botulinum toxin A injections for sialorrhoea in children with cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol.*, v. 48, n. 11, p. 883-887, 2006.

BARBIERI, D.S.V.; VICENTE, V.A.; FRAIZ, F.C.; LAVORANTI, O.J.; ESTIVALET SVIDZINSKI, T.I.; LAMEIRA PINHEIRO, R. Analysis of the in vitro adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *Braz J Microbiol*, v. 38, p. 624-631, 2007.

BARBOSA, D.B.; TAGA, R. Estudo Estereológico dos Diferentes Componentes Estruturais de Glândulas Submandibulares de Ratos Machos e Fêmeas. *Revista FOB*, v. 5, n. 3/4, p. 51-57, 1997.

BARREIRA, J.A.C.S. **Paralisia Facial Periférica: Impacto na Qualidade de Vida**. 66 f. (Dissertação – Mestrado em Medicina), Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2010.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeast: characteristics and identification**. 3ª edição Cambridge: Universitypress, p. 1139, 2000.

BARRETT, K.E.; BARMAN, S.M.; BOITANO, S.; BROOKS, H.L. **Fisiologia Médica de Ganong**. 24ª edição. Porto Alegre: Artmed. 2014. 752p.

BARROSO, E.; MARTÍN, V.; MARTÍNEZ-CUESTA, M.C.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Stability of saliva microbiota during moderate consumption of red wine. **Arch Oral Biol**, v. 60, p. 1763-1768, 2015.

BASCIANI, M.; RIENZO, F.; FONTANA, A.; COPETTI, M.; PELLEGRINI, F.; INTISO, D. Botulinum toxin type B for sialorrhoea in children with cerebral palsy: a randomized trial comparing three doses. **Dev Med Child Neurol.**, v. 53, p. 559-564, 2011.

BAUM, B.J. Principles of saliva secretion. **Ann N Y Acad Sci**, v. 694, p. 17-23, 1993.

BELAZI, M.; VELEGRAKI, A.; KOUSSIDOU-EREMONDI, T.; ANDREADIS, D.; HINI, S.; ARSENIS, G.; ELIOPOULU, C.; DESTOUNI, E.; ANTONIADES, D. Oral Candida isolates in patients undergoing radiotherapy for head and neck cancer: prevalence, azol susceptibility profiles and response to antifungal treatment. **Oral Microbiol Immunol**, v. 19, p. 347-351, 2004.

BENARD, M.A; FABIAN, F.W.; ROSEN, S.; HOPPERT, C.A.; HUNT, H.R. A Method for the Collection of Large Quantities of Rat Saliva. **J. Dent Res**, v. 35, p. 326-327, 1956.

BENEDICTIS, F.M.; CARNIELLI, V.P.; BENEDICTIS, D. Aspiration Lung Disease. **Pediatr Clin N Am**, v. 56, p. 173-190, 2009.

BERNFELD, P. Amylases, α and β . **Methods Enzymol**, v. 1, p. 149-158, 1955.

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

BHAYANI, M.K.; SUSKIND, D.L. The use of botulinum toxin in patients with sialorrhoea. **Oper. tech. otolaryngol. - Head Neck Surg**, v.19, n. 4, p. 243-247, 2008.

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

BLASCO, P.A. The treatment of drooling. **Dev Med Child Neurol.**, v. 52, p. 984, 2010.

BLITZER, A.; SULICA, L. Botulinum toxin: basic science and clinical uses in otolaryngology. **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. **J. Neurol**, v. 256, n. 8, p. 1382-1383, 2009.

BOMELI, S.R.; DESAI, S.C.; JOHNSON, J.T.; WALVEKAR, R.R. Management of salivary flow in head and neck cancer patients – A systematic review. **Oral Oncol.**, v. 44, p. 1000-1008, 2008.

BORG, M.; HIRST, F. The role of radiation therapy in the management of sialorrhea. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.**, v. 41, v. 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. **Pediatr Neurol**, v. 27, n. 1, p. 18-22, 2002.

BOTOX®. [Bula]. **Bula para o profissional de Saúde**. 32 f. Farmacêutico Responsável: Dra. Elizabeth Mesquita – CRF/SP nº 14.337. Westport, Irlanda: Allergan Pharmaceuticals Ireland; 2015.

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

BRALIC, M.; MUHVIC-UREK, M.; STEMBERGA, V.; GOLEMAC, M.; JURKOVIC, S.; BORCIC, J.; BRAUT, A.; TOMAC, J. Cell Death and Cell Proliferation in Mouse Submandibular Gland during Early Pos-irradiation Phase. **Acta Med. Okayama**, v. 59, n. 4, p. 153-159, 2005.

BREHERET, R.; BIZON, A.; JEUFROY, C.; LACCOURREYE, L. Ultrasound-guided botulinum toxin injections for treatment of drooling. **Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.**, v. 128, n. 5, p. 224-229, 2011.

BRIN, M.F. Botulinum toxin: chemistry, pharmacology, toxicity and immunology. **Muscle Nerve**, Suppl 6: S146-S168, 1997.

BROCCO, S.L.; TAMARIN, A. The topography of rat submandibular gland parenchyma as observed with S.E.M. **Anat. Res.**, v. 194, n. 3, p. 445-460, 1979.

BRODSKY, M.A.; SWOPE, D.M.; GRIMES, D. Diffusion of Botulinum Toxins. **Tremor Other Hyperkinet Mov**, v. 2, p. 1-7, 2012.

BROWN-GRANT, K.; TAYLOR, W. The Relation Between Structure and the Concentration of Iodide by the Submandibular Glands of Mice and Hamsters. **J Physiol.**, v. 165, p. 508-518, 1963.

BUDTZ-JÓRGENSEN, E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. **Acta Odontol Scand**, v. 48, p. 61-69, 1990.

CALIL, C.M.; TAMBELI, C.H. **Fisiologia da secreção salivar**. In: KRIGER, L.; MOYSÉS, S.J.; MOYSÉS, S.T.; MORITA, M.C.; TAMBELI, C.H. **Fisiologia Oral: Série Abeno (Odontologia Essencial - parte básica)**. Artes Médicas, 2014. 141 p.

CALLAWAY, J.E.; AREZZO, J.C.; GRETHLEIN, A.J. Botulinum Toxin Type B: An Overview of Its Biochemistry and Preclinical Pharmacology. **Dis Mon**, V. 48, p. 367-383, 2002.

CANNON, R.D.; HOLMES, A.R.; MASON, A.B.; MONK, B.C. Oral Candida: clearance, colonization, or candidiasis? **J Dent Res**, v. 74, n. 5, p. 1152-1161, 1995.

CAPACCIO, P.; TORRETTA, S.; OSIO, M.; MINORATI, D.; OTTAVIANI, F.; SAMBATARO, G.; NASCIMBENE, C.; PIGNATARO, L. Botulinum toxin therapy: a tempting tool in the management of salivary secretory disorders. **Otolaryngol Head Neck Surg.**, v. 29, p. 333-338, 2008.

CARAMIA, F. Ultrastructure of Mouse Submaxillary Gland: I. Sexual Differences. **J. Ultrastructure Research**, v. 16, p. 505-523, 1966a.

CARAMIA, F. Ultrastructure of Mouse Submaxillary Gland; II. Effect of Castration in the Male. **J. Ultrastructure Research**, v. 16, p. 524-536, 1966b.

CARDONA, I.; SAINT-MARTIN, C.; DANIEL, S.J. Salivary glands of healthy children versus sialorrhea children, is there an anatomical difference? An ultrasonographic biometry. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, 79, n. 5, p. 644-647, 2015.

CARPENTER, G.H.; PROCTOR, G.B.; GARRETT, J.R. Preganglionic parasympathectomy decreases salivary SIgA secretion rates from the rat submandibular gland. **J. Neuroimmunol**, v. 160, p. 4-11, 2005.

CARPENTER, G.H. The Secretion, Components, and Properties of Saliva. **Annu. Rev. Food Sci. Technol.**, n. 4, p. 267-276, 2013.

CARRANZA, J.M. **Técnicas e métodos elementares para el estudio de hongos sitopásitos**. 2ª edição, Universidad Nacional de La Plata, Bolívia, 1949.

CARRUTHERS, A. Botulinum Toxin Type A: History and Current Cosmetic Use in the Upper Face. **Dis Mon**, 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. **J Am Acad Dermatol.**, v. 53, n. 2, p. 284-290, 2005a.

CARRUTHERS, A.; CARRUTHERS, J. Dose-ranging study of botulinum toxin type A in the treatment of glabellar rhytids in females. **J Am Acad Dermatol**, v. 31, n. 4, p. 414-422, 2005b.

CARVALHO, J.F.B.; JANKOVIC, J.; PAPPERT, E. Flu-like symptoms following botulinum toxin therapy. **Toxicon**, v. 58, n. 1, p. 1-7, 2011.

CASTRO, B.A.A.; COLUGNATI, F.A.B.; CENEDEZE, M.A.; SUASSUNA, P.G.A.; PINHEIRO, H.S. Standardization of renal function evaluation in Wistar rats (*Rattus norvegicus*) from the Federal University of Juiz de Fora's colony. **J Bras Nefrol**, v. 36, n. 2, p. 139-149, 2014.

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

CAVALLINI, M. The setting of a botulinum toxin treatment service. *Neurol Sci*, v. 35, suppl 1, p. S49-S50, 2014.

CECCHINI, M.P.; PARNIGOTTO, M.; MERIGO, F.; MARZOLA, P.; TAMBALO, S.; BOSCHO, F.; COLOMBO, L.; SBARBATI, A. 3D Printing of Rat Salivary Glands: The Submandibular-Sublingual Complex. *Anat Histol Embryol*, v. 43, n. 3, p. 1-6, 2013.

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 jan. 2014].

CHAHUÁN, S.; ESPINOZA-PALMA, T.; CRUZAT, L.; SAUMANN, D.; BERNA, L. Sialorrea neurogénica infantil y el manejo con la toxina Botulínica: revisión de la literatura y reporte del caso de un niño con traqueostomía y ventilación mecánica crónica. *Neurol Pediatr*, v. 7, n. 1, p. 13-18, 2012.

CHALÉAT-VALAYER, E.; PORTE, M.; BUCHET-POYAU, K.; ROUMENOFF-TURCANT, F.; D'ANJOU, M.C.; BOULAY, C.; BERNARD, J.C.; TOUZET, S. Management of drooling in children with cerebral palsy: A French survey. *Eur J Paediatr Neurol.*, v. 20, p. 524-531, 2016.

CHAN, K.H.; LIANG, C.; WILSON, P.; HIGGINS, D.; ALLEN, G.C. Long-term Safety and Efficacy Data on Botulinum Toxin Type A. An Injection for Sialorrhea. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, v. 139, n. 2, p. 134-138, 2013.

CHAUDHRY, I.M.; MEYER, J. Response of Submandibular Gland of the Rat to Nutritional Zinc Deficiency. *J. Nutr*, v. 109, p. 316-320, 1979.

CHEN, S. Clinical Uses of Botulinum Neurotoxins: Current Indications, Limitations and Future Developments. *Toxins*, v. 4, n. 10, p. 913-939, 2012.

CHOI, J.H.; WU, H.-G.; JUNG, K.C.; LEE, S.H.; KWON, E.K. Apoptosis and Expression of AQP5 and TGF- β in the Irradiated Rat Submandibular Gland. *Cancer Res Treat*, v. 41, n. 3, p. 145-154, 2009.

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

CLEFF, M.B.; SILVA, G.M.; MEINERZ, A.R.M.; MADRID, I.M.; MARTINS, A.A.; FONSECA, A.O.; NASCENTE, P.S.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. Infecção cutânea em cão por *Candida albicans*. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v. 14, n. 2, p. 164-168, 2007.

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). *Normativas do CONCEA para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de Ensino ou Pesquisa Científica*. Brasília/DF: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), 2015. 221 p.

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). **Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCAs)**. Brasília/DF: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), 2013. 50 p.

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.

COFFIELD, J.A.; BAKRY, N.; ZHANG, R.D.; CARLSON, J.; GOMELLA, L.G.; SIMPSON, L.L. *In vitro* characterization of botulinum toxin types A, C and D action on human tissues: combined electrophysiologic, pharmacological and molecular biologic approaches. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 280, n. 3, p. 1489-1498, 1997.

COLHADO, O.C.G.; BOEING, M.; ORTEGA, L.B. Toxina Botulínica no Tratamento da Dor. **Rev Bras Anestesiol**, v. 59, n. 3, p. 366-381, 2009.

COLLINS, M.D.; EAST, A.K. Phylogeny and taxonomy of the food-borne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins. **J Appl Microbiol**, v. 84, p. 5-17, 1998.

CONNOLE, M.D.; YAMAGUCHI, H.; ELAS, D.; HASEGAWA, A.; SEGAL, E.; TORRES-RODRIGUEZ, J.M. Natural pathogens of laboratory animals and their effects on research. **Med. Mycol.**, v. 38, suppl. 1, p. 59-65, 2000.

COPE, G.H.; WILLIAMS, M.A. Improved preservation of parotid tissue for electron microscopy. **J. Cell Biol.**, v. 60, p. 292-297, 1974.

CORDIVARI, C.; MISRA, V.P.; CATANIA, S.; LEES, A.J. New Therapeutic Indications for Botulinum Toxins. **Mov Disord**, v. 19, suppl. 8, p. S157–S161, 2004.

CORIA-AVILA, G.A.; GAVRILA, A.M.; JACUBOVICH, M.; MENARD, S.; PFAUS, J.G. Severe cachexia and sialorrhea in a female rat. **Lab Animal**, v. 35, n. 1, p. 1-3, 2006.

CORNEJO, R.; NÚÑEZ, G.; AVILA, O.; GARCÍA, P. Morphological and Morfometric studies from rat submandibular acinars cells stimulated with ethanol. **Int. J. Morphol.**, v. 21, n. 1, 2003.

CORREIA, P.N.; CARPENTER, G.H.; PATERSON, K.L.; PROCTOR, G.B. Inducible nitric oxide synthase increases secretion from inflamed salivary glands. **Rheumatology**, v. 49, p. 48-56, 2010.

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.

CORTÉS-MONROY, C.; SOZA, S. Usos prácticos de la toxina botulínica en adultos en medicina física y rehabilitación. **Rev. Med. Clin. Condes**, v. 25, n. 2, p. 225-236, 2014.

COSTA, C.C.; FERREIRA, J.B. Injections of botulinum toxin into the salivary glands to the treatment of cronic sialorrhoea. **Rev. Bra. Cirur. Cab. Pescoç.**, v. 37, n. 1, p. 28-31, 2008.

COSTA, J.; ROCHA, M.L.; FERREIRA, J.; EVANGELISTA, T.; COELHO, M.; CARVALHO, M. Botulinum toxin type-B improves sialorrhoea and quality of life in bulbaronset amyotrophic lateral sclerosis. **J. Neurol**, v. 255, p. 545-550, 2008.

COSTA, J.P.; LOURENÇO, N.V.; SANTOS, C.C.M.; TOMÉ, A.R.; SOUSA, G.F.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R.N.; FREITAS, R.M. Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 33, n. 3, p. 421-428, 2012.

COSTANZO, L.S. **Fisiologia**. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2014. 520 p.

Council for International Organizations for Medical Science (CIOMS) e International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS). **International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals**. Washington (DC): National Academies Press (USA), 2012. 4 p. Disponível em <<http://www.cioms.ch/index.php/12-newsflash/326-cioms-and-iclas-release-the-new-international-guiding-principles-for-biomedical-research-involving-animals>>. [Acesso em 09 dez. 2014].

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. 12f. Disponível em <http://www.2cristalia.com.br/prosigne/mitos_e_verdades.pdf>. [Acesso em 12 jan. 2014].

CRYSDALE, W.S.; GREENBERG, J.; KOHEIL, R.; MORAN, R. The drooling patient: team evaluation and management. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 9, p. 241-248, 1985.

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. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 70, n. 3, p. 519-527, 2006.

D'ALMEIDA, J.A.C. **Estudo da Toxina Botulínica do Tipo "A" na Profilaxia da Migrânea sem Aura**. 94 f. (Tese – Doutorado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza (CE), 2004.

DANIEL, S.J.; CARDONA, I. Onabotulinum toxin A for the treatment of sialorrhoea in familial dysautonomia. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 78, p. 879-881, 2014.

DANIEL, S.J. Botulinum toxin injection techniques for pediatric sialorrhoea. **Oper. tech. otolaryngol.- head neck surg.**, v. 26, p. 42-49, 2015.

DALMAU, L.M. Remarques sur la technique mycologique. Caractères macroscopiques des cultures de champignons. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.**, v. 7, p. 536-541, 1929.

DARZYNKIEWICZ, Z.; GALKOWSKI, D.; ZHAO, H. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. **Methods**, v. 44, n. 3, p. 250-254, 2008.

D'AVOLA, T.E.; OGAWA, K.; SILVA, M.R.M.S.; MOTOYAMA, A.A.; INÁCIO, E.; KÖNIG JUNIOR, B.; WATANABE, I.-S. Three-dimensional characteristics of submandibular salivary gland of ageing rats: An HRSEM study. **Ann Anat.**, v. 188, p. 431-438, 2006.

DELPORTE, C.; BRYLA, A.; PERRET, J. Aquaporins in Salivary Glands: From Basic Research to Clinical Applications. **Int J Mol Sci.**, v. 17, n. 2, p. E166-178, 2016.

DHAKED, R.K.; SINGH, M.K.; SINGH, P.; GUPTA, P. Botulinum toxin: Bioweapon & magic drug. **Indian J Med Res.**, v. 132, n. 5, p. 489-503, 2010.

DÍA, R.C.R.; LOTERO, M.A.A.; SUAREZ, M.V.A.; SALDARRIGA, S.E.; MARTÍNEZ, M.G. Toxina botulínica para tratamiento del dolor crónico. Revisión de la evidencia. **Rev Colomb Anestesiol.**, v. 42, n. 3, p. 2005-213, 2014.

DIAS, L.; MARÇAL, L.; RODRIGUES, M.; ALVES, T.C.A.; PONDÉ, M.P. Eficácia da Toxina Botulínica no Tratamento da Hiperidrose. **Rev. Neurociências**, n. 9, v. 3, p. 93-96, 2001.

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. **J. Exp. Med**, v. 37, n. 5, p. 711-731, 1923.

DRESSLER, D. Botulinum toxin therapy: its use for neurological disorders of the autonomic nervous system. **J Neurol**, V. 260, p. 701-713, 2013.

DRESSLER, D.; ELEOPRA, R. Clinical use of non-A botulinum toxins: botulinum toxin type B. **Neurotox Res.**, v. 9, n. 2-3, p. 121-125, 2006.

DRESSLER, D.; HALLETT, M. Immunological aspects of Botox[®], Dysport[®] and Myobloc[™]/NeuroBloc[®]. **Eur. J. Neurol**, v. 13, suppl. 1, p. 11-15, 2006.

EDGAR, T.S. Clinical Utility of Botulinum Toxin in the Treatment of Cerebral Palsy: Comprehensive Review. **J. Child Neurol**, v. 26, n. 1, p. 37-46, 2001.

EKSTRÖM, J.; KEMPLAY, S.K.; GARRETT, J.R.; DUCHEM, W. Effect of botulinum toxin on the choline acetyltransferase activity in salivary glands of cats. **Experientia**, (specialia), p. 1458-1460, 1977.

ELIASSON, L.; CARLEN, A. An update on minor salivary gland secretions. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 118, n. 5, p. 435-442, 2010.

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. *Eur Arch Otorhinolaryngol.*, v. 256, n. 3, p. 148-152, 1999.

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

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. *Laryngoscope*, v. 112, n. 1, p. 82-86, 2002b.

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. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 61, n. 14, p. 454-457, 2003.

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. *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. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 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. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 64, n. 3, p. 397-401, 2006b.

ELLIES, E.; QUONDAMATTEO, F.; LASKAWI, R. Klinische Relevanz aktueller experimenteller Untersuchungen der Wirkung von Botulinum Toxin A auf Speicheldrüsengewebe. *Klin Neurophysiol*, v. 38, P54, 2007.

EMMELIN, N. Supersensitivity of salivary gland caused by botulinum toxin. *J Physiol*, v. 156, p. 121-127, 1961.

EMMELIN, E. Nerve Interactions in Salivary Glands. *J Dent Res*, v. 66, n. 2, p. 509-517, 1987.

ERASMUS, C.R.; HULST, K.V.; HOOGEN, F.J.V.D.; LIMBEEK, J.V.; ROELEVELD, N.; VEERMAN, E.C.; ROTTEVEEL, J.J.; JONGERIUS, P.H. Thickened saliva after effective management of drooling with botulinum toxin A. *Dev Med Child Neurol*, v. 52, p. e114-e118, 2010.

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? *Pediatr Neurol*, v. 45, n. 2, p. 95-99, 2011.

EVANS, R.L.; LAU, K.R.; CASE, R.M. Structural and functional characterization of striated ducts isolated from the rabbit mandibular salivary gland. *Exp Physiol.*, v. 78, n. 1, p. 49-64, 1993.

FAIRHURST, C.B.R.; COCKERILL, H. Management of drooling in children. *Arch Dis Child Educ Pract*, v. 96, n. 1, p. 25-30, 2011.

FERRARIS, M.E.G.; MUÑOZ, A.C. *Histologia e Embriologia Bucodental*. 2ª edição. Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2006. 409 p.

FIELD, A. P. *Discovering statistics using SPSS*. London, England, SAGE, 2009.

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-colgeno-para-vacinas>>. Acesso em 12 jan. 2014.

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.

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.*, v. 119, n. 3, p. 493-501, 1992.

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

GILL, D.M. Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiol Rev.*, v. 46, n. 1, p. 86-94, 1982.

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. *Br J Oral Maxillofac Surg*, v. 51, n. 3, p. 231-233, 2013.

GOMES-CARAVACA, M.T.; CÁCERES-REDONDO, M.T.; HUERTAS-FERNÁNDEZ, I.; VARGAS-GONZÁLEZ, L.; CARRILLO, F.; CARBALLO, M.; MIR, P. The use of botulinum toxin in the treatment of sialorrhoea in parkinsonian disorders. *Neurol Sci*, v. 36, p. 275-279, 2015.

GOMPERTZ, O.F.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R.; CORRÊA, B. *Micologia Especial e Clínica*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 2015. 1120 p.

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

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

HARRIS, A.J.; MILEDI, R. The effect of type D botulinum toxin on frog neuromuscular junctions. **J. Physiol.**, v. 217, n. 2, p. 497-515, 1971.

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

HEFFERNAN, C.; ADIL, E. Four-duct ligation. **Otolaryngol Head Neck Surg.**, v. 26, p. 39-41, 2015.

HEINEN, F. Sialorrhea 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.

HENDRICKSON, R.G.; MAROCCO, A.P.; GREENBERG, M.I. Pilocarpine toxicity and treatment of xerostomia. **J Emerg Med**, v. 26, n. 4, p. 429-432, 2004.

HISHIDA, S.; OZAKI, N.; HONDA, T.; SHIGETOMI, T.; UEDA, M.; HIBI, H.; SUGIURA, Y. Atrophy of submandibular gland by the duct ligation and a blockade of SP receptor in rats. **Nagoya J Med Sci.**, v. 78, n. 2, p. 215-227, 2016.

HOLMGREN, C.J.; CORBET, E.F.; LIM, L.P. Periodontal conditions among the middle-aged and the elderly in Hong Kong. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 22, n. 5, Pt 2, p. 396-402, 1994.

HOOG, G.S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUEIRAS, M. J. **Atlas of Clinical Fungi. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmiscultures**. 2ª edição. Baarn, 2000.

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

HOSOI, K. Physiological role of aquaporin 5 in salivary glands. **Pflügers Archiv - Eur J Physiol**, v. 468, n. 4, p. 519-539, 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Censo Demográfico 2010: Características gerais da população, religião e pessoas com deficiência**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/94/cd_2010_religiao_deficiencia.pdf>. [Acesso em 21 de jun 2016].

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

ISAÍAS, P.A.N.; DARÍO, R.M. Transtornos autonómicos. **Rev Mex Neuroci**, 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. *J Pharmacol Sci.*, v. 100, n. 5, p. 495-512, 2006a.

ISHIKAWA, Y.; CHO, G.; YUAN, Z.; INOUE, N.; NAKAE, Y. Aquaporin-5 water channel in lipid rafts of rat parotid glands. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1758, n. 8, p. 1053-1060, 2006b.

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

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

JAYASINGHE, N.R.; COPE, G.H.; JACOB, S. Morphometric studies on the development and sexual dimorphism of the submandibular gland of the mouse. *J. Anat.*, v. 172, p. 115-127, 1990.

JOHNSON, E.A.; BRADSHAW, M. Clostridium botulinum and its neurotoxins: a metabolic and cellular perspective. *Toxicon*, v. 39, n. 11, p. 1703-1722, 2001.

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. *Dev Med Child Neurol*, 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. *Eur. J. Pediatr.*, v. 160, n. 8, p. 509-512, 2001.

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

JONGERIUS, P.H.; VAN DEN HOOGEN, F.J.A.; VAN LIN BEEK, J.; GABREËLS, 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.

JONJIC, S. Surgical removal of mouse salivary glands. *Curr. Protoc. Immunol.*, Chapt. 1, Unit. 1.11, Suppl. 43, p. 1.11.1-1.11.4, 2001.

JORKJEND, L.; JOHANSSON, A.; JOHANSSON, A.K.; BERGENHOLTZ, A. Periodontitis, caries and salivary factors in Sjögren's syndrome patients compared to sex- and age-matched controls. *J Oral Rehab.*, v. 30, n. 4, p. 369-378, 2003.

JOST, W.H. The option of sonographic guidance in Botulinum toxin injection for drooling in Parkinson's disease. **J Neural Transm**, v. 123, p. 51-55, 2016.

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

KAZOR, C.E.; MITCHELL, P.M.; LEE, A.M.; STOKES, L.N.; LOESCHE, W.J.; DEWHIRST, F.E.; PASTER, B.J. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 2, p. 558-563, 2003.

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

KHADIVI, E.; ZADEH, F.A.; BAKHSHAEI, M.; FOOLADVAND, T.; MOVAHED, S.R.; NABAVI, S.S.; AGHAEI, M.A. Bilateral submandibular duct rerouting: Assessment of results on drooling in cerebral palsy cases. **Auris Nasus Larynx**, v. 40, p. 487-490, 2013.

KHAN, W.U.; CAMPISI, P.; NADARAJAH, S.; SHAKUR, Y.A.; KHAN, N.; SEMENUK, D.; McCANN, C.; ROSKE, L.; McCONNELLY-ELLIS, S.; JOSEPH, M.; PARRA, D.; AMARAL, J.; JOHN, P.; TEMPLE, M.; CONNOLLY, B. Botulinum Toxin A for Treatment of Sialorrhea in Children: An Effective, Minimally Invasive Approach. **Otolaryngol Head Neck Surg.**, v. 137, n. 4, p. 339-344, 2011.

KLICH, M.A. **Identification of common Aspergillus species**. 1ª ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002.

KONTTINEN, Y.T.; STEGAEV, V.; MACKIEWICZ, Z.; PAROLA, P.; HÄNNIENEN, A.; SZODORAY, P. Salivary glands – 'an unisex organ'? **Oral Dis**, 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. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 32, n. 7, p. 959-963, 2010.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; VACCARI, E.V.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**. 9ª ed. São Paulo: Editora Sarvier, 2002. 1120 p.

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. **J. Neurol**, v. 256, n. 4, p. 563-567, 2009.

LEBEDA, F.J.; CER, R.Z.; STEPHENS, R.M.; MUDUNURI, U. Temporal characteristics of botulinum neurotoxin therapy. **Expert Rev Neurother.**, v. 10, n. 1, p. 93-103, 2010.

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

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

LIMA, M.C.; SOTTOVIA-FILHO, D.; CESTARI, T.M.; TAGA, R. Morphometric characterization of sexual differences in the rat sublingual gland. ***Braz Oral Res***, v. 18, n. 1, p. 53-58, 2004.

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

LLENA-PUY, C. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. ***Med Oral Patol Oral Cir Bucal***, v. 11, p. E449-455, 2006.

LOMBAERT, I.; MOYAHEDNIA, M.M.; ADINE, C.; FERREIRA, J.N. Concise Review: Salivary Gland Regeneration: Therapeutic Approaches from Stem Cells to Tissue Organoids. ***Stem Cells.***, v. 35, n. 1, p. 97-105, 2017.

LORBER, M. Branchings and course of the larger ducts and accompanying structures within the rat submandibular salivary gland. ***Am J Anat***, v. 190, n. 2, p. 133-156, 1991.

LOPES, F.F.; SILVA, L.F.G.; CARVALHO, F.L.; OLIVEIRA, A.E.F. Estudo Sobre xerostomia, a fluxo salivar e enfermidades sistêmicas em mulheres na pós-menopausa. ***Revista Geral Odontologia***, v. 56, n. 2, p. 127-130, 2008.

LÓPEZ-SOLÍS, R.; PUENTE, M.; DURÁN, V.; MORALES-BOZO, I.; KEMMERLING, U.; PARDO, R.; WENK, C. Characterization of mouse salivary polypeptide secretion after oral administration of pilocarpine. ***Rev Chil Hist Nat***, v. 74, p. 195-205, 2001.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. ***J. Biol. Chem.***, v. 193, p. 265-275, 1951.

LU, D.W.; LIPPITZ, J. Complications of Botulinum Neurotoxin. ***Dis Mon***, v. 55, p. 198-211, 2009.

LUNGREN, M.P.; HALULA, S.; COYNE, S.; SIDELL, D.; RACADIO, J.M.; PATEL, M.N. Ultrasound-Guided Botulinum Toxin Type A Salivary Gland Injection in Children for Refractory Sialorrhea: 10-Year Experience at a Large Tertiary Children's Hospital. ***Pediatr Neurol***, v. 54, p. 70-75, 2016.

MACÍAS, F.A.; LÓPEZ, A.; VARELA, R.M.; TORRES, A.; MOLINILLO, J.M.G. Bioactive Lignans from a Cultivar of *Helianthus annuus*. ***J. Agric. Food Chem.***, v. 52, p. 6443-6447, 2004.

MAHADEVAN, M.; GRUBER, M.; BILISH, D.; EDWARDS, K.; DAVIES-PAYNE, D.; VAN DER MEER, G. Botulinum toxin injections for chronic sialorrhoea in children are

effective regardless of the degree of neurological dysfunction: A single tertiary institution experience. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, v. 88, p. 142-145, 2016.

MALCHER, C.M.S.R.; CONTE NETO, N.; PONTES, H.A.R.; BRITO, J.A.F.; SILVA, J.B.G.; AKKARI, M. Effects of botulinum toxin on treatment for sialorrhea in patients with cerebral palsy. *Toxicon*, v. 93, p. S41, 2015.

MANRIQUE, D. Application of type A botulinum toxin to reduce saliva in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.*, 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. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.*, v. 73, n. 1, p. 41-45, 2007.

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 Otorhinolaryngol Ital*, v. 28, n. 1, p. 13-16, 2008.

MARINA, M.B.; SANI, A.; HAMZAINI, A.H.; HAMIDON, B.B. Ultrasound-guided botulinum toxin A injection: an alternative treatment for dribbling. *J Laryngol Otol*, v. 122, n. 6, p. 609-614, 2008.

MATAK, I.; LACKVIĆ, Z. Botulinum neurotoxin type A: Actions beyond SNAP-25? *Toxicology*, v. 335, n. 1, p. 79-84, 2015.

MATO, A.; LIMERES, J.; TOMAS, I.; MUNOZ, M.; ABUIN, C.; FEIJOO, J.F.; DIZ, P. Management of drooling in disabled patients with scopolamine patches. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, v. 69, p. 684-688, 2010.

MATSUOKA, M.W.; ROCHA, S.M.S.; SUZUKI, L.; BARNEWITZ, J.P.; IMAMURA, R.; OLIVEIRA, L.A.N. Ultrasound guided injection of botulinum toxin into the salivary glands of children with neurological disorders. *Radiol Bras.*, v. 49, n. 2, p. 126-132, 2016.

MELFI, R.C.; ALLEY, K.E. *Embriologia e Histologia Oral de Permar: Manual para Estudantes de Odontologia*. 10ª edição. Editora Santos: São Paulo, 2010, 297 p.

MELLING, J.; HAMBLETON, P.; SHONE, C.C. Clostridium Botulinum Toxins: Nature and Preparation for Clinical Use. *Eye*, v. 2, p. 16-23, 1988.

MELVIN, JE.; YULE, D.; SHUTTLEWORTH, T.; BEGENISICH, T. Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. *Annu Rev Physiol*, 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 Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 101, n. 1, p. 48-57, 2006.

MIDURA, T.F. Update: infant botulism. *Clin Microbiol Rev*, v. 9, n. 2, p. 119-125, 1996.

MIRANDA-RIUS, J.; BRUNET-LLOBET, L.; LAHOR-SOLER, E.; FARRÉ, M. Salivary Secretory Disorders, Inducing Drugs, and Clinical Management. *Int. J. Med. Sci.*, v. 12, p. 811-824, 2015.

MOHAMED, D.A.; ELNEGRIS, H.M.; WAHDAN, R.A. Histological effect of ovariectomy and estrogen replacement on parotid gland of adult albino rat. *J Histol Histopathol.*, v. 2, p. 1-9, 2015.

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 Neurol Scand*, v. 69, n. 3, p. 151-157, 2011.

MØLLER, E.; DAYGAARD, D.; HOLM, O.; WINGER, K.; BARDOW, A.; LYKKEAA, J.; BELHAGE, B.; BAKKE, M. Repeated treatments of drooling with botulinum toxin B in neurology. *Acta Neurol Scand*, v. 131, p. 51-57, 2015.

MÖLLER, R.; VAZQUEZ, N. Anatomía del hígado de la rata Wistar (*Rattus norvegicus*). *Int. J. Morphol.*, v. 29, n. 1, p. 76-79, 2011.

MONTGOMERY, J.; MCCUSKER, S.; HENDRY, J.; LUMLEY, E.; KUBBA, H. Botulinum toxin A for children with salivary control problems. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, v. 78, p. 1970-1973, 2014.

MONTGOMERY, J.; McCUSKER, S.; LANG, K.; GROSSE, S.; MACE, A.; LUMLEY, R.; KUBBA, H. Managing children with sialorrhoea (drooling): Experience from the first 301 children in our saliva control clinic. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, v. 85, p. 33-39, 2016.

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. *Ciênc. Tecnol. Aliment*, v. 28, n. 3, p. 738-745, 2008.

MOSSERI, A.; CARDONA, I.; BLUMENKRANTZ, M.; DANIEL, S.J. Histopathologic Effects of Onabotulinum Toxin ATreatment in Pediatric Submandibular Glands. *Otolaryngol Head Neck Surg.*, v. 22, p. 1-3, 2016.

MOTOC, M.; SAMOILĂ, C.; SFRIJAN, F.; ARDELEAN, L.; VERDES, D.; MOTOC, A.; ANGHEL, M.; POPESCU, A. The variation of some salivary components in correlation with sex and age at puberty. *Timisoara Med J*, v. 53, n. 3-4, p. 254-258, 2003.

MUKAI, Y.; SHIMATANI, Y.; SAKO, W.; ASANUMA, K.; NODERA, H.; SAKAMOTO, T.; IZUMI, Y.; KOHDA, T.; KOZAKI, S.; KAJI, R. Comparison between botulinum neurotoxin type A2 and type A1 by electrophysiological study in healthy individuals. **Toxicon**, v. 81, p. 32-36, 2014.

MURAKAMI, M.; SHACHAR-HILL, B.; STEWARD, M.C.; HILL, A.E. The paracellular component of water flow in the rat submandibular salivary gland. **J Physiol.**, v. 537, Pt 3, p. 899-906, 2001.

NANCI, A. **Ten Cate, Histologia Oral**. 8ª edição. Editora Elsevier: Rio de Janeiro, 2013, 400 p.

NHI (National Institute of Health). **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. 8th Edition. Washington, DC: The National Academies Press, 2011. 246 p. Disponível em <<http://grants.nih.gov/grants/olaw/olaw.htm>>. [Acesso em 09 dez. 2014].

NEGOESCU, A.; LORIMIER, P.; LABAT-MOLEUR, F.; DROUET, C.; ROBERT, C.; GUILLERMET, C.; BRAMBILLA, C.; BRAMBILLA, E. *In situ* apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations". **J Histochem Cytochem.**, v. 44, n. 9, p. 959-968, 1996.

NEGOESCU, A.; GUILLERMET, C.; LORIMIER, P.; BRAMBILLA, E.; LABAT-MOLEUR, F. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity". **Biomed Pharmacother.**, v. 52, n. 6, p. 252-258, 1998.

NEVILLE, B.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.M.; CHI, A.C. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. 928 p.

NIKAWA, H.; YAMASHIRO, H.; MAKIHIRA, S.; NISHIMURA, M.; EGUSA, H.; FURUKAWA, M.; SETIJANTO, D.; HAMADA, T. In vitro cariogenic potential of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 46, n. 11-12, p. 471-478, 2003.

NIKOLOV, N.P.; ILLEI, G.G. Pathogenesis of Sjögren's syndrome. **Curr Opin Rheumatol.**, v. 21, n. 5, p. 465-470, 2009.

NISENGARD, R.J.; NEWMAN, M.G. **Microbiologia Oral e Imunologia - Vol. 1**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 395 p.

OLIVEIRA FILHO, A.F.; SILVA, G.A.M.; ALMEIDA, D.M.X. Application of botulinum toxin to treat sialorrhea in amyotrophic lateral sclerosis patients: a literature review. **Einstein**, v. 14, n. 3, p. 431-434, 2016.

OLIVEIRA, M.; MOLINA, G.; FURTADO, A.; GHIZONI, J.; PEREIRA, J. Gummy smile: A contemporary and multidisciplinary overview. **Dent Hypotheses**, v. 4, n. 2, p. 55-60, 2013.

PETRACCA, M.; GUIDUBALDI, A.; TICCIARDI, L.; IALONGO, T.; DEL GRANDE, A.; STASIO, E.D.; BENTIVOGLIO, A.R. Botulinum toxin in sialorrhea is safe and effective in long-term use. **Toxicon**, v. 93, p. S49-S50, 2015.

PIER, C. L.; CHEN, C.; TEPP, W.H.; LIN, G.; JANDA, K.D.; BARBIERI, J.T.; PELLETT. S.; JOHNSON, E.A. Botulinum neurotoxin subtype A2 enters neuronal cells faster than subtype A1. *FEBS Lett.*, v. 585, n. 1, p.199-206, 2011.

PINKSTAFF, C.A. The cytology of salivary glands. *Int. Rev. Cytol.*, v. 63, p. 141-261, 1980.

POLLOCK, C. Fungal diseases of laboratory rodents. *Vet Clin Exot Anim*, v. 6, p. 401-413, 2003.

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

POULAIN, B.; HUMEAU, T. Le Mode D'action des Neurotoxines Botuliques: Aspects Pathologiques, Cellulaires et Moléculaires. *Ann Phys Rehabil Med.*, v. 46, p, 265-275, 2003.

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

PREVOT, A.R. Rapport d'introduction du Président du Sous-Comité Clostridium pour l'unification de la nomenclature des types toxigeniques de C. Botulinum. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon*, v. 3, p. 120-123, 1953.

PROCTOR, G.B.; CARPENTER, G.H. The function of salivary proteins and the regulation of their secretion by salivary glands. *Biomed. Rev.*, v. 9, p. 3-15, 1998.

PROCTOR, G.B.; CARPENTER, G.H. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Autonomic Neuroscience: Basic Clin Neurosci.*, v. 133, p. 3-18, 2007.

PROCTOR, G.B.; OSAILAN, S.M.; MCGURK, M.; HARRISON, J. **Sialolithiasis - pathophysiology, epidemiology and aetiology.** In: NAHLIELI, O. (editor). *Modern Management Preserving the Salivary Glands*. Herzeliya: IsraDon Publ, 2007. p. 85-135.

PROSIGNE®. [Bula]. **Bula para o profissional de Saúde.** 13 f. Farmacêutico Responsável: Dr. José Carlos Módolo – CRF/SP nº 10.446. Lanzhou, Gansu, República Popular da China: Lanzhou Institute of Biological Products; 2013.

QUAGLIATO, E.M.A.B.; CARELLI, E.F.; VIANA, M.A. Prospective, Randomized, Double-Blind Study, Comparing Botulinum Toxins Type A Botox and Prosigne for Blepharospasm and Hemifacial Spasm Treatment. *Clin Neuropharm*, v. 33, n. 1, p. 27-31, 2010.

QUEZADA-GAON, M.; WORTSMAN, X.; PAÑALOZA, O.; CARRASCO, J.E. Comparison of clinical marking and ultrasound-guided injection of Botulinum type A toxin into the masseter muscles for treating bruxism and its cosmetic effects. *J Cosmet Dermatol*, v. 15, p. 238-244, 2016.

RAHNAMA, M.; SWIATKOWSKI, W.; LANCUT, M.; WOJCIK, A. Influence of raloxifene and 17 B-oestradiol on rats' oral mucosal structure. **Bull Vet. Inst. Pulawy.**, v. 48, p. 329-332, 2004.

RAJA, M.; HANNAN, A.; ALI, K. Association of oral candidal carriage with dental caries in children. **Caries Res**, v. 44, n. 3, p. 272-276, 2010.

RAPPER, K.B.; FENNEL, D.I. **The genus Aspergillus**. 3ª edição. Publishing Company Malabar: Florida, 1977.

RAVICHANDRAN, E.; GONG, Y.; AL SALEEM, F.H.; ANCHARSKI, D.M.; JOSHI, S.G.; SIMPSON, L.L. An initial assessment of the systemic pharmacokinetics of botulinum toxin. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 318, n. 3, p. 1343-1351, 2006.

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. **Eur. J. Neurol**, v. 17, suppl. 2, p. 109-121, 2010.

REDDIHOUGH, D.; GRAHAM, H.K. Botulinum toxin type B for sialorrhea in children with cerebral palsy. **Dev Med Child Neurol**, v. 53, p. 482-489, 2011.

ROBIN, A.S.; MEENAKSHI, R. Oral and dental adverse drug reactions. **Periodontol 2000**, v. 46, p. 9-26, 2008.

SAGAR, P.; HANDA, K.K.; GULATI, S.; KUMAR, R. Submandibular Duct Re-routing for Drooling in Neurologically Impaired Children. **Indian J Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 68, n. 1, p. 75-79, 2016.

SAMPAIO, C.; COSTA, J.; FERREIRA, J.J. Clinical comparability of marketed formulations of botulinum toxin. **Mov. Disord.**, v. 19, Suppl. 8, p. S129-S136, 2004.

SANIOTO, S.M.; AMORIM, J.B.O.; MANCINI, M.N.G.; BALDO, M.V.C. **Regulação Neurovegetativa do Aparelho Estomatognático: Fisiologia da Secreção Salivar**. In: BALDO, M.V.C.; REGATÃO, M.C. **Fundamentos de Odontologia: Fisiologia Oral**. 1ª. ed. São Paulo: Santos, 2013. 192 p.

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. **Am J Phys Med Rehabil**, v. 83, n. 4, p. 304-311, 2004.

SBARBATI, A.; BALDASSARRI, A.; LECLERCQ, F.; MERIGO, F.; ANTONAKIS, K.; BOICELLI, A. Magnetic resonance imaging of the submandibular-sublingual complex. **Acta Anat. (Basel)**, v. 149, n. 1, p. 63-69, 1994.

SEGTMAN, 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 Hydrocoll.**, v. 17, n. 5, p. 585-592, 2003.

ŞEN, B.H.; SAFAVI, E.K.; SPÅNGBERG, L.S.W. Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canals. **J Endod**, v. 25, n. 4, p. 235-238, 1999.

SENGUPTA, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med.*, v. 4, n. 6, p. 624-630, 2013.

SETLER, P.E. Therapeutic use of botulinum toxins: Background and history. *Clin J Pain.*, v. 18, n. 6 (suppl), p. S119-124, 2002.

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

SHANNON, M.W.; BORRON, S.W.; HURNS, M.J. *Haddad and Winchester's: Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose*. 4th ed. Philadelphia: Saunders and Co, 2007. 1584 p.

SHARIAT-MADAR, B.; CHUN, R.H.; SULMAN, C.G.; CONLEY, S.F. Safety of Ultrasound-Guided Botulinum Toxin Injections for Sialorrhea as Performed by Pediatric Otolaryngologists. *Otolaryngol Head Neck Surg.*, v. 154, n. 5, p. 924-927, 2016.

SIDEBOTTOM, A.; PATEL, A.; AMIN, J. Botulinum injection for the management of myofascial pain in the masticatory muscles. A prospective outcome study. *Br J Oral Maxillofac Surg*, v. 51, n. 3, p. 199-205, 2013.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. *Micologia Médica a Luz de Autores Contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p.83-88.

SLADE, A.; STANIC, S. Managing excessive salivawith salivary gland irradiation in patientswith amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.*, v. 352, p. 34-36, 2015.

SILLANPÄÄ, S.; SIPILÄ, M.; NUMMINEN, J.; RAUTIAINEN, M. The Experience of Treating Drooling with Repeated Botulinum Toxin Injections. *ORL*, v. 77, p. 333-338, 2015.

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

SIM, W.S. Application of Botulinum Toxin in Pain Management. *Korean J Pain.*, v. 24, v. 1, p. 1-6, 2011.

SIMONE, G.G.; EISENCHLAS, J.H.; JUNIN, M. Atropine drops for drooling: a randomized controlled trial. *J Palliat Med*, v. 20, p. 665-671, 2006.

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.

SIQUEIRA JR., J.F.; SEN, B.H. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 97, n. 5, p. 632-641, 2003.

SMITH, C.P.; FRANKS, M.E.; McNEIL, B.K.; GHOSH, R.; de GROAT, W.C.; CHANCELLOR, M.B.; SOMOGYI, G.T. Effect of Botulinum toxin A on the autonomic nervous system of the rat lower urinary tract. *J Urol*, v. 169, n. 5, p. 1896-1900, 2003.

SMITH, J.; LINDSAY, M.; RAHIMIAN, R.; ANDERSON, L. The influence of estrogen and progesterone on parasympathetic vasodilatation in the rat submandibular gland. *Auton Neurosci*, v. 146, n. 1-2, p. 87-94, 2009.

SOBEL, J.D. The emergence of non-albicans Candida species as causes of invasive candidiasis and candidemia. *Curr Infect Dis Rep*, v. 8, n. 6, p. 427-433, 2006.

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

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

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

SREEBNY, L.M. Saliva in health and disease: an appraisal and update. *Int Dent J*, v. 50, n. 3, p. 140-161, 2000.

SRISKANDAN, N.; MOODY, A.; HOWLETT, D.C. Ultrasound-guided submandibular gland injection of botulinum toxin for hypersalivation in cerebral palsy. *Br J Oral Maxillofac Surg*, v. 48, n. 1, p. 58-60, 2010.

SUNDQVIST, G. Ecology of the root canal flora. *J Endod*, v. 18, n. 9, p. 427-430, 1992.

SUNDQVIST, G. Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 78, n. 4, p. 522-530, 1994.

TAGA, R.; ACHÔA, A.S.; PARDINI, L.C. Estudo Estereológico dos Ductos Granulosos e Estriados de Glândulas Submandibulares de Ratos Machos e Fêmeas. *Revista FOB*, v. 2, n. 4, p. 22-27, 1994.

TAKARADA, K.; KIMIZUKA, R.; TAKAHASHI, N., KATO, T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 19, p. 61-64, 2004.

TAMARIN, A.; SREEBNY, L.M. The Rat Submaxillary Salivary Gland. A correlative study by light and electron microscopy. *J. Morph.*, v. 117, p. 295-352, 1965.

TAMGADGE, S.; TAMGADGE, A.; SATHEESAN, E.; MODAK, N. Myoepithelial Cell – A Morphologic Diversity – A Review. *J Dent Res Rev*, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2013.

TAN, E.K.; LO, Y.L.; SEAH, A.; AUCHUS, A.P. Recurrent jaw dislocation after botulinum toxin treatment for sialorrhoea in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci*, v. 190, p. 95-97, 2001.

TANDLER, B.; GRESIK, E.W.; NAGATO, T.; PHILLIPS, C.J. Secretion by striated ducts of mammalian major salivary glands: review from an ultrastructural, functional, and evolutionary perspective. **Anat. Rec.**, v. 264, n. 2, p. 121–145, 2001.

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. **Br J Pharmacol**, v. 152, n. 1, p. 161-167, 2007.

TIGHE, D.; GOK, G.; MOODY, A.; HOWLETT, D. Dysphagia as a complication of botulinum toxin injection to treat drooling. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 52, p. 673-674, 2014.

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

TOBIN, G.; GIGLIO, D.; GÖTRICK, B. Studies of muscarinic receptor subtypes in salivary gland function in anaesthetized rats. **Auton Neurosci**, v. 100, p. 1-9, 2002.

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

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

TROUNG, D.D.; STENNER, A.; REICHEL, G. Current Clinical Applications of Botulinum Toxin. **Curr Pharm Des**, v. 15, p. 3671-3680, 2009.

TSCHEG, D.Z. Sialorrhoea – therapeutic drug options. **Ann Pharmacother**, v. 36, n. 11, p. 1785-1790, 2002.

TURK-GONZALES, M.; ODDERSON, I.R. Quantitative Reduction of Saliva Production with Botulinum Toxin Type B Injection into the Salivary Glands. **Neurorehabil Neural Repair**, v. 19, p. 58-61, 2005.

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

TURTON, K.; CHADDOCK, J.A.; ACHARYA, K. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. **Trends Biochem Sci**, v. 27, n.11, p. 552-558, 2002.

VAILE, L.; FINLAY, F. Is injection of botulinum toxin type A effective in the treatment of drooling in children with cerebral palsy? **Arch Dis Child**, v. 91, p. 862-863, 2006.

VALIMAA, H.; SAVOLAINEN, S.; SOUKKA, T.; SILVONIEMI, P.; MAKELA, S.; KUJARI, H.; GUSTAFSSON, J.A.; LAINE, M. Estrogen receptor-beta is the predominant estrogen receptor subtype in human oral epithelium and salivary glands. **J Endocrinol.**, v. 180, n. 1, p. 55-62, 2004.

VAN ERMENGEM, E.P. Ueber einen neuen anaëroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus. **Z Hyg Infektionskr.**, v. 26, p. 1-56, 1897.

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

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

VOLLAND, H.; LAMOURETTE, P.; NEVERS, M.-C.; MAZUET, C.; EZAN, E.; NEUBURGER, L.-M.; POPFF, M.; CRÉMINON, C. A sensitive sandwich enzyme immunoassay for free or complexed *Clostridium botulinum* neurotoxin type A. **J Immunol Methods**, v. 330, p. 120-129, 2008.

WALKER, T.J.; DAYAN, S.H. Comparison and Overview of Currently Available Neurotoxins. **J Clin Aesthet Dermatol.**, v. 7, n. 2, p. 31-39, 2014.

WALTIMO, T. M. T.; SEN, B. H.; MEURMAN, J. H.; ØRSTAVIK, D.; HAAPASALO, M. P. P. Yeasts in apical periodontitis. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 14, n. 2, p. 128-137, 2003a.

WALTIMO, T.; KUUSINEN, M.; JARVENSIVU, A.; NYBERG, P.; VAANANEN, A.; RICHARDSON, M.; SALO, T.; TJADERHANE, L. Examination on *Candida* spp. In refractory periapical granulomas. **Int Endod J**, v. 36, p. 643-647, 2003b.

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. **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 27, n. 12, p. 501-505, 2007.

WEIKAMP, J.G.; SCHINAGL, D.A.X.; VERSTAPPEN, C.C.P.; SCHELHAAS, H.J.; SWART, B.J.M.; KALF, J.G. Botulinum toxin-A injections vs radiotherapy for drooling in ALS. **Acta Neurol Scand**, v. 134, n. 3, p. 224-231, 2016.

WEN, W.-D.; YUAN, 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.

WHITEMARSH, R.; TEPP, W.; BRADSHAW, M.; LIN, G.; PIER, C.; SCHERF, J.; JOHNSON, E.; PELLETT, S. Characterization of Botulinum Neurotoxin A Subtypes 1 Through 5 by Investigation of Activities in Mice, in Neuronal Cell Cultures, and In Vitro. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 10, p. 3894-3902, 2013.

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.

WOLLINA, U. Botulinum Toxin: Non-cosmetic Indications and Possible Mechanisms of Action. *J Cutan Aesthet Surg*, v. 1, n. 1, p. 3-6, 2008.

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

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). *World Report on Disability 2011*. Summary, 2011, WHO/NMH/VIP/11.01, Disponível em <<http://www.refworld.org/docid/50854a322.html>>. [Acesso em 15 de nov 2016].

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). *Governments to agree increased focus on people with disabilities in development strategies*. Geneva: WHO, 2013. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2013/disability_and_development_2013_0920/en/>. [Acesso em 21 de jun 2014].

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. *Turk Neurosurg*, v. 21, n. 4, p. 625-629, 2011.

XEREZ, D.R. Reabilitação na Esclerose Lateral Amiotrófica: revisão da literatura. *Acta Fisiát.*, v. 15, n. 3, p. 182-188, 2008.

XIE, S.; XU, H.; LIN, B.; WANG, K.; SHAN, X.-F.; CAI, Z.-G. An Experimental Study on Botulinum Toxin Type A for the Treatment of Excessive Secretion after Submandibular Gland Transplantation in Rabbits. *J Ophthalmol*, v. 9, p. 1-8, 2016.

XU, H.; SHAN, X.; CAI, Z.; WU, L. Botulinum neurotoxin A reduces salivary secretion by inhibiting AQP5 activity in rat submandibular gland. Abstracts 21st ICOMS - International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, Barcelona, 21-24 oct. 2013. *Int J Oral Maxillofac Surg*, v. 42, n. 10, p. 1351, 2013.

YAM, W.K.L.; YANG, H.L.C.; ABDULLAH, V.; CHAN, C.Y.L. Management of drooling for children with neurological problems in Hong Kong. *Brain Dev.*, v. 28, p. 24-29, 2006.

YAMASHINA, S.; TAMAKI, H.; KATSUMATA, O. The serous demilune of rat sublingual gland is an artificial structure produced by conventional fixation. *Arch Histol Cytol*, v. 62, n. 4, p. 347-354, 1999.

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 J. Med.*, v. 11, p. 261-266, 2006.

YOHRO, T. Development of Secretory Units of Mouse Submandibular Gland. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, v. 110, p. 173-184, 1970.

YOHRO, T. Nerve terminals and cellular junctions in young and adult mouse submandibular glands. **J Anat**, v. 108, n. 3, p. 409-417, 1971.

YOON, S.; MERRILL, R.; CHOI, J.; KIM, S. Use of botulinum toxin type A injection for neuropathic pain after trigeminal nerve injury. **Pain Medicine**, v. 11, n. 4, p. 630-632, 2010.

YOUNG, C.A.; ELLIS, C.; JOHNSON, J.; SATHASIVAM, S.; PIH, N. Treatment for sialorrhea (excessive saliva) in people with motor neuron disease/amyotrophic lateral sclerosis (Review). **Cochrane Database Syst Rev**, v. 5, p. 1-20, 2011.

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. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 1, n. 4, p. 38, 2013.

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. **Clin Otolaryngol**, 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. **Am J Phys Med Rehabil**, v. 90, n. 12, p. 1064-1067, 2011.

ZALVAN, C.; BENTSIA NOV, B.; GONZALEZ-YANES, O.; BLITZER, A. Noncosmetic uses of botulinum toxin. **Dermatol Clin**, v. 22, n. 1, p. 187-195, 2004.

ZELLER, R.S.; LEE, H.M.; CAVANAUGH, P.F.; DAVIDSON, J. Randomized Phase III evaluation of the efficacy and safety of a novel glycopyrrolate oral solution for the management of chronic severe drooling in children with cerebral palsy or other neurologic conditions. **Ther Clin Risk Manag.**, v. 8, p.15-23, 2012.

ZHANG, Y.; VARNUM, S.M. The receptor binding domain of botulinum neurotoxin serotype C binds phosphoinositides. **Biochimie**, v. 94, p. 920-923, 2012.

ZLOTNIK, Y.; BALASH, Y.; KORCZYN, A.D.; GILADI, N.; GUREVICH, T. Disorders of the Oral Cavity in Parkinson's Disease and Parkinsonian Syndromes. **Parkinson's Disease**, v. 2015, p. 1-6, 2015.

Apêndices I, II, III e IV

Os resultados desta Tese são apresentados na forma de artigos científicos, com sua formatação de acordo com as orientações da revista que serão submetidos.

Apêndice I – Artigo 1: Aplicação local de Toxina Botulínica Tipo A no Complexo Submandibular-Sublingual de Ratas: Avaliações Apoptóticas e Histológicas das Glândulas Salivares e Linfonodos Associados

A ser submetido em: *Molecular and Cellular Biology*

Instruções aos autores disponível em <<http://mcb.asm.org/>>.

Apêndice II – Artigo 2: Aplicação local de Toxina Botulínica Tipo A no Complexo Submandibular-Sublingual de Ratas: Análise da Microbiota Fúngica Oral

A ser submetido em: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*

Instruções aos autores disponível em <<http://journal.frontiersin.org/journal/cellular-and-infection-microbiology>>.

Apêndice III – Artigo 3: Aplicação local de Toxina Botulínica Tipo A no Complexo Submandibular-Sublingual de Ratas: Análise Bioquímica da Saliva Total

A ser submetido em: *Archives of Oral Biology*

Instruções aos autores disponível em <<https://www.journals.elsevier.com/archives-of-oral-biology>>.

Apêndice IV – Artigo 4: Aplicação local de Toxina Botulínica Tipo A no Complexo Submandibular-Sublingual de Ratas: Análises Sorológica e Histopatológicas Hepáticas e Renais

A ser submetido em: *Toxicology*

Instruções aos autores disponível em <<https://www.journals.elsevier.com/toxicology>>.

Apêndice I – Artigo 1

Aplicação local de Toxina Botulínica Tipo A no Complexo Submandibular-Sublingual de Ratas: Avaliações Apoptóticas e Histológicas das Glândulas Salivares e Linfonodos Associados

Local Application of Botulinum Toxin Type A in the Submandibular-Sublingual Complex of Rats: Apoptotic and Histological Evaluations of Salivary Glands and Associated Lymph Nodes

Jaciel Benedito de Oliveira^{a*}; Liriane Baratella-Evêncio^b; Luciana Silva Regueira^c;
Leonardo Prezzi Dornelles^d; Rair de Meneses Quirino^e; Joaquim Evêncio Neto^f

Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal (PPGBA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e Departamento de Anatomia do Centro de Biociências (CB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)^a; Departamento de Histologia e Embriologia, CB, UFPE^b; Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde (CCS), UFPE^c; Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, CB, UFPE^d; Curso de Graduação em Medicina, CCS, UFPE^e; Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFO) e do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal (PPGBA), UFRPE, Recife, Pernambuco, BRA^f.

***Autor para Correspondência:**

Prof. Jaciel Benedito de Oliveira, Departamento de Anatomia, Centro de Biociências (CB), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. CEP: 50670-901. Fone: +55 81 21268555 / E-mail: jacieloliveira@gmail.com

Resumo

Este trabalho avaliou histologicamente o complexo submandibular-sublingual e linfonodos associados sob influência da toxina botulínica tipo A (BTXA), e a ocorrência de apoptose. Utilizou-se 32 ratas Wistar adultas, distribuídas em cinco grupos: Controle, sem tratamento; grupos BTXA-12 e BTXA-35, com aplicação intraglandular de 2,5U de BTXA em glândulas submandibulares direitas; grupos GEL12 e GEL35, com injeção intraglandular de 0,125 mg gelatina de origem bovina. Os grupos BTXA12 e GEL12 foram analisados aos 12 dias após o tratamento; os grupos BTXA35 e GEL35, analisados aos 35 dias após aplicação. Realizou-se exérese das glândulas e linfonodos, processados pela técnica histológica convencional, corados por HE. Apoptose foi verificada pelo método TUNEL. Ácinos serosos do grupo BTX-A12 mostravam-se diminuídos, com vacuolizações citoplasmáticas e aumento do espaço interacinar. Estas alterações diminuíram no grupo BTXA35. Nos grupos GEL12 e 35, não foram observadas alterações significativas. Células TUNEL positivas foram mais presentes no grupo BTXA12. Os linfonodos do grupo BTXA 12 mostraram-se mais reativos. Conclui-se que a aplicação intraglandular da BTXA promove atrofia transitória dos ácinos serosos, aumento de figuras apoptóticas e reação nos linfonodos. A gelatina bovina parece ser um excipiente seguro. A glândula sublingual não mostrou alterações estruturais.

Palavras-chaves: glândula submandibular; toxinas botulínicas tipo A; ratos Wistar; sialorreia; apoptose; biópsia de linfonodo sentinela

Abstract

This work histologically evaluated the submandibular-sublingual complex and associated lymph nodes under the influence of botulinum toxin type A (BTXA), and the occurrence of apoptosis. Thirty-two adult Wistar rats were divided: Control group, without treatment; BTXA12 and BTXA35 groups, with intraglandular application of 2.5 U BTXA in right submandibular glands; groups GEL12 and GEL35, with intraglandular injection of 0.125 mg gelatin of bovine origin. BTXA12 and GEL12 groups were analyzed at 12 days post-treatment; BTXA35 and GEL35 groups analyzed at 35 days post-treatment. Excision of the glands and lymph nodes, fixed in 10% buffered formol, were performed by conventional histological technique, stained by HE. Apoptosis was verified by the TUNEL method. Serous acini from the BTXA12 group was shown to be decreased, with cytoplasmic vacuolations and increase of the interacinar space. These changes decreased in the BTXA35 group. TUNEL positive cells

were more present in the BTXA12 group. The lymph nodes of the BTXA12 group showed more reactivity. It is concluded that the intraglandular application of BTXA promotes transient atrophy of serous acini, increase of apoptotic figures and reaction in the lymph nodes. Bovine gelatin appears to be a safe excipient. Sublingual gland showed no structural changes.

Keywords: submandibular gland; botulinum toxins, type A; rats, Wistar; sialorrhea; apoptosis; sentinel lymph node biopsy

INTRODUÇÃO

Sialorreia, ou hipersalivação, refere-se a um aumento excessivo na secreção e fluxo salivar ou acúmulo de saliva na cavidade oral, geralmente com extravasamento da mesma pela abertura bucal (1, 2). Acompanha várias patologias de acometimento neurológico (motor e/ou mental), como esclerose lateral amiotrófica, doença de Parkinson, lesão cerebral, entre outras, sendo um motivo de desconforto significativo para os pacientes afetados (1–3), levando a complicações secundárias, como queilite, úlceras perioral com infecções secundárias, assim como risco de infecções pulmonares, inclusive pneumonia aspirativa (2, 4, 5).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (6, 7), mais de 1 bilhão de pessoas vivem com algum tipo de deficiência em todo o mundo, em muitas das quais a sialorreia pode estar presente como sinal clínico, o que justifica maior atenção com a finalidade de tratá-la e melhorar a qualidade de vida destes pacientes.

Os tratamentos convencionais para a sialorreia são pouco eficientes ou muito invasivos ou ainda trazem efeitos colaterais graves. Neste contexto, a toxina botulínica (BTX), passou a ser uma boa escolha para o tratamento desta afecção, com bons resultados, sendo uma técnica de tratamento tópico, pouco invasiva e reversível.

Existem no mercado internacional diferentes preparações comerciais de toxina botulínica do tipo A (BTXA). A formulação de origem chinesa, conhecida pelo nome comercial de *Prosigne*[®] (8), destaca-se por ter como estabilizante à estrutura química da toxina, uma gelatina de origem bovina ao invés da albumina humana, preservando a toxicidade e aumentando sua resistência à deformação, além de possuir a certificação *prions free* (9, 10).

São escassos os estudos que estão voltados para o mecanismo de ação da toxina botulínica tipo A em glândulas salivares, bem como, sobre sua influência nos tecidos locais e circunvizinhos. Também pouco se sabe sobre a eficácia do recente estabilizante da toxina

(gelatina de origem bovina). Desta forma, determinar um papel mais preciso do tratamento com BTX-A é extremamente importante. Assim sendo, este trabalho se propõe realizar uma avaliação estrutural do parênquima e estroma da glândula submandibular sob influência da toxina botulínica, bem como, de seus linfonodos associados, através da microscopia óptica convencional; verificar se a difusão da droga atingiu a glândula sublingual, devido a sua íntima relação anatômica; e verificar se houve presença de morte celular programada na glândula sob ação da toxina em modelo experimental animal.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Biociências (CB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob o parecer de número 23076.023152/2014-14. Foram utilizadas 32 ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*), fêmeas, adultas pesando entre 200-300 g. Os animais tiveram livre acesso a água e comida com uma dieta padrão para roedores do biotério (Presence® Nutrição Animal para Ratos, SP, Brasil) e foram mantidos 4 animais por gaiola de gaiolas de polipropileno (49x34x16 cm), em temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Todas as manipulações experimentais foram realizadas entre 7:00 e 10:00 horas.

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos: grupo controle com 7 animais, sem quaisquer tratamentos do complexo submandibular-sublingual; grupo BTX-A 12 dias, com 7 animais, cujas glândulas submandibulares dos complexos submandibulares-sublinguais direitos receberam injeção de 2,5 U toxina botulínica tipo A (*Prosigne*®, Cristália, Itapira, SP, Brasil), reconstituída em 0,1 mL de solução de cloreto de sódio 0,9%, evitando-se o borbulhamento e agitação do diluente sobre a toxina, e analisadas 12 dias após a aplicação; grupo BTXA35 dias, com 6 animais, cujas glândulas salivares receberam o mesmo tratamento do grupo BTXA12 dias, porém analisadas 35 dias após a aplicação; grupo GEL12 dias e grupo GEL35 dias, com 6 animais cada, cujas glândulas receberam injeção de 0,125 mg gelatina de origem bovina (Gelita do Brasil Ltda., SP, Brasil), diluída em 0,1 mL de cloreto de sódio 0,9%, e analisadas 12 e 35 dias após a aplicação da gelatina, respectivamente (11–13), que correspondem ao pico máximo de ação da droga e término do efeito.

Para a aplicação da BTXA e da gelatina bovina nas glândulas submandibulares do complexo, os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (50 mg/kg de peso – Clortamina®, BioChimico, Itatiaia, RJ, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg de peso –

Rompun[®], Bayer S.A., SP, Brasil), na proporção de 1:1 associados na mesma seringa e administrados por via intramuscular. A seguir, foi realizado antissepsia do local com digluconato de clorexidina 2% (FGM do Brasil[®], Joinville, SC, Brasil), tricotomia da região cervical dos animais e aplicação das drogas pelo método palpatório e localização anatômica do complexo submandibular-sublingual. Posteriormente, posicionou-se a agulha no terço médio do complexo, com a finalidade de injetar a droga apenas na glândula submandibular. As aplicações intraglandulares foram em dose única, utilizando-se seringa de insulina de 1 mL/cc ultrafina, com agulha de calibre de 8 mm (5/16") x 0,3 mm (30G) (BD, Curitiba, Paraná, Brasil).

Sialoadenectomia e Confeção das Preparações Histológicas. Aos 12 e 35 dias após as injeções intraglandulares, os animais foram novamente pesados e anestesiados como descrito anteriormente. Para simular uma situação de sialorreia, todos os grupos receberam injeção intraperitoneal de Cloridrato de Pilocarpina a 0,5% (Fórmula Manipulada. Pharmapele, Recife, Pernambuco, Brasil), na dose de 0,4 mg/Kg de peso corporal, deixando os animais salivarem por 40 min (14, 15). Em seguida, realizou-se uma incisão cervical mediana, divulsão dos tecidos com tesoura de ponta romba, exposição do complexo submandibular-sublingual direito, exérese das glândulas submandibular e sublingual direitas (sialoadenectomia unilateral) e dos linfonodos associados. Imediatamente após a excisão, as glândulas salivares foram seccionadas transversalmente e, juntamente com os linfonodos, foram fixados em formol 10% tamponado, pH 7,2 por 48 horas.

Posteriormente os espécimes foram submetidos a processamento histológico convencional com inclusão em parafina histológica. Cortes semisseriados foram corados pela hematoxilina e eosina (HE), e montados em Entellan[®] (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) (16), observados e fotografadas em um microscópio binocular de luz LEICA ICC50 HD[®] (Leica Microsystems, Buffalo Grove, EUA) 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).

O estudo histológico realizou-se com o auxílio de dois examinadores calibrados, e através do uso de mascaramento (estudo duplo-cego), observando estruturalmente os seguintes aspectos: 1 – aspectos morfológicos dos ácinos serosos e mucosos; 2 – aspectos dos ductos intercalares, granulosos e estriados; 3 – aspectos e abundância do estroma glandular; e 4 – presença de infiltrado inflamatório.

Técnica de TUNEL com Fluorescência. Para o método TUNEL, cortes histológicos das glândulas salivares foram dispostos em lâminas silanizadas a 4% (3-aminopropil-trietoxi

silano, SIGMA), desparafinizados em xilol, reidratados e submetidos ao procedimento TUNEL. Foi utilizado o *Kit Apoptag[®] Red in Situ* (Merk Millipore, Darmstadt, Alemanha), segundo protocolo do fabricante que consistiu em imergir os cortes em uma solução de 800U/mL de Proteinase K em solução salina tampão fosfato (PBS 0.01M, pH 7,4) por 15 minutos e incubação em uma solução contendo deoxinucleotidil-transferase (TdT) e nucleotídeos, por 60 minutos a 37°C. A seguir, foram incubados com o anticorpo antidigoxigenina conjugado à rodoamina e posteriormente foram contracorados com o DAPI (4'-6-diamino-2-fenilindole) e montado utilizando um meio *antifading*. As preparações foram observadas utilizando um microscópio de fluorescência Axioplan Zeiss[®] (Zeiss, Göttingen, Germany), utilizando os seguintes filtros: 488 nm (TUNEL) e 350 nm (DAPI). As imagens foram adquiridas utilizando uma câmera digital AxioCam MRm[®] e *software* AxioVision[®] (Zeiss, Germany). As análises qualitativas foram feitas por dois observadores através do uso de mascaramento (estudo duplo-cego).

RESULTADOS

Análise Histológica das Glândulas Submandibulares. Não houveram perdas de animais durante o experimento. Observou-se histologicamente, que uma capsula de tecido conjuntivo mais denso envolvia o complexo glandular, sendo que septos fibrosos dividiam a massa parenquimatosa regularmente. Um estroma interacinar de tecido conjuntivo frouxo permeava os lóbulos entre o parênquima glandular. As glândulas submandibulares apresentaram seus componentes em disposição regular, com estrutura parenquimatosa formado por ácinos serosos, e sistema ductal formado por ductos intercalares, granuloso, estriado e excretor. Um septo conjuntivo mais espesso separava a glândula submandibular da sublingual, que era formada por ácinos mucosos, com semiluas serosas, além da presença de ductos intercalares, estriados e excretor, sem visualização de ductos granuloso. Em nenhum dos grupos foi visualizado células com características morfológicas que caracterizasse a presença de um infiltrado inflamatório.

No grupo controle, os ácinos serosos apresentaram-se geralmente arredondados, contendo células acidófilas com grânulos secretor na porção apical e núcleos basais, esféricos e volumosos, de cromatina frouxa, mostrando nucléolo por vezes evidente. Os ductos granuloso foram predominantes sobre os demais, porém, mostraram células aparentemente “rompidas” com seus grânulos fortemente acidófilos degranulados para o lúmen. Os ácinos mucosos apresentaram-se maiores que os serosos, com células volumosas, citoplasma claro,

pouco corado pela hematoxilina-eosina e núcleos achatado com cromatina densamente distribuída, marginalizado na região basal da mesma (Fig. 1).

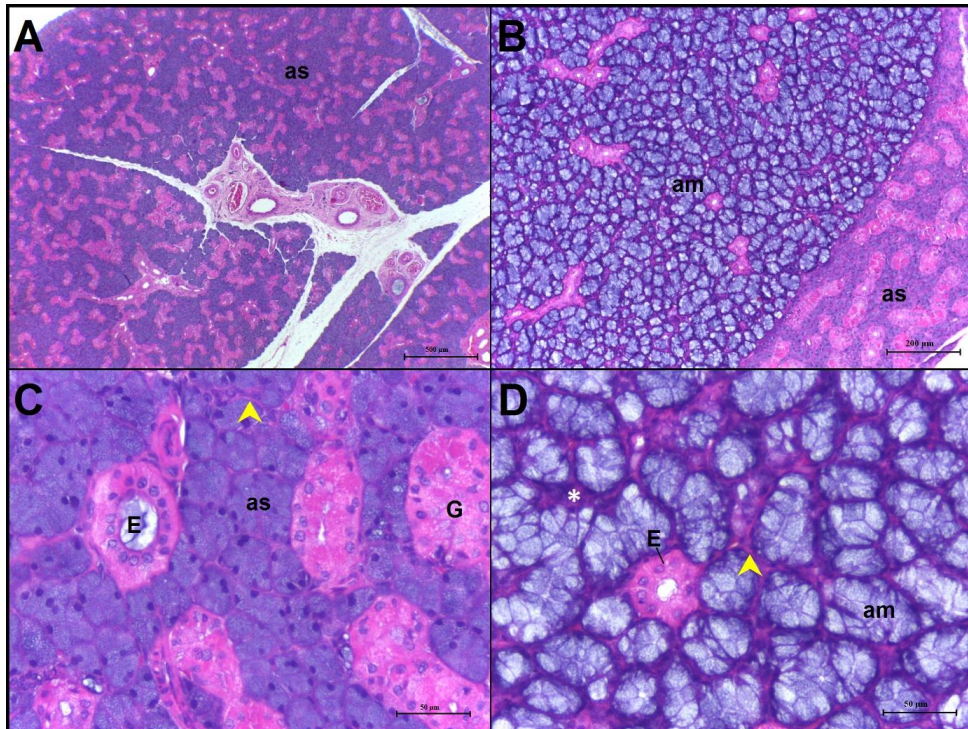


FIG 1 Fotomicrografias do complexo submandibular-sublingual de ratos do grupo Controle. Em A e C, glândula submandibular, onde observam-se ácinos serosos (as) em meio à várias secções de ductos estriados (E) e granuloso (G). Observar em A, nos septos conjuntivos, vasos sanguíneos, ductos excretores interlobulares. Em B, observa-se porções de glândula sublingual e submandibular. Em D, glândula sublingual, evidenciando os ácinos mucosos (am), semiluas serosas (asteriscos brancos), ducto estriado (E). Estroma no espaço interacinar (cabeças de setas amarelas). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Em A e B, barra = 500 μ m. Em C e D, barra = 50 μ m.

No grupo BTXA12 dias, verificou-se na glândula submandibular maior presença de vacuolizações no citoplasma das células acinares serosas, de tamanho variado e pouco corado pela hematoxilina e eosina, alguns semelhantes ao aspecto de degeneração lipídica, concentrados em pontos diversos do tecido glandular. Os ácinos apresentavam-se com volume diminuído e em algumas áreas do parênquima glandular, estavam mais afastados entre si. Entre estes, foi evidenciada uma maior quantidade de secções transversais de ductos granuloso e estriados, sendo o tecido conjuntivo mais claro com aumento do espaço interacinar (Fig. 2A, 2B e 2C). Na glândula sublingual, os ácinos mostraram-se semelhantes aos do grupo controle, porém com evidente aumento do espaço interacinar (Fig. 2D). O grupo BTXA35 dias apresentou-se de forma muito semelhantes ao grupo controle, com as alterações presentes no grupo de 12 dias bem menos acentuadas (Fig. 2E e 2F).

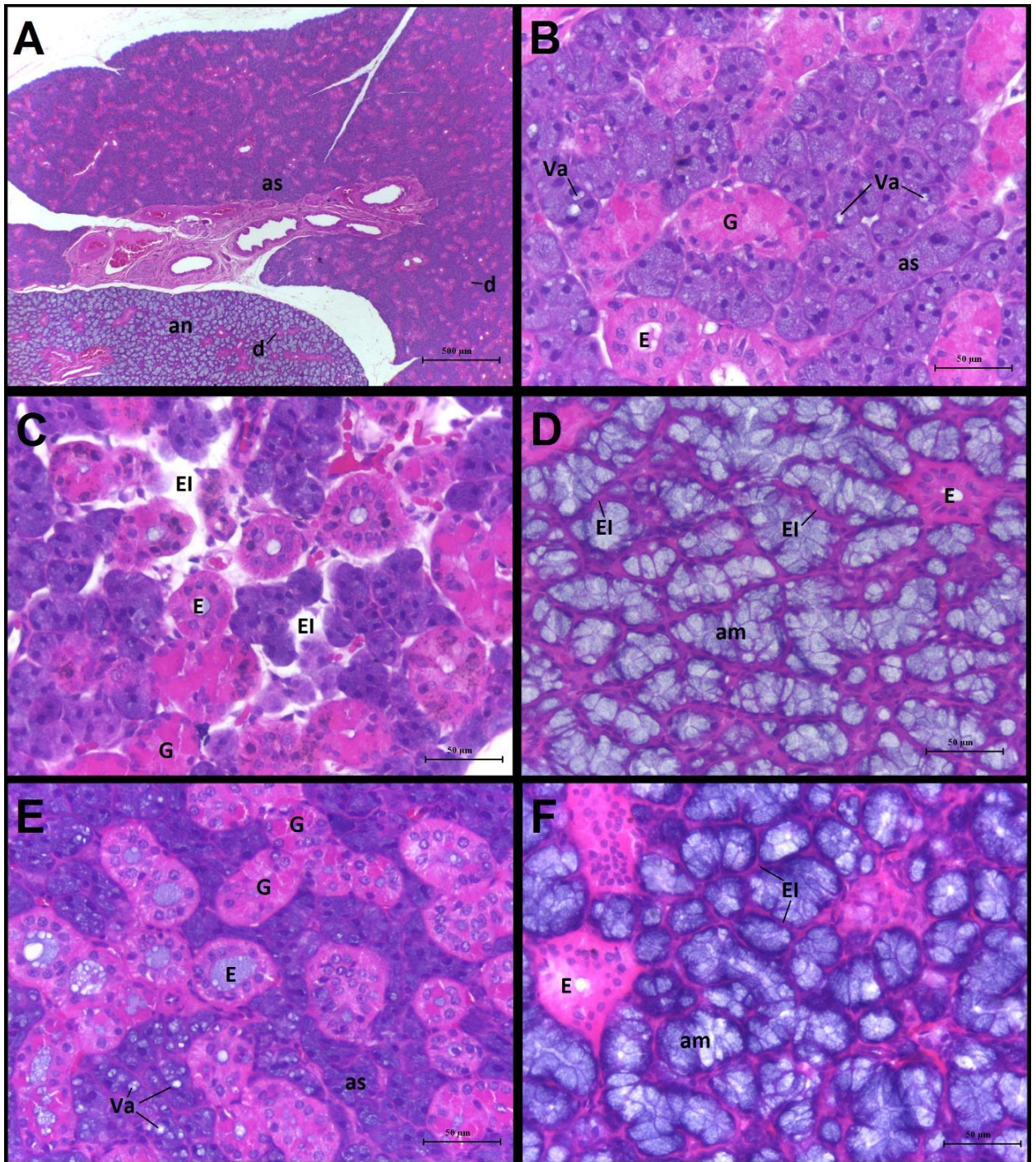


FIG 2 Fotomicrografias de parte do complexo submandibular-sublingual de ratas dos grupos BTXA 12 (A, B, C e D) e 35 dias (E e F). Em A, visão geral da glândula submandibular, onde observam-se ácinos serosos (as), e da glândula sublingual, mostrando ácinos mucosos (am), entre várias secções de ductos (d). Em B e C, maior aumento da glândula submandibular mostrando ácinos serosos (as) atrofiados, aumento do espaço interacinar (EI) e presença de vacuolizações citoplasmáticas nas células serosas (Va). Em D, glândula sublingual com ácinos mucosos (am) semelhantes ao grupo controle, porém estroma interacinar (EI) mais acentuado. Em E, glândula submandibular após 35 dias, com vacúolos citoplasmáticos (Va) nos ácinos serosos (as). Em F, nota-se entre os ácinos mucosos (am) da glândula sublingual diminuição dos espaços interacinares (EI). Ducto estriado (E) e ductos granulosos (G). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Em A, barra = 500 µm. Em B, C, D, E e F, barra = 50 µm.

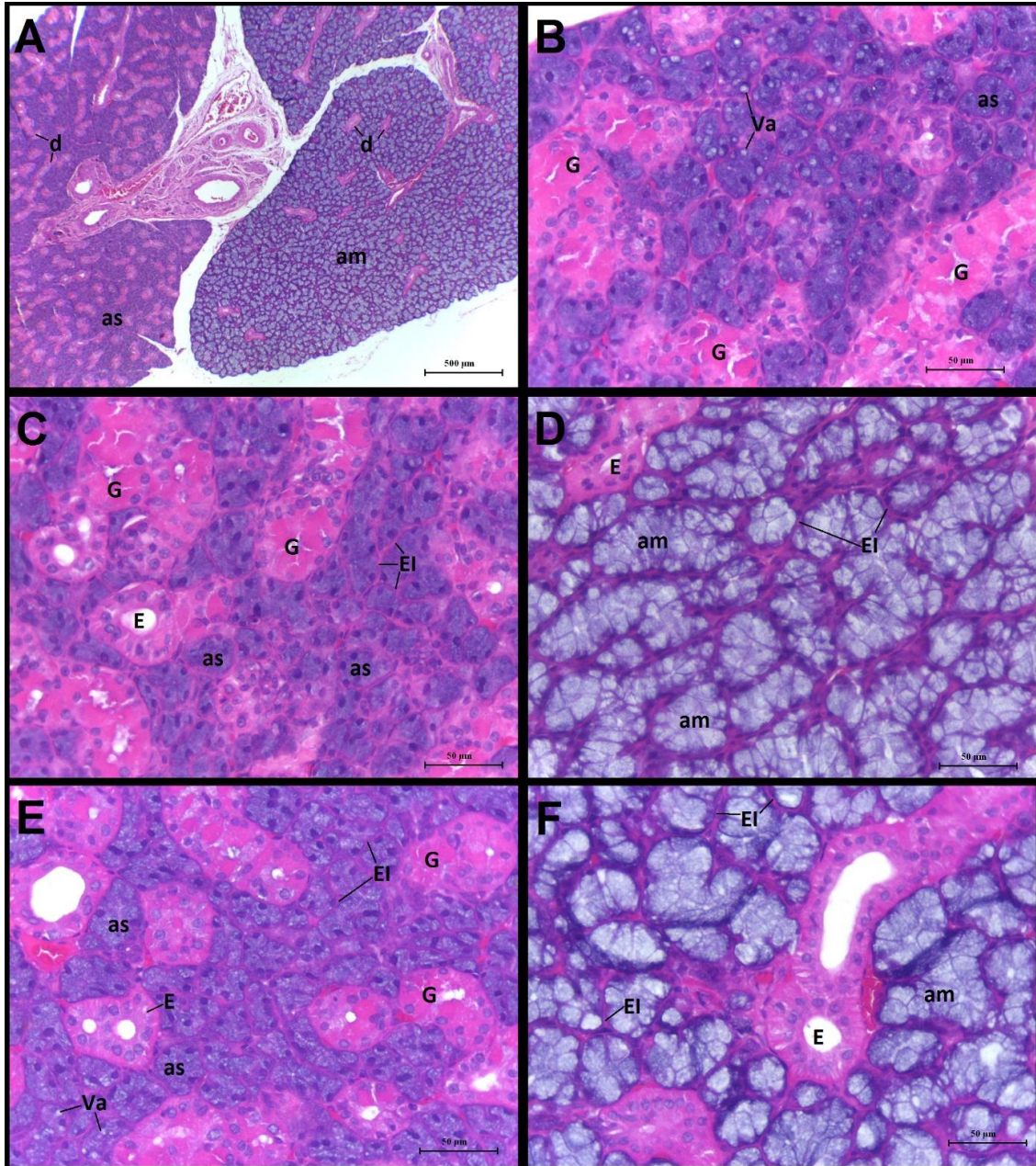


FIG 3 Fotomicrografias de parte do complexo submandibular-sublingual de ratos dos grupos GEL12 (A, B, C e D) e 35 dias (E e F). Em A, visão geral da glândula submandibular, onde observam-se ácinos serosos (as), e da glândula sublingual, mostrando ácinos mucosos (am), entre várias secções de ductos (d). Em B e C, maior aumento da glândula submandibular mostrando ácinos serosos (as), vacúolos citoplasmáticos (Va). Em D, ácinos mucosos (am) da glândula sublingual do grupo GEL 12 dias. Em E, glândula submandibular do grupo GEL 35 dias com ácinos serosos mais volumosos (as). E em F, glândula sublingual diminuição com seus ácinos mucosos (am). Ducto estriado (E), ductos granulosos (G) e espaço interacinar (EI). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Em A, barra = 500 µm. Em B, C, D, E e F, barra = 50 µm.

No grupo GEL12 dias, também foi observada presença de áreas com vacuolizações citoplasmáticas, assim como descritas nos grupos com BTXA. Os ácinos serosos apresentavam-se menos compactados que os ácinos dos grupos tratados com toxina botulínica tipo A, mas com volume levemente maior que os do grupo controle (Fig. 3A, 3B e 3C). O espaço interacinar da glândula sublingual mostra-se menor (Fig. 3D). Já aos 35 dias estas alterações se

apresentaram menos evidentes se aproximando da normalidade (Fig. 3E e 3F). O sistema ductal e a glândula sublingual não mostraram diferenças entre os grupos.

Análise pela Técnica TUNEL com Fluorescência para Apoptose. A análise qualitativa das imagens obtidas revelou reação positiva para técnica de TUNEL em todos os grupos de estudo, sendo que os núcleos em apoptose emitiram uma cor vermelha púrpura e os núcleos com seu DNA hígado emitiam uma coloração azul. No entanto, notou-se maior quantidade de figuras apoptóticas nos grupos BTXA12 dias e BTXA35 dias, quando comparado com os demais (Fig. 4). Na glândula submandibular, a reação TUNEL positiva ocorreu tanto em células acinares, como em células do sistema ductal (principalmente nos ductos estriados). Em algumas situações, percebeu-se reação positiva em células do estroma glandular. Notou-se que os grupo BTXA12 e GEL12 (Fig. 4B e 4D), apresentaram mais núcleos em apoptose, quando comparado com os grupos controle, BTXA35 e GEL35 (Fig. 4A, 4C e 4E). No entanto, foi mais intenso ainda no grupo BTXA12 dias (Fig. 4B), sugerindo aumento do número de células em apoptose no período de maior ação da droga (12 dias), diminuindo conforme a toxina perde seu efeito ao 35° dia. Na glândula sublingual foram poucas células com reação TUNEL positiva (Fig. 5).

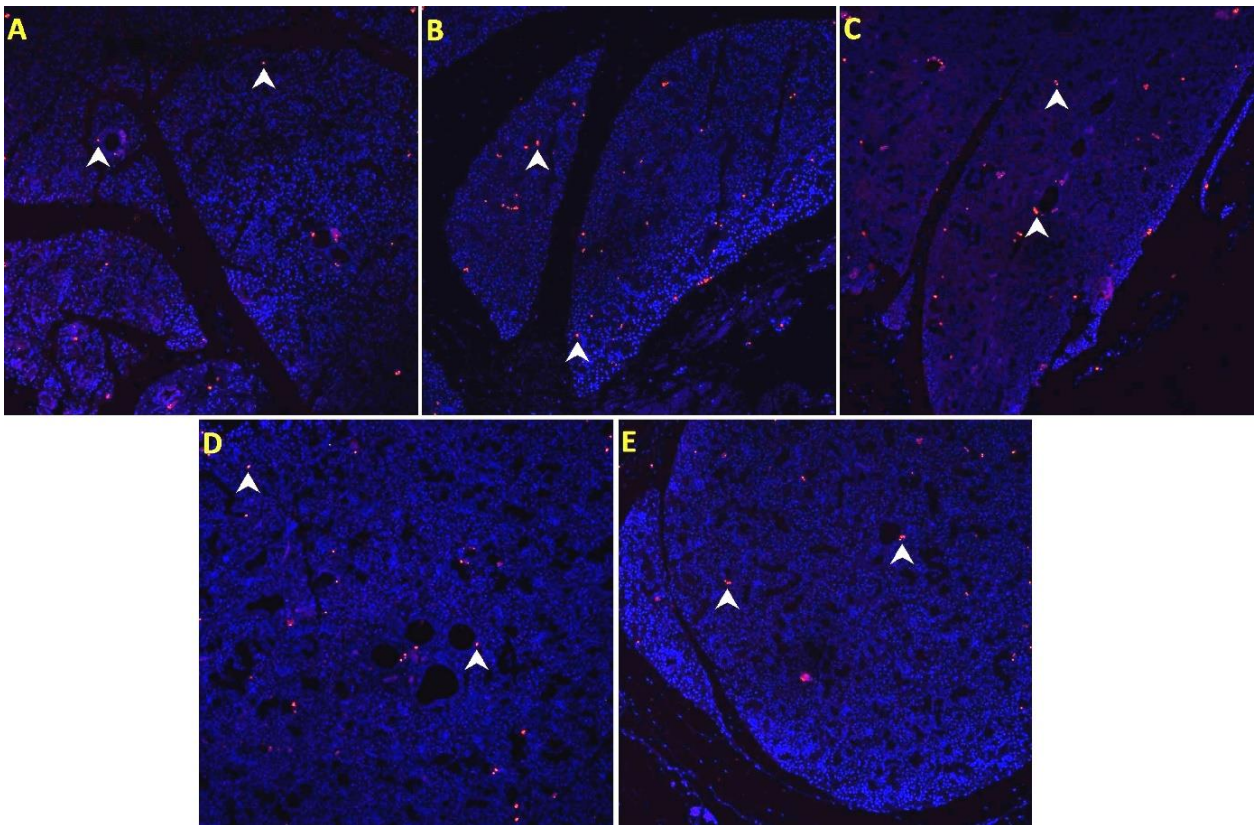


FIG 4 Fotomicrografias de fluorescência de glândulas submandibulares de ratas. Em A, grupo controle. Em B, grupo BTXA12 dias. Em C, grupo BTXA35 dias. Em D, grupo GEL12 dias. Em E, grupo GEL35 dias. Observar que os núcleos em apoptose emitem uma cor vermelha púrpura (cabeças de setas brancas) e os núcleos com seu DNA hígado emitem uma coloração azul. Técnica de TUNEL (Apoptose). Magnificação: $\pm 200x$.

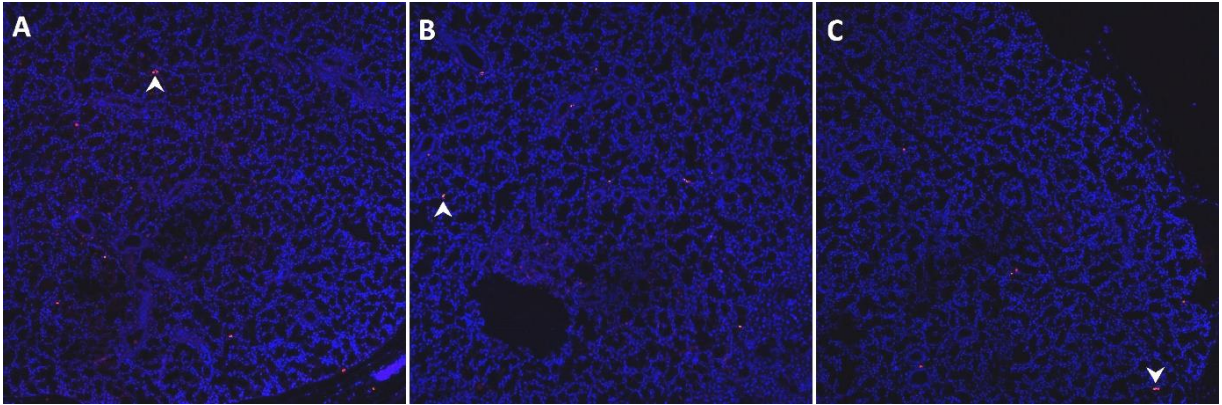


FIG 5 Fotomicrografias de fluorescência de glândulas sublinguais de ratas. Em A, grupo controle. Em B, grupo BTXA12 dias. Em C, grupo GEL12 dias. Observar que os núcleos em apoptose emitem uma cor vermelha púrpura (cabeças de setas brancas) e os núcleos com seu DNA hígado emitem uma coloração azul. Técnica de TUNEL (Apoptose). Magnificação: $\pm 200\times$.

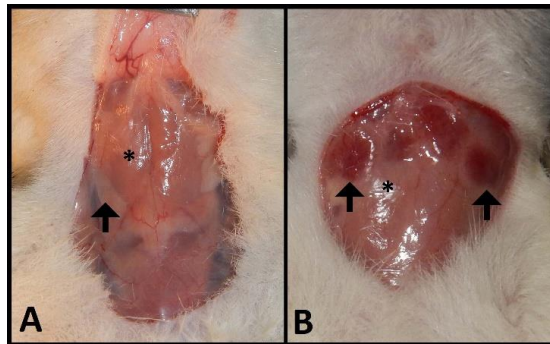


FIG 6 Fotografias de linfonodos submandibulares de ratas do grupo controle (A) e grupo BTXA (B), no momento do ato cirúrgico de exérese do complexo submandibular-sublingual direito. Observe em A e em B os linfonodos submandibulares (setas pretas) e as glândulas submandibulares direitas (asteriscos pretos).

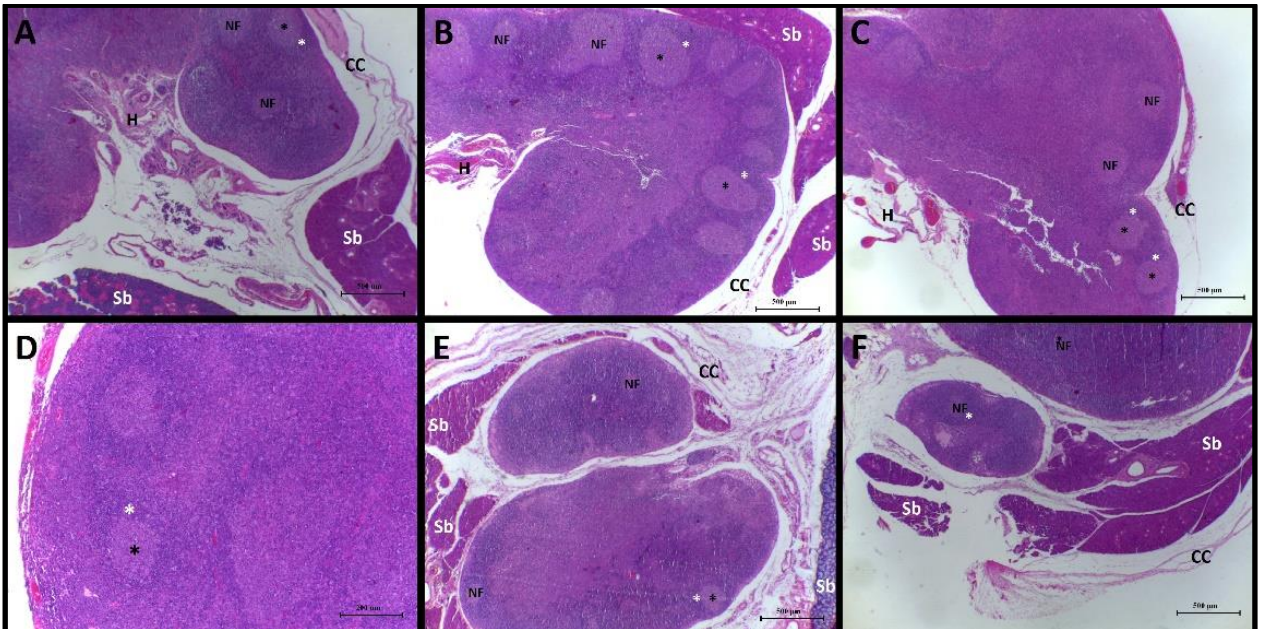


FIG 7 Fotomicrografias de linfonodos submandibulares de ratas. Em A, grupo controle. Em B, grupo BTXA12 dias. Em C e D, grupo BTXA35 dias. Em E, grupo GEL12 dias. Em F, grupo GEL35 dias. Cápsula conjuntiva (CC), nódulos linfáticos (NF), hilo do linfonodo (H), porções de glândulas submandibulares (Sb), coroas dos nódulos linfáticos (asteriscos brancos) e centros germinativos dos nódulos linfáticos (asteriscos pretos). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Em A, B, C, E e F, barra = 500 μm . Em D, barra = 200 μm .

Análise Histológica dos Linfonodos Submandibulares. Macroscopicamente, não foram evidenciados com grande frequência tumefação dos linfonodos, sugerindo pouca relevância toxicológica nestas estruturas. Já na análise histológica, não foi evidenciado diferenças estruturais na morfologia do dos linfonodos submandibulares entre os diferentes grupos de estudo. No entanto, os linfonodos do grupo tratados com toxina botulínica e analisado 12 dias após a aplicada, apresentaram uma quantidade de nódulos linfáticos estimulados, perceptível tanto macroscopicamente (Fig. 6), como microscopicamente, incluindo o centro germinativo com mais alterações reativas, diminuindo no grupo BTXA35 dias, quando comparados com o grupo controle, além de histiose sinusal. Os linfonodos, de todos os grupos estudados, apresentaram-se com uma cápsula de tecido conjuntivo, da qual partiam trabéculas conjuntivas que dividia o parênquima ganglionar em compartimentos abertos. Os nódulos linfáticos foram encontrados numa região cortical, abaixo da margem convexa do linfonodo, e ao redor da região medular que é mais central e próximo ao hilo do órgão. Entre os nódulos observou-se tecido linfoide frouxo. Os nódulos linfáticos, de formato esférico, apresentavam a zona periférica (coroa ou região cortical) e o centro germinativo, bem distintos, sendo a primeira formadas por células mais densamente organizadas e mais corada, enquanto que a segunda com células arrumadas menos densamente e com a coloração mais clara (Fig. 7).

DISCUSSÃO

O aspecto microscópico do complexo submandibular-sublingual dos grupos estudados neste trabalho, se apresentou semelhante a descrição clássica da glândula submandibular de ratos e roedores presente na literatura (17–22). Em relação aos ductos granulosos mostrarem-se com degranulação celular, que pode ser devido à falta de estímulo nervoso. Pouco é relatado na literatura dados sobre os ductos granulosos, provavelmente por não se apresentarem em glândulas salivares humanas.

A maioria dos trabalhos publicados, e em livros de histologia médica e odontológica, são descritas as glândulas salivares humanas, mas de roedores, sobretudo de ratos, pode muitas vezes causar mal-entendido entre os iniciantes da pesquisa, principalmente por conta da presença dos ductos granulosos (20).

Os resultados da presente pesquisa demonstram que a estrutura tecidual da glândula submandibular sob efeito da Toxina botulínica tipo A diminui de tamanho caracterizando uma atrofia glandular. Estes dados estão de acordo com estudos realizados em modelos animais, que

evidenciaram mudanças funcionais e estruturais das células acinares, geralmente com diminuição de volume. Como se sabe, o tratamento farmacológico com BTXA consiste em uma parassimpatectomia química a nível junção neuroglandular, produzindo uma redução do fluxo salivar pela diminuição da estimulação das células acinares (23–26), o que justificaria a constatação da atrofia da glândula no 12º dia após a aplicação, com retorno as características normais ao 35º dia.

A aparente atrofia ou compactação dos ácinos serosos também é relatada por diversos autores que também trabalharam com toxina botulínica (24,27,28). Observações semelhantes foram descritas em glândulas parótidas de ratos (29,30). Em glândulas submandibulares de ratos, tratadas com toxina botulínica dos tipos A, B e A/B simultaneamente, também observou-se redução significativa na redução do peso das glândulas, assim como observado em nossos resultados, nos quais foi evidenciado ácinos serosos menores e mais compactados durante o período do pico de ação da toxina botulínica (12 dias) em glândulas submandibulares. Porém, a maioria dos referidos autores não discutiram sobre a possibilidade de apoptose (24).

Em outros métodos de desnervação parassimpática da glândula submandibular de ratos, como na secção do nervo corda do tímpano, também houve diminuição do peso glandular (31), assim como de todo o complexo submandibular-sublingual (32).

O aumento do espaço interacinar identificado neste estudo, se assemelha ao descrito por Shan et al. (33), que aplicaram toxina botulínica tipo A de origem chinesa em glândulas submandibulares de coelhos.

A maior quantidade de tecido fibroso e atrofia das células acinares serosas também foi descrito em um estudo que tratou com BTX-A glândulas submandibulares transplantadas em coelhos. Observou-se diminuição do volume das células acinares serosas e menor número de grânulos secretores em seu citoplasma, mas com retorno gradual da organização tecidual semelhante ao grupo controle ao logo do tempo, devido a diminuição do efeito da BTX-A (34). Em estudos com glândulas parótidas de ratos sob ação da BTX-A, observaram compactação e redução do número de ácinos serosos hipocelularidade e aumento do espaço interlobular (30).

No entanto, trabalhos anteriores com a aplicação de toxina botulínica tipo A em glândulas submandibulares de ratos e coelhos (11,35), respectivamente, concluíram em seus estudos não haver alterações relevantes de tamanhos de ácinos. Outra pesquisa com glândulas parótidas de ratos, concluiu haver tumefação nas células o 7º dia após a aplicação da droga, justificando ser pela retenção da produção de secreção no citoplasma glandular (12).

Em relação as vacuolizações citoplasmáticas, já foram relatadas em outros trabalhos com secreção de glândulas salivares. O aparecimento dos vacúolos é sinal inicial de degeneração parenquimatosa e atrofia glandular (36–38). Vários fatores podem causar alterações nas glândulas salivares, como, por exemplo, o estresse emocional (39), consumo de álcool via oral (40), dieta líquida (41–43), pois, talvez a falta da mastigação pode alterar o fluxo e a composição da saliva (42,43). A presença de vesículas citoplasmáticas pode ocorrer pela grande penetração de fluidos no citoplasma das células acinares (44). O estresse pode explicar o aparecimento de alguns vacúolos no grupo controle, uma vez que os animais ficam confinados em gaiolas e biotério.

Em observações feitas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) de células serosas de glândulas submandibulares de ratos tratados com toxina botulínica, evidenciou-se alterações e coalescência dos grânulos secretores, com menos material secretor no seu interior, descritas como vacuolizações intracitoplasmáticas (24). Muitas células acinares da glândula parótida podem perder seus grânulos secretores, revelando em seu citoplasma vacúolos extensos e grosseiros (30). Estes grânulos secretores se apresentaram de forma semelhante nas glândulas submandibulares de coelhos (33).

As vacuolizações em glândulas submandibulares podem ser devido a lesão da membrana celular e da sua atividade de transporte, com acúmulo de gotículas lipídicas de ácidos graxos não utilizados, uma vez que há diminuição do metabolismo celular ou ao mecanismo de bloqueio do íon Ca^{2+} (45). Reforçando esta ideia, outros autores descrevem as vacuolizações como degeneração intracitoplasmática de natureza lipídica (46). Além disso, animais fêmeas são mais sensíveis aos efeitos de medicamentos xerogênicos e pode influenciar a produção de saliva pela variação hormonal (47). A progesterona, por exemplo, pode promover um aumento nos ductos granulosos e aumento na quantidade de grânulos de secreção (48).

Em desnervação parassimpática cirúrgica de glândulas submandibulares de ratos, ocorreu a diminuição da aquaporina 5 (AQP5) nas células acinares, sugerindo-se que a estas vacuolizações estejam relacionadas com a formação de vacúolos lisossômicos, pois segundo os autores, a regulação da AQP5 pode ser feita por algumas enzimas proteolíticas lisossômicas que fazem seu catabolismo. Também verificaram que os níveis de RNAm para AQP5 não são afetados, reforçando a ideia de que os níveis de AQP5, quando há o bloqueio de estímulos por acetilcolina, se dá pelo sistema lisossômico e não pela regulação transcricional (31,49). Outros autores verificaram diminuição de AQP5 pelas vias de autofagossomos e lisossomos na desnervação cirúrgica, sem afetar sua síntese de RNAm, e observaram elevação da Bax

(proteína proapoptótica) e aumento do nível de Bcl-2 (proteína antiapoptose). A desnervação induziu a expressão das proteínas de LC3B-II (proteína marcadora de autofagossomas) e LAMP-2 (marcador lisossômico), indicando autofagia nas células glandulares. A análise imunohistoquímica revelou um aumento no número de estruturas *lisossoma-like* para AQP5 e LAMP-2 nas células acinares (50,51). As pesquisas de Xu et al. (52,53), também corroboram para estes dados e concluiu que após aplicação de BTXA em glândula submandibular de ratos, há diminuição do nível da expressão das proteínas SNAP-25, enzima AChE e AQP5. Resultados semelhantes sobre a expressão e translocação da proteína AQP5, no trabalho com glândulas submandibulares transplantadas em coelhos (34).

Relatos sobre a possível nocividade da gelatina bovina, como excipiente inerte da BTXA, são inexistentes. Por se origem xenógena, talvez desperte alguma reação local de corpo estranho, com liberação de mediadores químicos que interfira na secreção glandular, mas não há nada comprovado, sendo necessários estudos mais focados para verificar verdadeiramente a sua inércia. Apesar de não ter sido observado células inflamatórias nos tecidos desta pesquisa, deve-se ter em mente que mediadores químicos da inflamação podem interferir na secreção glandular. Em trabalhos com ratos, Prestifilippo et al. (22), concluíram que pode haver inibição da secreção salivar por substâncias inflamatórias.

Citocinas liberadas por células inflamatórias reduz a secreção das glândulas salivares ao impedir a liberação de acetilcolina na junção neuroglandular (54). Já foi observado o aumento das quimiocinas CCL2 (MCP-1) e CXCL10 (IP10) em glândulas submandibulares de ratos que pararam de receber estímulo parassimpático, pela desnervação cirúrgica (55). Um estudo concluiu que a apoptose sofrida pelas células acinares e ductais, podem ser por via Fas e FasL (proteínas com expressão aumentada após a ativação de linfócitos T) e estão relacionadas a indução da morte celular programada pela via extrínseca (56).

Sobre as figuras apoptóticas visualizadas no tecido glandular, sabe-se que a apoptose é um mecanismo que está presente na glândula submandibular normal, desde o seu desenvolvimento no período pós-natal, através de um processo de autofagocitose (57). A homeostasia glandular requer um equilíbrio entre a multiplicação e morte de células acinares, o que pode explicar o aparecimento de figuras apoptóticas no grupo controle, assim como dos outros grupos experimentais, no presente trabalho (58).

Em trabalhos realizados com ligaduras e posterior reabertura de ductos excretores principais de glândulas parótidas, sublinguais e submandibulares de ratos para entender o processo de regeneração glandular, foi descrito atrofia do parênquima glandular, com

desaparecimento de células acinares, além de algumas figuras de apoptose e que, com o passar do tempo, observa-se regeneração das células glandulares, podendo ser visualizadas figuras de mitose (56,59–63). Autores descrevem que o tecido da glândula submandibular de ratos, tem uma capacidade notável de se recuperar da atrofia, com a presença de fatores neurotróficos provenientes da reinervação celular, voltando a se tornar funcional (64).

Uma recente revisão de literatura juntou evidências da ação da toxina botulínica tipo A não apenas sobre a SNAP-25, mas que também possui outros efeitos farmacológicos, sobretudo no ciclo celular e apoptose (atividade pró-apoptóticas e antitumoral) (65). Estes dados reforçam as evidências de uma maior quantidade de células em apoptose nos grupos tratados com BTXA.

Já foi descrito que as células acinares mucosas de glândulas sublinguais de ratos são aparentemente mais resistentes, quando comparadas com células serosas da glândula parótida (60), enquanto que as células acinares serosas são menos resistentes à obstrução nas glândulas submandibulares (59). O que pode explicar a quantidade aparentemente maior de figuras apoptóticas na glândula submandibular, quando comparada com a glândula sublingual.

Na literatura, poucos trabalhos investigaram apoptose em glândula salivar sob influência da BTXA pela técnica de TUNEL. Reação TUNEL-positiva foi observada em células acinares e ductais de glândulas submandibulares de coelhos tratadas com BTXA, sendo mais evidente nas células ductais e com maior distribuição duas semanas após a aplicação da droga, e promovendo diminuição da expressão dos receptores M3 e da AQP5 (33). Células TUNEL-positivas são descritas após desnervação cirúrgica em glândulas submandibulares de coelho, diminuindo gradativamente com a reinervação da glândula (66).

Não existem muitos estudos com humanos que verifique possíveis alterações na estrutura parenquimatosa e estromal de glândulas tratadas com BTXA. Em pesquisa utilizando imagens de ultrassonografia de glândulas submandibulares e parótidas de crianças, foi verificado que o uso recorrente da BTXA reduziu o tamanho das glândulas salivares. Estes pesquisadores realizaram medições da área superficial, diâmetros anteroposterior e mediolateral das glândulas. Mas recomenda-se estudos histopatológicos para verificar se esta redução macroscópica está relacionada à atrofia ou à apoptose das glândulas, além de correlacionar se estas mudanças são permanentes ou transitórias (67).

O único estudo com análise histológica realizado com glândulas submandibulares de crianças portadoras de sialorreia com causas primárias diversas, concluiu que não houveram diferenças significativas no grau de fibrose, inflamação, dano celular e apoptose entre os dois

grupos de estudo, mas sem danos diretos sobre a estrutural tecidual. Desta forma, a ação da BTXA sobre as glândulas salivares ainda não está clara (68).

Em relação a maior presença de nódulos linfáticos nos grupos tratados com toxina botulínica tipo A (BTX-A 12 dias e 35 dias), pode ser devido à presença da droga (proteínas de origem exógena) no tecido glandular adjacente. A formação do centro germinativo e o aparecimento de histiose sinusal foi evidenciado em trabalhos com criação de glândula parótida em porcos (69). As reações linfonodais podem ser devido a uma ativação da resposta imune (70). Na histiocitose sinusal ocorre infiltrado de macrófagos (histiócitos) e pode representar uma resposta imunológica do linfonodo frente à algum antígeno (71). Os linfonodos podem apresentar nódulos linfáticos primários e secundários, sendo que estes últimos ocorrem após estimulação antigênica (72).

CONCLUSÃO

A partir da análise qualitativa, pode-se concluir que a aplicação intraglandular da toxina botulínica tipo A promove uma atrofia dos ácinos serosos, formação de vacuolizações citoplasmáticas e aumento de incidência de morte celular programada o que sugere que ela seja um dos mecanismos responsáveis pela diminuição da sialorreia. O efeito da BTXA é transitório e fica claro que o tecido glandular é bastante resiliente, conseguindo se recuperar das lesões sofridas quando os estímulos nervosos são retomados. O estabilizante da toxina, a gelatina de origem bovina, parece ser um excipiente seguro na formulação. Entretanto, os linfonodos associados as glândulas nos grupos tratados com BTXA parecem apresentar um forte padrão de reatividade dos nódulos linfáticos associados a drenagem linfática destas glândulas do complexo submandibular-sublingual.

Porém, para melhores esclarecimentos a respeito do efeito da BTX-A em glândulas salivares, são realmente necessárias outras investigações experimentais sobre diferentes componentes moleculares do parênquima e estroma glandular.

REFERÊNCIAS

1. **Mato A, Limeres J, Tomás I, Muñoz M, Abuím C, Feijoo JF, Diz P.** 2010. Management of drooling in disabled patients with scopolamine patches. *British Journal of Clinical Pharmacology* **69**(6):684-688. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2125.2010.03659.x>.

2. **Khadivi E, Zadeh FA, Bakhshae M, Fooladvand T, Movahed SR, Nabavi SS, Aghae MA.** 2013. Bilateral submandibular duct rerouting: Assessment of results on drooling in cerebral palsy cases. *Auris Nasus Larynx* **40**:487-490. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anl.2013.01.007>.
3. **Zlotnik Y, Balash Y, Korczyn AD, Giladi N, Gurevich T.** 2015. Disorders of the Oral Cavity in Parkinson's Disease and Parkinsonian Syndromes. *Parkinsons Dis* **2015**:1-6. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/379482>.
4. **Zeller RS, Lee HM, Cavanaugh PF, Davidson J.** 2012. Randomized Phase III evaluation of the efficacy and safety of a novel glycopyrrolate oral solution for the management of chronic severe drooling in children with cerebral palsy or other neurologic conditions. *Ther Clin Risk Manag* **8**:15-23. <http://dx.doi.org/10.2147/TCRM.S26893>.
5. **Heffernan C, Adil E.** 2015. Four-duct ligation. *Oper. tech. otolaryngol.-head neck surg* **26**:39-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.otot.2015.01.003>.
6. **World Health Organization (WHO).** 2011. World Report on Disability. Geneva, Switzerland: World Health Organization, Geneva, Switzerland. Available in <http://www.refworld.org/docid/50854a322.html>. [Access in 15 Nov. 2016].
7. **World Health Organization (WHO).** 2013. Governments to agree increased focus on people with disabilities in development strategies. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Available in http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2013/disability_and_development_20130920/en/. [Access in 21 Jun. 2014].
8. **Rieder CRM, Schestatsky P, Socal MP, Monte TL, Fricke D, Costa J, Picon PD.** 2007. A Double-blind, Randomized, Crossover Study of Prosigne Versus Botox in Patients With Blepharospasm and Hemifacial Spasm. *Clin Neuropharmacol* **30**:39-42. <http://dx.doi.org/10.1097/01.WNF.0000236771.77021.3C>.
9. **Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA.** 2006. Prosigne® - Mitos e Verdades. São Paulo, Brazil. Available in http://www.2cristalia.com.br/prosigne/mitos_e_verdades.pdf. [Access in 12 Jan. de 2014].
10. **Sposito MMM.** 2010. Chemical blockage for cerebral palsy spasticity treatment. *Acta Fisiátr* **17**(2):68-83. Available in http://www.actafisiatrica.org.br/detalhe_artigo.asp?id=55#. [Access in 12 Feb. de 2013].
11. **Ellies M, Laskawi R, Götz W, Arglebe C, Tormählen G.** 1999. Immunohistochemical and morphometric investigations of the influence of botulinum toxin on the submandibular

- gland of the rat. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **256**(3):148-152. <http://dx.doi.org/10.1007/s004050050129>.
12. **Ellies M, Laskawi R, Tormäblen G, Götz W.** 2000. The Effect of Local Injection of Botulinum Toxin A on the Parotid Gland of the Rat: An Immunohistochemical and Morphometric Study. *J Oral Maxillofac Surg*, **58**(11):1251-1256. <http://dx.doi.org/10.1053/joms.2000.16625>.
 13. **Ellies M, Schütz S, Quondamatteo F, Laskawi R.** 2006. The effect of local injection of botulinum toxin A on the immunoreactivity of nNOS in the rat submandibular gland: An immunohistochemical study. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* **70**:59-63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijporl.2005.05.015>.
 14. **Benard MA, Fabian FW, Rosen S, Hoppert CA, Hunt HR.** 1956. A Method for the Collection of Large Quantities of Rat Saliva. *J. Dent Res* **35**:326-327. <http://dx.doi.org/10.1177/00220345560350022801>.
 15. **Asari T, Maruyama K, Kusama H.** 2009. Salivation Triggered by Pilocarpine Involves Aquaporin-5 in Normal Rats but Not in Irradiated Rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **36**:531-538. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1681.2008.05104.x>.
 16. **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.
 17. **Jacoby F, Leeson CR.** 1959. The post-natal development of the rat submaxillary gland. *J. Anat* **93**:201-216.
 18. **Lorber M.** 1991. Branchings and course of the larger ducts and accompanying structures within the rat submandibular salivary gland. *Am J Anat* **190**(2):133-156. <http://dx.doi.org/10.1002/aja.1001900204>.
 19. **Cecchini MP, Merigo F, Cristofolletti M, Osculati F, Sbarbati A.** 2009. Immunohistochemical localization of Clara cellsecretory proteins (CC10-CC26) and Annexin-1 protein in rat major salivary glands. *J Anat* **214**(5):752-758. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01074.x>.
 20. **Amano O, Mizobe K, Bando Y, Sakiyama K.** 2012. Anatomy and histology of rodent and human major salivary glands: overview of the Japan salivary gland society-sponsored workshop. *Acta Histochem Cytochem* **45**(5):241-250. <http://dx.doi.org/10.1267/ahc.12013>.
 21. **Cecchini MP, Parnigotto M, Merigo F, Marzola P, Tambalo S, Boscho F, Colombo L, Sbarbati A.** 2013. 3D Printing of Rat Salivary Glands: The Submandibular-Sublingual Complex. *Anat Histol Embryol* **43**(3):1-6. <http://dx.doi.org/10.1111/ahc.12074>.

22. **Prestifilippo JP, Medina VA, Mohn CE, Rodriguez PA, Elverdin JC, Fernandez-Solar J.** 2013. Endocannabinoids mediate hyposalivation induced by inflammogens in the submandibular glands and hypothalamus. *Arch Oral Biol.*, **58**(9):1251-1259. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.04.003>.
23. **Ellies M, Laskawi R, Rohrbach-Volland S, Arglebe C, Beuche W.** 2002. Botulinum toxin to reduce saliva flow: selected indications for ultrasound-guided toxin application into salivary glands. *Laryngoscope*, **112**:82-86. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-72992005000500004>.
24. **Teymoortash A, Sommer F, Mandic R, Schulz S, Bette M, Aumüller G, Werner JA.** 2007. Intraglandular application of botulinum toxin leads to structural and functional changes in rat acinar cells. *Br. J. Pharmacol* **152**:161-167. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp>.
25. **Valencia DV, Mendoza A.** 2011. Toxina botulínica tipo A, una nueva opción en el tratamiento de la sialorrea en niños con parálisis cerebral. *Rev Colom Med Fis Rehab* **21**:23-31.
26. **Dressler D.** 2013. Botulinum toxin therapy: its use for neurological disorders of the autonomic nervous system. *J Neurol* **260**:701-713. <http://dx.doi.org/10.1007/s00415-012-6615-2>.
27. **Yuan F, Hou Y, Wen W.** 2004. Immunohistochemical and morphological investigations of the influence of botulinum toxin type A on the submandibular gland of the rats. *J Clin Otorhinolaryngol* **18**(9):558-560. [http://dx.doi.org/10.1001-1781\(2004\)09-0558-03](http://dx.doi.org/10.1001-1781(2004)09-0558-03). PMID: 15696959.
28. **Coskun BU, Savk H, Cicek ED, Basak T, Basak M, Dadas B.** 2007. Histopathological and radiological investigations of the influence of botulinum toxin on the submandibular gland of the rat. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **264**:783-787. <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-007-0254-8>.
29. **Wen W-D, Yan F, Hou Y-P.** 2009. The mechanism of inhibitory effect on parotid gland secretion with local injection of botulinum toxin type A in the rat. *Chin J Stomatol* **44**:38-40.
30. **Younis RE, Abou Elkhier MT, Mourad MI, Elnahas W.** 2013. The ultrastructural changes of the parotid gland of rats after intraglandular injection of botulinum toxin A. *Annals of Oral & Maxillofacial Surgery*, **1**(4):38. Available in <<http://www.oapublishinglondon.com/article/1095>>. [Access in 11 Jan. de 2014].
31. **Li X, Karabasil MR, Purwanti N, Yao C, Akamatsu T, Kanamori N, Kazuo Hosoi K.** 2006. Effects of autonomic denervation and administration of SNI-2011 on the expression

- of AQPs in the rat submandibular gland. p 39. Abstracts 3rd International Symposium on Salivary Glands in Honor of Niels Stensen. Okazaki Conference Center, NINS, Japan.
32. **Bazerque PM, Perec CJ, Terradas SE.** 1972. Calcium in Salivary Glands of the Rat After Autonomic Denervation. *J Dent Res* **51(4):918-922.** <http://dx.doi.org/10.1177/00220345720510043201>.
 33. **Shan X-F, Xu H, Cai Z-G, Wu L-L, Yu G-Y.** 2013. Botulinum toxin A inhibits salivary secretion of rabbit submandibular gland. *Int J Dent Oral Sci* **5(4):217-223.** <http://dx.doi.org/10.1038/ijos.2013.82>.
 34. **Xie S, Xu H, Lin B, Wang K, Shan X-F, Cai Z-G.** 2016. An Experimental Study on Botulinum Toxin Type A for the Treatment of Excessive Secretion after Submandibular Gland Transplantation in Rabbits. *J Ophthalmol* **9:1-8.** <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7058537>.
 35. **Gerlinger I, Szalai G, Hollódy K, Németh A.** 2007. Ultrasound-guided, intraglandular injection of botulinum toxin A in children suffering from excessive salivation. *J Laryngol Otol* **121(10):947-951.** <http://dx.doi.org/10.1017/S0022215107006949>.
 36. **Johnson DA, Sreebny LM.** 1971. Effect of food consistency and starvation on the diurnal cycle of the rat parotid gland. *Archs Oral Biol* **16:177-185.** [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9969\(71\)90105-1](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9969(71)90105-1).
 37. **Hand AR, Ho B.** 1981. Liquid-diet-induced alterations of rat parotid acinar cells studied by electron microscopy and enzyme cytochemistry. *Archs Oral Biol.* **26(5):369-380.** [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9969\(81\)90032-7](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9969(81)90032-7).
 38. **Hall FL, Taylor SM, Birnie SE.** 1985. Activity interference and noise annoyance. *J Sound Vib* **103(2):237-252.** [http://dx.doi.org/10.1016/0022-460X\(85\)90236-6](http://dx.doi.org/10.1016/0022-460X(85)90236-6).
 39. **Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL.** 2006. *The Laboratory Rat.* 2nd ed. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
 40. **Fernandes LM, Teixeira FB, Alves-Junior SM, Pinheiro JJ, Maia CS, Lima RR.** 2015. Immunohistochemical changes and atrophy after chronic ethanol intoxication in rat salivary glands. *Histol Histopathol* **30(9):1069-1078.** <http://dx.doi.org/10.14670/HH-11-604>.
 41. **Wilborn WH, Schneyer CA.** 1970. Ultrastructural changes of rat parotid glands induced by a diet of liquid Metrecal. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **103:1-11.** <http://dx.doi.org/10.1007/BF00335396>.
 42. **Leal SC, Toledo OA, Bezerra ACB.** 2003. Morphological alterations of the parotid gland of rats maintained on a liquid diet. *Braz. Dent. J* **14(3):172-176.** <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-64402003000300006>.

43. **Elghamrawy T.** 2015. The effect of liquid diet on the parotid gland and the protective role of L-carnitine: Immunohistochemical and ultrastructural study. *Folia Morphol* **74**:42-49. <http://dx.doi.org/10.5603/FM.2015.0007>.
44. **Tirapelli L, Tirapelli D, Schimming B.** 2001. Ultrastructural alterations of the parotid glands of rats (*Rattus norvegicus*) submitted to experimental chronic alcoholism. *Rev. Chil. Anat* **19**(2). <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-98682001000200009>.
45. **El-Agamy AA, Afifi OK, Sheta AA.** 2014. Protective Role of Panax Gensing on Fluvoxamine Maleate Induced Structural Changes in the Submandibular Salivary Gland of Rats. *Nat Sci* **12**(4):21-29. Available in http://www.sciencepub.net/nature/ns1204/003_23449ns120414_21_29.pdf. [Access in 12 Oct. de 2015].
46. **Elsharkawy GEZ, Alhazzazi TY.** 2016. The Effect of the Commonly Used Antidepressant Drug Amitriptyline (TCAs) on the Salivary Glands. *Dent Oral Disord Ther* **4**(2):1-5. <http://dx.doi.org/10.15226/jdodt.2016.00163>.
47. **Tscheng DZ.** 2002. Sialorrhea – therapeutic drug options. *Ann. Pharmacother* **36**(11):1785-1790. <http://dx.doi.org/10.1345/aph.1C019>.
48. **Silva HA, Melhado RM.** 1996. Reversibilidade dos efeitos da progesterona na glândula submandibular do camundongo fêmea. Estudo histológico e histoquímico. *Rev. odontol. UNESP* **25**:85-96.
49. **Li X, Azlina A, Karabasil MR, Purwanti N, Hasegawa T, Yao C, Akamatsu T, Hosoi K.** 2008. Degradation of submandibular gland AQP5 by parasympathetic denervation of chorda tympani and its recovery by cevimeline, an M3 muscarinic receptor agonist. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **295**:G112-G123. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00359.2007>.
50. **Azlina, A.; Li, X.; Javkhlan, P.; Hasegawa, T.; Yao, C.; Akamatsu, T.; Hosoi, K.** Down-regulation of submandibular gland AQP5 following parasympathetic denervation in rats. *J Med Invest.*, v. 56, Suppl. 1, p. 273-276, 2009. PMID: 20224200.
51. **Azlina A, Javkhlan P, Hiroshima Y, Hasegawa T, Yao C, Akamatsu T, Hosoi K.** 2010. Roles of lysosomal proteolytic systems in AQP5 degradation in the submandibular gland of rats following chorda tympani parasympathetic denervation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **299**:G1106-G1117. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00194.2010>.
52. **Xu H, Shan X, Cai Z, Wu L.** 2013. Botulinum neurotoxin A reduces salivary secretion by inhibiting AQP5 activity in rat submandibular gland. Abstracts 21st ICOMS - International

- Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, Barcelona. *Int J Oral Maxillofac Surg* **42**(10):1351.
53. **Xu H, Shan XF, Cong X, Yang NY, Yu GY, Zhang Y, Cai ZG.** 2015. Pre- and Post-synaptic Effects of Botulinum Toxin A on Submandibular Glands. *J Dent Res* **94**(10):1454-1462. <http://dx.doi.org/10.1177/0022034515590087>.
54. **Yu J-H.** 1986. Modulating effects of prostaglandins on parasympathetic-mediated secretory activities of rat salivary glands. *Prostaglandins* **31**(6):1087-1097. [http://dx.doi.org/10.1016/0090-6980\(86\)90212-1](http://dx.doi.org/10.1016/0090-6980(86)90212-1).
55. **Kang JH, Kim BK, Park BI, Kim HJ, Ko HM, Yang SY, Kim MS, Jung JY, Kim WJ, Oh WM, Kim SH, Kim JH.** 2010. Parasympathectomy induces morphological changes and alters gene-expression profiles in the rat submandibular gland. *Arch Oral Biol.*, v. 55, n. 7, p. 7-14, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2009.11.003>.
56. **Takahashi S, Gobe GC, Yoshimura Y, Kohgo T, Yamamoto T, Wakita M.** 2007. Participation of the Fas and Fas ligand systems in apoptosis during atrophy of the rat submandibular glands. *Int. J. Exp. Path* **88**:9-17. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2613.2006.00511.x>.
57. **Hatashi H, Ozono S, Watanabe K, Nagatsu I, Onokuza M.** 2000. Morphological Aspects of the Postnatal Development of Submandibular Glands in Male Rats: Involvement of Apoptosis. *J. Histochem. Cytochem* **48**(5):695-698. <http://dx.doi.org/10.1177/002215540004800513>.
58. **Limesand KH, Schwertfeger KL, Anderson SM.** 2006. MDM2 is required for suppression of apoptosis by activated Akt1 in salivary acinar cells. *Mol Cell Biol* **26**(23):8840-8856. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.01846-05>.
59. **Takahashi S, Nakamura S, Suzuki R, Islam N, Domon T, Yamamoto T, Wakita M.** 1998. Apoptosis and mitosis of parenchymal cells in the duct-ligated rat submandibular gland. *Tissue Cell* **32**(6):457-463. [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-8166\(00\)80002-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-8166(00)80002-6).
60. **Takahashi S, Shinzato K, Nakamura S, Domon T, Yamamoto T, Wakita M.** 2002. The roles of apoptosis and mitosis in atrophy of the rat sublingual gland. *Tissue Cell* **34**(5):297-304. <http://dx.doi.org/10.1016/s0040816602000034>.
61. **Takahashi S, Schoch E, Walker NI.** 1998. Origin of acinar cell regeneration after atrophy of the rat parotid induced by duct obstruction. *Int. J. Exp. Path* **79**:293-301. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2613.1998.710405.x>.
62. **Takahashi S, Shinzato K, Nakamura S, Domon T, Yamamoto T, Wakita M.** 2004. Cell death and cell proliferation in the regeneration of atrophied rat submandibular glands after

- duct ligation. *J Oral Pathol Med* **33**:23-29. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.2004.00191.x>.
63. **Takahashi S, Nakamura S, Domon T, Yamamoto T, Wakita M.** 2005. Active participation of apoptosis and mitosis in sublingual gland regeneration of the rat following release from duct ligation. *J Mol Hist* **36**:199-205. <http://dx.doi.org/10.1007/s10735-005-1764-6>.
64. **Carpenter CH, Khosravani N, Ekström J, Osailan SM, Paterson KP, Proctor GB.** 2009. Altered plasticity of the parasympathetic innervation in the recovering rat submandibular gland following extensive atrophy. *Exp Physiol* **94**(2):213-219. <http://dx.doi.org/10.1113/expphysiol.2008.045112>.
65. **Matak I, Lackvić Z.** 2015. Botulinum neurotoxin type A: Actions beyond SNAP-25? *Toxicology* **335**:79-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2015.07.003>.
66. **Zhang SE, Su YX, Zheng GS, Liang YJ, Liao GQ.** 2014. Reinnervated nerves contribute to the secretion function and regeneration of denervated submandibular glands in rabbits. *Eur J Oral Sci* **122**(6):372-381. <http://dx.doi.org/10.1111/eos.12154>.
67. **Cardona I, Saint-Martin C, Daniel SJ.** 2015. Effect of Recurrent Onabotulinum Toxin A Injection Into the Salivary Glands: An Ultrasound Measurement. *Laryngoscope* **125**(10):E328-E332. <http://dx.doi.org/10.1002/lary.25222>.
68. **Mosseri A, Cardona I, Blumenkrantz M, Daniel SJ.** 2016. Histopathologic Effects of Onabotulinum Toxin A Treatment in Pediatric Submandibular Glands. *Otolaryngol Head Neck Surg* **2016**:1-3. <http://dx.doi.org/10.1177/0194599816679940>.
69. **Buerthe JY, Abboud S, Brock K, Nizialek G, Rezaee R, Wasman J, Frankel J, Nakamoto DA.** 2016. Percutaneous CT-Guided Cryoablation of the Salivary Glands in a Porcine Model. *J Vasc Interv Radiol* **27**(12):1907-1912. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvir.2016.06.002>.
70. **Baust JG, Gage AA.** 2005. The molecular basis of cryosurgery. *BJU Int* **95**(9):1187-1191. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1464-410X.2005.05502.x>.
71. **Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC.** 2010. Robbins & Contran – Patologia: Bases Patológicas das Doenças. 8th ed. Elsevier, Rio de Janeiro, Brazil.
72. **Ovalle WK, Nahirney PC.** 2014. Netter: Bases da Histologia. 2nd ed. Elsevier, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Apêndice II – Artigo 2

APLICAÇÃO LOCAL DE TOXINA BOTULÍNICA TIPO A NO COMPLEXO SUBMANDIBULAR-SUBLINGUAL DE RATAS: ANÁLISE DA MICROBIOTA FÚNGICA ORAL

*LOCAL APPLICATION OF BOTULINUM TOXIN TYPE A IN THE SUBMANDIBULAR-
SUBLINGUAL COMPLEX OF RATS: ANALYSIS OF ORAL FUNGAL MICROBIOTA*

Jaciel Benedito de Oliveira^{1*}, Liriane Baratella-Evêncio², Luciana Silva Regueira³,
Maria Daniela Silva Buonafina⁴, Rair de Meneses Quirino⁵, Joaquim Evêncio Neto⁶

¹Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal (PPGBA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e Departamento de Anatomia do Centro de Biociências (CB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE);

²Departamento de Histologia e Embriologia, CB, UFPE;

³Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde (CCS), UFPE;

⁴Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, CB, UFPE;

⁵Curso de Graduação em Medicina, CCS, UFPE;

⁶Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFO) e do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal (PPGBA), UFRPE, Recife, Pernambuco, Brazil.

***Correspondência:**

Jaciel Benedito de Oliveira

E-mail: jacieloliveira@gmail.com

Resumo

Os fungos dos gêneros *Candida spp.* e *Aspergillus spp.* podem ser encontrados como microrganismos comensais em animais, inclusive na cavidade oral. Alterações no fluxo salivar, podem causar desequilíbrios, sendo de grande importância na micologia. O objetivo deste estudo foi identificar gêneros de fungos através da caracterização morfológica e avaliar a sensibilidade antifúngica *in vitro* destes isolados da cavidade oral de ratos com glândula submandibular sob influência da toxina botulínica tipo A (BTX-A). Foram utilizadas 32 ratas Wistar adultas, distribuídas em cinco grupos: Controle, sem tratamento (n=7); grupos BTX-A 12 (n=7) e BTX-A 35 (n=6), que receberam a aplicação de 2,5U de toxina botulínica tipo A em glândulas submandibulares direitas; e grupos GEL 12 (n=6) e GEL 35 (n=6), cujas glândulas direitas receberam injeção de 0,125 mg gelatina de origem bovina. Os grupos BTX-A 12 e GEL 12 foram analisados aos 12 dias após o tratamento, enquanto os grupos BTX-A 35 e GEL 35, foram analisados aos 35 dias após aplicação. A morfotipagem foi baseada em características macro e micromorfológicas de isolados semeados em meios de cultura Ágar Sabourand. As técnicas de microdiluição em caldo, por meio do protocolo M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* modificado, foi para avaliar a sensibilidade *in vitro* das cepas coletadas. Os fármacos testados foram Cetoconazol (KTC), Ciclopirox Olamina (CPOA), Anfotericina B (AMB). Pelas características fenotípicas, foram identificados dois gêneros presentes apenas nos dois grupos tratados com BTX-A, *Candida spp.* e *Aspergillus spp.* Os fungos do gênero *Candida spp.*, foram sensíveis à anfotericina B, seguido pelo cetoconazol e ciclopirox olamina. Já os fungos do gênero *Aspergillus spp.* foram mais resistentes à anfotericina B e ao ciclopirox olamina, quando comparados ao gênero *Candida spp.* No entanto, *Aspergillus spp.* foi mais sensível ao cetoconazol. Sendo assim, conclui-se que a BTX-A ao diminuir a salivagem na cavidade oral dos animais, pode provocar um desequilíbrio em sua microbiota e favorecer a patogenicidade de espécies fúngicas.

Palavras-chaves: toxina botulínica tipo A, rato Wistar, *Candida*, salivagem, infecções fúngicas, microbiota, diagnóstico, glândula submandibular

Abstract

Fungi of the genus *Candida spp.* and *Aspergillus spp.* can be found as commensal microorganisms in animals, including the oral cavity. Alterations in the salivary flow may cause imbalances, being of great importance in the mycology. The objective of this study was to identify fungal genera through morphological characterization and to evaluate antifungal sensitivity *in vitro* of these isolates from the oral cavity of rats with submandibular gland under the influence of botulinum toxin type A (BTX-A). Thirty-two adult Wistar rats were used, distributed in five groups: Control, without treatment (n = 7); BTX-A 12 (n = 7) and BTX-A 35 (n = 6) groups, who received the application of 2.5U botulinum toxin type A in right submandibular glands; and GEL 12 (n = 6) and GEL 35 (n = 6) groups, whose right glands were injected with 0.125 mg gelatin of bovine origin. BTX-A 12 and GEL 12 groups were analyzed at 12 days post-treatment, while the BTX-A 35 and GEL 35 groups were analyzed at 35 days after application. Morphotyping was based on macro and micromorphological characteristics of isolates seeded in culture media Sabourand Agar. The microdilution techniques in broth, using the modified Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) protocol M38-A2, was used to evaluate the *in vitro* sensitivity of the strains collected. The drugs tested were ketoconazole (KTC), cyclopirox olamine (COPA), amphotericin B (AMB). Based on the phenotypic characteristics, two genera were present only in the two groups treated with BTX-A, *Candida spp.* and *Aspergillus spp.* The fungi of the genus *Candida spp.* were sensitive to amphotericin B, followed by ketoconazole and cyclopirox olamine. The fungi of the genus *Aspergillus spp.* were more resistant to amphotericin B and cyclopirox olamine when compared to the genus *Candida spp.* However, *Aspergillus spp.* was more sensitive to ketoconazole. Thus, it is concluded that BTX-A by decreasing salivation in the oral cavity of the animals, can cause an imbalance in its microbiota and favor the pathogenicity of fungal species.

Keywords: botulinum toxins type A, rats Wistar, *Candida*, salivation, mycoses, microbiota, diagnosis, submandibular gland

INTRODUÇÃO

Na boca, a barreira física epitelial, a microbiota bacteriana nativa, a limpeza mecânica da saliva e proteínas salivares, como anticorpos salivares, lisozima, polipeptídeos ricos em histidina, lactoferrina e lactoperoxidase, desempenham um papel importante para manter as leveduras orais sob controle (Jorge et al., 1993). Com um quadro de hipossalivação, todas essas funções estarão prejudicadas (Almståhl et al., 2003).

Os fungos possuem importante papel na manutenção do equilíbrio fisiológico do organismo hospedeiro, inclusive humanos, através de suas atividades metabólicas, embora a diversidade fúngica e sua quantidade sejam reduzidas quando comparadas com a bacteriana (Findley et al., 2013; Borges et al., 2014; Leung et al., 2016). A *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente isolada em amostras clínicas, porém, é cada vez mais comum encontrar outras espécies não-albicans, destacando-se *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis* (Sobel, 2006; Meurman et al., 2007). E a candidose oral está associada tanto a fatores sistêmicos como a fatores locais, como, por exemplo, a diminuição do fluxo salivar e alterações da microbiota bucal (Budtz-Jørgensen, 1990; Allen, 1992).

Recentemente, a toxina botulínica tipo A (BTX-A) começou a ser experimentada, com bons resultados na diminuição da sialorreia (hipersalivação), condição clínica em que há o acúmulo de grande quantidade de saliva na cavidade oral, levando à várias complicações de saúde, como pneumonia aspirativa. Geralmente é secundária às diversas condições sistêmicas, como Doença de Parkinson, Lesão Cerebral, Doença de Alzheimer, Esclerose Lateral Amiotrófica, dentre outras, e podem causar um preocupante quadro clínico de escape salivar (Alrefai et al. 2009; Alter, 2010; Breheret et al., 2011; Møller et al., 2011).

Alguns autores afirmam que a aplicação da BTX-A pode gerar efeitos colaterais, dentre eles um possível quadro de diminuição da taxa do fluxo salivar, tanto quantitativa como qualitativamente, conhecido como xerostomia (“boca seca”) (Ondo et al. 2004; Gama, 2010).

Com um quadro de hipossalivação, todas as funções salivares estarão prejudicadas e, conseqüentemente, aumenta o risco de fenômenos patogênicos orais (Almståhl et al., 2003). A perturbação no equilíbrio ecológico oral afeta a proliferação de microrganismos, com aumento do índice de cáries, doenças periodontais, infecção fúngica e causar doenças oportunistas (Sreebny, 2000; Turk-Gonzales e Odderson, 2005; Melfi e Alley, 2010).

Diante disso, o presente estudo teve o objetivo de identificar, através da caracterização morfológica, gêneros de fungos isolados da cavidade oral de ratas tratadas com injeção

intraglandular com toxina botulínica tipo A (BTX-A), e avaliar a sensibilidade *in vitro* destes isolados aos fármacos anfotericina B (AMB), cetoconazol (KTC) e ciclopirox olamina (CPOA), importantes drogas utilizadas na clínica médica para tratamento de micoses.

MATERIAL E MÉTODOS

Considerações Éticas e Tratamento dos Animais

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Biociências (CB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob o parecer de número 23076.023152/2014-14. Foram utilizadas 32 ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*), fêmeas, adultas pesando entre 200-300 g. Os animais tiveram livre acesso a água e comida com uma dieta padrão para roedores do biotério (Presence[®] Nutrição Animal para Ratos, SP, Brasil) e foram mantidos 4 animais por gaiola de gaiolas de polipropileno (49x34x16 cm), em temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Todas as manipulações experimentais foram realizadas entre 7:00 e 10:00 horas.

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos: grupo controle com 7 animais, sem quaisquer tratamentos do complexo submandibular-sublingual; grupo BTX-A 12 dias, com 7 animais, cujas glândulas submandibulares dos complexos submandibulares-sublinguais direitos receberam injeção de 2,5 U toxina botulínica tipo A (*Prosigne*[®], Cristália, Itapira, SP, Brasil), reconstituída em 0,1 mL de solução de cloreto de sódio 0,9%, evitando-se o borbulhamento e agitação do diluente sobre a toxina, e analisadas 12 dias após a aplicação; grupo BTX-A 35 dias, com 6 animais, cujas glândulas salivares receberam o mesmo tratamento do grupo BTX-A 12 dias, porém analisadas 35 dias após a aplicação; grupo GEL 12 dias e grupo GEL 35 dias, com 6 animais cada, cujas glândulas receberam injeção de 0,125 mg gelatina de origem bovina (Gelita do Brasil Ltda., SP, Brasil), também diluída em 0,1 mL de cloreto de sódio 0,9%, e analisadas 12 e 35 dias após a aplicação da gelatina, respectivamente (Ellies et al., 1999).

Para a aplicação da toxina botulínica tipo A e da gelatina de origem bovina nas glândulas submandibulares do complexo, os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (50 mg/kg de peso – Clortamina[®], BioChimico, Itatiaia, RJ, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg de peso – Rompun[®], Bayer S.A., SP, Brasil), na proporção de 1:1 associados na mesma seringa e administrados por via intramuscular. A seguir, foi realizado antissepsia do local com digluconato de clorexidina 2% (FGM do Brasil[®], Joinville, SC, Brasil), tricotomia da região

cervical dos animais e aplicação das drogas pelo método palpatório e localização anatômica do complexo submandibular-sublingual. Posteriormente, posicionou-se a agulha entre no terço médio do complexo, com a finalidade de injetar a droga apenas na glândula submandibular. As aplicações intraglandulares foram em dose única, utilizando-se seringa de insulina de 1 mL/cc ultrafina, com agulha de calibre de 8 mm (5/16") x 0,3 mm (30G) (BD, Curitiba, Paraná, Brasil).

Obtenção dos Isolados Fúngicos da Cavidade Oral

Após a realização do procedimento anestésico e verificação da efetividade da mesma, posicionou-se o animal em decúbito dorsal numa mesa previamente preparada e coberta com um capô cirúrgico esterilizado (Araújo et al., 2007). A cavidade oral do animal foi aberta com o auxílio de uma pinça clínica e a língua do animal foi tracionada anteriormente com o auxílio de uma gaze estéril.

Foi realizada coleta da microbiota fúngica do dorso da língua, palato e mucosa jugal da cavidade oral das ratas através de um *swab* estéril friccionado por 2 minutos pela mucosa bucal. Para a análise fúngica, as amostras coletadas foram transferidas para tubos de ensaio estéril e vedado contendo 5mL de água adicionada de 50 mg/L cloranfenicol. Além disso, foram feitas coletas da cama de maravalha das gaiolas e da ração padrão do biotério de alimentação dos animais como forma de controle.

Realização do Diagnóstico Micológico

Para cada amostra coletada foi produzida uma lâmina para microscopia e o isolamento por cultura em Ágar Sabourand Dextrose. Lâminas foram preparadas com a amostra biológica entre lâmina e lamínula, com adição de Azul de Amann, clarificado com solução aquosa a 20% de hidróxido de potássio, para possível visualização de estruturas fúngicas à microscopia direta em um microscópio óptico biológico Olympus Cx21 (Olympus Optical do Brasil Ltda., SP, Brasil) com objetiva de 40x de aumento. Concomitantemente, as amostras clínicas foram semeadas na superfície do meio Ágar Sabourand (DIFCO, Maryland, EUA) suplementado de 50 mg/L de cloranfenicol contido em placas de Petri, mantidas à temperatura de 37°C por até 15 dias. Após o surgimento das colônias, estas foram purificadas a partir de suspensões com água destilada esterilizada adicionada de 50mg/L de cloranfenicol e semeadas em estrias para posterior identificação.

Identificação dos Isolados

Os isolados foram identificados a nível de gênero de acordo com as características morfológicas macroscópicas e microscópicas, bem como pela sua capacidade de crescimento em meio de cultura (Ágar de Sabourand), de acordo a taxonomia clássica e auxílio de manuais de identificação.

Verificação das características macroscópicas: fragmentos da cultura foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo os meios Ágar Sabourand, Ágar Extrato de Malte e Ágar Batata Dextrose (BDA) (Lacaz et al., 2002), acordo com o fungo em estudo. As placas foram mantidas a 30°C e a 37°C por até 15 dias e após este período, foram realizadas as diferentes análises fenotípicas como diâmetro, bordas, textura e coloração do verso e reverso das colônias, produção de pigmentos e tempo de crescimento (Rapper e Fennel, 1977; Hoog et al., 2000; Klich, 2002; Sidrim e Rocha, 2004).

Verificação das características microscópicas: a verificação de microestruturas somáticas e reprodutivas foi realizada pela técnica de microcultivo em de Dalmau (1929) (cultivo em lamínula), na qual fragmentos das colônias foram semeados em três pontos equidistantes em placas Petri contendo o meio de cultura específico para cada grupo de fungos, e sobre estas colocadas lamínulas previamente esterilizadas. A preparação permaneceu a temperatura de 37°C por, aproximadamente, sete a 15 dias conforme a espécie em estudo. As lamínulas do cultivo foram retiradas e invertidas sobre uma lâmina de vidro, contendo 40 µL de Azul de Amann e observação microscópica (Carranza, 1949; Rapper e Fennel, 1977; Hoog et al., 2000; Klich, 2002; Sidrim e Rocha, 2004).

Perfil de Sensibilidade a Antifúngicos

O ensaio de sensibilidade a antifúngicos foi desenvolvido segundo a técnica de microdiluição em caldo, por meio do protocolo M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), modificado. A sensibilidade foi definida pelo padrão do CLSI. Para a exposição, foram utilizados 3 antifúngicos disponíveis comercialmente: Cetoconazol (KTC) (Química Farmacêuticz, Bayer, Barcelona, Espanha), Ciclopirox Olamina (CPOA) (Aventis, Dermik Laboratories, Berwyn, PA, EUA), Anfotericina B (AMB) (UNIANF[®], SP, BRA).

A solução-estoque dos antifúngicos foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO; Vetec, Brasil) e, posteriormente, realizaram-se diluições no meio RPMI 1640 (Meio de cultura desenvolvido por *Roswell Park Memorial Institute*, Sigma, St. Louis, MO, EUA) tamponado a pH 7,0 com 165 mM de ácido morfolino-propanosulfônico (MOPS; Sigma, Vetec, Brasil), para obter as concentrações (doses) máximas e mínimas das drogas: para KTC, 64 a 0,125 $\mu\text{m}/\text{mL}$; e para a AMB e CPOA, 0,03 a 16 $\mu\text{m}/\text{mL}$.

Os isolados que cresceram em placas, foram repicados em Ágar batata-dextrose (DIFCO, Detroit, MI, EUA), acrescidos de 2% de farinha de arroz (Maninho, Brasil) e mantidos a 28°C por 2 dias. Posteriormente foi pegou uma amostra de celularidade que cresceu em placa de cada isolado e realizada uma suspensão em 5 mL de solução salina 0,85% e ajustada em espectrofotômetro (Shanghai Spectrum Instruments Co., Ltd., Xangai, China) até atingir densidade celular com transmitância de 80-82% a 530 nm.

Em placas de microtitulação de fundo chato com 96 poços, foram dispostos 100 μL de meio RPMI 1640 mais o MOPS (RPMI-MOPS), distribuídos nas colunas 11 e 12, as quais foram utilizadas como controle de crescimento (controle positivo, só o fungo) e de esterilização (controle negativo, só a droga), respectivamente. No poço 1 foi colocada a dose máxima de cada droga: KTC, 64 $\mu\text{m}/\text{mL}$; AMB, 16 $\mu\text{m}/\text{mL}$; e CPOA, 16 $\mu\text{m}/\text{mL}$. Em seguida, a dose máxima foi diminuída pela metade em cada poço subsequentemente, até chegar no poço 10 com a dosagem mínima da droga: KTC, 0,125 $\mu\text{m}/\text{mL}$; AMB, 0,03 $\mu\text{m}/\text{mL}$; e CPOA, 0,03 $\mu\text{m}/\text{mL}$. Utilizou-se o volume de 100 μL de cada uma das diluições das drogas a serem testadas nas colunas de 1 a 10, nas devidas concentrações. Em seguida, 100 μL do inóculo padronizado foram adicionados aos poços com o meio RPMI-MOPS das colunas 1 a 11, diluído na proporção 1:50, sendo as microplacas incubadas a 35°C por 48 horas. As placas de microtitulação foram incubadas a 28°C por 3 dias. A cepa de *Candida krusei* ATCC 6258 foi utilizada como controle de qualidade dos testes. Os testes foram realizados em duplicata.

A determinação da concentração inibitória mínima (MIC) foi realizada visualmente por comparação com o crescimento do controle livre de fármaco. A MIC foi definida como a menor concentração de fármaco capaz de inibir totalmente o crescimento fúngico para as drogas utilizadas. Após a realização dos testes de sensibilidade antifúngica, os resultados obtidos foram analisados tendo como referência o protocolo M38-A2 do CLSI (2008) para ser traçado o perfil de sensibilidade desses isolados.

Análise Estatística do Perfil de Sensibilidade

A identificação dos gêneros foi apresentada de forma descritiva, de acordo com os grupos de estudo. Para comparar as diferenças de efetividade entre as diferenças drogas utilizadas nos testes de susceptibilidade dos isolados, foi realizado o teste de *Correlação de Spearman* pelo software *SPSS Statistics Desktop*[®] 22.0 (IBM, International Business Machines Corp., New York, EUA). As conclusões levaram em consideração o nível de significância de 0,05 (5%).

RESULTADOS

Diagnóstico Micológico e Identificação dos Isolados

Todos os ratos utilizados neste trabalho apresentaram-se sem lesões na mucosa oral e sem presença de placa dentária.

Para identificação dos isolados, das amostras semeadas foram isolados dois fungos filamentosos. Um dos fungos, observou-se crescimento no meio de cultura Ágar de Sabourand em torno de 48 horas após a semeadura. Identificou-se inicialmente na semeadura minúsculos pontos e posteriormente colônias de cor creme, sem pigmento, lisas, brilhantes, glabras, úmidas, com consistência mole e odor de levedo. Na identificação microscópica, observou-se a presença de leveduras com hifas verdadeiras, blastoconídios e clamidósporos típicos, redondos, terminais e intercalares, característicos do gênero *Candida spp.*

Também foram observadas placas com crescimento rápido, colônia filamentosa granulosa pelo relevo rugoso, bordas irregulares, textura pulverulenta, com coloração que variava de branca que mudava de tonalidade para verde acinzentado, até colônias com tons cinza, preto, marrom e amarelo. Microscopicamente, constatou-se hifas septadas hialinas com septos uniformes, conídios globosos e conidióforos longos e lisos, asseptado, característicos do gênero *Aspergillus spp.*

Para o grupo controle e os grupos GEL 12 dias e GEL 35 dias, não foram observadas estruturas fúngicas nas duas práticas de identificação. Para os grupos que receberam injeção intraglandular de toxina botulínica, os resultados diferiram. No grupo BTX-A 12 dias, o exame microscópico não revelou estruturas fúngicas, tanto para leveduras, como para estruturas filamentosas. Já no cultivo em placas de Ágar Sabourand acrescida de cloranfenicol, os resultados foram: 2 animais (33,3%) apresentaram fungos do gênero *Aspergillus spp.* e 4 animais (66,6%) apresentaram *Candida spp.*

Já no grupo BTX-A 35 dias, o exame de microscopia demonstrou a presença de raras células de leveduras dentre as células do epitélio da mucosa oral, em 2 animais. O cultivo em placas mostrou que esses animais apresentaram *Candida spp.* na cavidade oral. Em relação aos outros animais em estudo, não foram observadas estruturas fúngicas a microscopia. No cultivo em Ágar Sabourand, observamos 3 animais (50%) com *Aspergillus spp.* e 3 animais (50%) com *Candida spp.*

Atividade Antifúngica in vitro para Perfil de Sensibilidade

Os resultados aqui descritos são em relação aos achados no diagnóstico micológico realizado nos cinco grupos de estudo. Não foi isolado nenhum fungo nos grupos controle, GEL 12 dias e GEL 35 dias (Tabela 1). Já os resultados para o perfil de sensibilidade às drogas Anfotericina B (AMB), Cetoconazol (KTC) e Ciclopirox Olamina (CPOA), para os isolados dos grupos BTX-A 12 dias e BTX-A 35 dias, estão descritos na **Tabela 1**.

Em relação à sensibilidade do gênero *Candida sp.* à anfotericina B (AMB) nos dois grupos BTX-A (12 e 35 dias), 85,71% das amostras foram inibidas à concentração de 1 µg/mL, enquanto que o restante foi inibido na concentração de 2 µg/mL. Já o gênero *Aspergillus sp.*, 80% foram inibidos à uma concentração de 2 µg/mL, enquanto que os 20% restantes foram mais sensíveis, sendo inibido na concentração de 1 µg/mL (**Figura 1**).

O teste com a droga cetoconazol (KTC) resultou em sensibilidade à uma concentração de 16 µg/mL de 28,57% do isolados de *Candida spp.* dos dois grupos de BTX-A, enquanto que o restante da amostra (71,43%), foram inibidos à uma concentração de 8 µg/mL. Para os fungos do gênero *Aspergillus spp.* foram sensível às três concentrações diferentes de 4 µg/mL (40%), 8 µg/mL (40%) e 16 µg/mL (20%) (**Figura 1**).

Na sensibilidade ao ciclopirox olamina (CPOA), 42,86% dos isolados do gênero *Candida spp.* foram sensíveis à uma concentração de 4 µg/mL, e o restante (57,14%) à uma concentração de 2 µg/mL. Dos isolados de *Aspergillus spp.*, 80% foi sensível à uma concentração de 4 µg/mL, e apenas 1 animal (20%) foi inibido na concentração de 1 µg/mL (**Figura 1**).

Para as espécies do gênero *Candida spp.*, ver-se que o mesmo foi mais sensível ao antifúngico anfotericina B (AMB), pois uma concentração de 1 µg/mL foi capaz de inibir 85,71% dos isolados, seguido do cetoconazol (KTC) (71,43%) e ciclopirox olamina (CPOA) (57,14%), sendo os MICs dos dois últimos de 8 µg/mL e 2 µg/mL, respectivamente (**Figura 1**).

Os fungos do gênero *Aspergillus spp.* mostraram-se mais resistentes quando comparados ao gênero *Candida spp.* em relação a anfotericina B (AMB) e ao ciclopirox olamina (CPOA), pois para inibir a maior porcentagem dos isolados (80%), foram necessários MICs de 2 µg/mL e 4 µg/mL, respectivamente. Já para a droga cetoconazol (KTC), o gênero *Aspergillus spp.* mostrou-se mais sensível que o *Candida spp.*, uma vez que os MICs para inibir 80% de seus isolados foram 4 µg/mL e 8 µg/mL, sendo 40% para cada concentração (**Figura 1**).

Ou seja, tanto as cepas de *Candida sp.* quando as de *Aspergillus sp.* dos grupos BTX-A 12 e 35 dias, foram mais sensíveis à anfotericina B, variando a sensibilidade para as outras duas drogas. Observou-se também que houve uma tendência à maior sensibilidade com o passar do efeito do tratamento. Independe do grupo analisado e do fármaco utilizado, o teste de Correlação de Spearman não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre a eficiência dos fármacos utilizados ($p > 0,05$).

DISCUSSÃO

Diante dos resultados obtidos, é possível se fazer diferentes associações entre a utilização da toxina BTX-A e o desenvolvimento de fungos em cavidade oral dos animais. Embora já esteja descrito em literatura a constituição da microbiota da cavidade oral de ratos como sendo constituída por diferentes espécies de fungos e bactérias, as quais vivem em colonização garantindo a constituição de uma defesa adequada contra a invasão de processos infecciosos nessa região, no presente estudo, não foi possível observar nos animais dos grupos que não foram expostos à toxina botulínica tipo A, o isolamento de microrganismos fúngicos, tanto nos exames diretos quanto nas culturas em placa.

Pouco há descrito sobre interferência do tratamento da sialorreia com injeção intraglandular de toxina botulínica tipo A na glândula submandibular, sobretudo no que se refere a microbiota fúngica.

Entretanto, estudos realizados por Freire-Garabal et al. (1999), após provocar hipossalivação pelo bloqueio dos ductos excretores das três glândulas salivares maiores, estabeleceram infecção por *C. albicans* com invasão tecidual. Segundo Sreebny (2000), Turk-Gonzales e Odderson (2005) e Melfi e Alley (2010), alterações de fluxo salivar influenciada pela toxina botulínica pode ser considerada importante para a manifestação da quebra do equilíbrio microbiológico da cavidade oral do animal.

Almståhl e colaboradores (2003), em estudo feito com humanos, verificaram que mudanças na microbiota oral, relacionadas com a hipossalivação há o aumento de microrganismos acidogênicos e acidúricos. Meitner et al. (1990), descreveram que a diminuição do fluxo salivar pela utilização de drogas promoveu infecção intensa por *C. albicans* na boca e esôfago de ratos, tornando-se um fungo patogênico. Já Totti et al. (1996), concluíram que a xerostomia facilitou a colonização de *C. albicans*, mas não de outras espécies. E Jorge et al. (1993), também afirmaram que candidíase também ocorreu em ratos sialoadenectomizados.

Estes achados são especialmente importantes, pois, segundo Blanco e Garcia (2000), a espécie *C. albicans* não necessita que o hospedeiro seja imunocomprometido para a colonização saprófita da mucosa, estando presentes também em indivíduos imunologicamente competentes. *Candida spp.* são patógenos importantes, inclusive em infecções sistêmicas (Brown et al., 2005). Já, segundo Reijula e Tuomi (2003), *Aspergillus spp.* são considerados fungos oportunistas encontradas em ambientes domésticos e profissionais, produtores de micotoxinas de periculosidade severa.

Sobre a identificação pela morfologia dos gêneros *Candida spp.* e *Aspergillus spp.*, as características apresentadas estão de acordo com descrito por Hoog et al. (2000), Sidrim e Rocha (2004) e Brito et al. (2007).

A identificação de apenas dois gêneros e, tão somente nos grupos tratados com BTX-A, pode ser justificado pelo número de microrganismo fúngicos (leveduras ou filamentosos) ser relativamente pequeno, quando comparado ao número de colônias bacterianas, em uma microbiota de um animal saudável e sem sinais de imunodeficiência. Mas, de acordo com Gabal (1988) e Nobre et al. (1998), que trabalharam com *Malassezia pachydermatis* em cães, por exemplo, leveduras oportunistas podem necessitar de fatores predisponentes para causar doença e sua proliferação pode ser inibida ou favorecida por outros microrganismos. O mesmo pode ter ocorrido com os animais dos grupos controle, GEL 12 e 35 dias, uma vez que a falta da ação da toxina botulínica pode não ter influenciado na microbiota bacteriana e, assim, ter mantido o equilíbrio entre os microrganismos.

Corroborando com a hipótese anteriormente citada, Diaz et al. (2014), afirmaram em sua pesquisa que existem evidências potenciais sobre a sinergia entre *Candida spp.* e estreptococos em modelos experimentais e que as relações fúngico-bacterianas devem ser consideradas como potenciais alvos preventivos e terapêuticos.

Em relação aos testes de sensibilidade, de acordo com os resultados obtidos através dos testes de sensibilidade antifúngica e tomando como referência o CLSI (2008), no grupo BTX-A 12 dias, os valores para inibir crescimento dos isolados de *Candida spp.* por AMB foi de 1 µg/mL, enquanto que para KCT variou de 8 a 16 µg/mL, estando este último numa concentração maior do que o padrão estabelecido pelo CLSI (2008) para a maioria das espécies do gênero *Candida spp.* (MIC para AMB é 0,25 a 2 µg/mL, e para KCT, 0,06 a 0,5 µg/mL). Para o teste com a CPOA, a MIC variou entre 2 e 4 µg/mL, no entanto, o CLSI (2008) não traz referências sobre dose padrão para esta droga. Porém Siu et al. (2013), em seus estudos *in vitro* para comparar a atividade antifúngica de diversos agentes disponíveis, consideraram que para as espécies de *Candida spp.*, a MIC do CPOA ficou entre 0,06 a 0,5 µg/mL. Resultados semelhantes foram obtidos por Gupta e Kohli (2003), com MIC entre 0,03 a 0,06 µg/mL⁻¹.

Já no grupo BTX A 35 dias, os isolados de *Candida spp.* foram considerados sensíveis a anfotericina B, com MIC variando de 1 a 2 µg/mL, resistentes a cetoconazol (MIC de 8 µg/mL), quando comparados aos valores padrões do CSLI (2008). Também foi considerado resistente ao CPOA (MIC de 2 a 4 µg/mL), segundo os trabalhos de Gupta e Kohli (2003) e Siu et al. (2013).

Os valores das concentrações de inibições podem variar conforme a pesquisa realizada, pois, como foi apresentado neste presente estudo, para inibir a maior parte dos isolados de *Candida spp.* com a AMB foi de 1 µg/mL. Já no trabalho de Brito et al. (2007), para a anfotericina B, as MICs para *Candida spp.* foram menores (0,25 a 0,5 µg/mL). Talvez as diferenças se deem devido à ajustes metodológicos ou a resistência de diferentes cepas.

Para a maioria das leveduras, a MIC para ciclopirox olamina encontra-se dentro de um valor padronizado compreendido entre as concentrações 0,9 a 3,9 µg/mL, para microrganismos cultivados em Ágar Sabourand-Dextrose (Abrams et al., 1992). Niewerth et al. (2003), concluíram que a concentração subinibitória ótimas da hidroxipiridona ciclopirox olamina para *Candida spp.* é de 0,6 µg/mL. Pannu et al. (2009), verificaram um MIC para CPOA para *Candida spp.* entre 0,25 e 4 µg/mL. Posteriormente, uma revisão de literatura realizada por Subissi et al. (2010), mostrou que para mais de seis espécies diferentes de *Candida spp.*, a MIC variou de 0,9 a 3,9 µg/mL. Desta forma, pode-se afirmar que o perfil de sensibilidade para o antifúngico PCOA dos fungos gênero *Candida spp.* ainda é controverso.

Em humanos, Demitto et al. (2012), verificaram *in vitro* que a sensibilidade à drogas antifúngicas de *Candida spp.* isoladas de urina e sangue de pacientes de um hospital, verificou que 100% das amostras foram sensíveis a AMB, independente da dose. Em estudo semelhante,

Pedroso et al. (2014), utilizando isolados de *Candida spp.* provenientes de sangue humano, observaram que as espécies deste gênero de fungo foram inibidas a uma concentração que variou de 0,5 até 2 µg/mL.

Nos isolados de *Aspergillus spp.* com 12 dias após a aplicação da BTX-A, foram observadas MICs para AMB com uma variação de 1 a 2 µg/mL, de 8 a 16 µg/mL para KCT e de 2 a 4 µg/mL para CPOA. Os padrões do CSLI (2008) colocam o MIC para o gênero *Aspergillus spp.* para AMB entre 0,5 e 8 µg/mL, e para KCT de 0,5 a 4 µg/mL. Pannu et al. (2009), descreveram um MIC do CPOA para fungos do gênero *Aspergillus spp.* variando entre 0,5 e 2 µg/mL, enquanto Siu et al. (2013), definiram uma concentração que variou de 0,42 a 1 µg/mL. Desta forma, os fungos do gênero *Aspergillus spp.* do grupo BTX-A 12 dias foram considerados sensíveis a AMB, e resistente aos demais.

Para os isolados de *Aspergillus spp.* no 35º dia, os mesmos foram considerados sensíveis a AMB (MIC de 2 µg/mL), resistentes ao KCT (MIC de 4 a 8 µg/mL) e ao CPOA (MIC de 4 µg/mL). Segundo Badiie et al. (2012), em seus trabalhos, para diversas espécies de *Aspergillus spp.* isoladas de humanos, o MIC para anfotericina e cetoconazol variaram entre 0,032 a 32 µg/mL e 0,125 a 16 µg/mL, respectivamente. Já para a hidroxipiridona ciclopirox olamina, Subissi et al. (2010), observou que para três diferentes espécies de *Aspergillus spp.* o MIC ficou entre os valores de 1,9 a 15,6 µg/mL, sendo que a espécie mais resistente foi o *Aspergillus flavus*, com um MIC que variou de 7,8 a 15,6 µg/mL.

CONCLUSÕES

O estudo demonstrou que após a aplicação toxina botulínica tipo A (BTX-A), ocorreu mudança na microbiota fúngica oral, tendo fungos dos gêneros *Candida spp.* e *Aspergillus spp.*, se comportando como oportunistas, possuindo um alto nível de resistência aos agentes antifúngicos testados, o que intensifica a grande importância da micologia médica em paciente acometidos por quadro de hipersalivação, sobretudo aos que fazem uso da BTX-A como forma de tratamento para sialorreia. Os dados descritos no presente trabalho são pioneiro e outras investigações para determinar a ocorrência de processo infeccioso micológico invasivo em cavidade oral e identificação dos isolados em nível de espécie, são necessárias para criar subsídios quando a indicação do uso da BTX-A com esta finalidade de tratamento para hipersalivação, tanto quanto para alertar aos profissionais das possíveis alterações orais.

REFERÊNCIAS

- Abrams, B. B., Hanel, H. and Hoehler, T. (1992). Ciclopirox olamine: a hidroxypyridone antifungal agent. *Clin Dermatol.* 9(4), 471-477. PMID: 1822407
- Allen, C. M. (1992). Diagnosing and Managing Oral Candidiasis. *J. Am. Dent. Assoc.* 123, 77-82. doi: 10.14219/jada.archive.1992.0010
- Almståhl, A., Wikström, M., Stenberg, I., Jakobsson, A. and Fagerberg-Mohlin, B. (2003). Oral microbiota associated with hyposalivation of different origins. *Oral Microbiol Immunol.* 18, 1-8. doi: 10.1034/j.1399-302X.2003.180101.x
- Alrefai, A. H., Aburahma, S. K. and Khader, Y. S. (2009). Treatment of sialorrhea in children with Cerebral Palsy: A double-blind placebo controlled trial. *Clin Neurol Neurosurg.* 111, 79-82. doi: 10.1016/j.clineuro.2008.09.001
- Alter, K. E. (2010). High-Frequency Ultrasound Guidance for Neurotoxin Injections. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 21, 607-630. doi: 10.1016/j.pmr.2010.05.001
- Araújo, F. R. G., Castro, C. M. M. B., Severo, M. S., Diniz, M. F. A., Viana, M. T. and Evêncio, L. B. (2009). Effect of *Mercurius solubilis* on the bacteriological response in the alveolitis process in rats. *Homeopathy*, 98, 160-164. doi: 10.1016/j.homp.2009.05.005
- Badiee, P., Alborzi, A., Moeini, M., Haddadi, P., Farshad, S., Japoni, A. and Ziyaeyan, M. (2012). Antifungal susceptibility of the aspergillus species by Etest and CLSI reference methods. *Arch Iran Med.* 15(7), 429-432. doi: 012157/AIM.0011
- Blanco, J. L. and Garcia, M. E. (2000). Presente y futuro del diagnóstico inmunológico de las micosis animales. *Rev Iberoam Micol* 17, S23-S28.
- Borges, F. M., de Paula, T. O., da Silva, V. L. and Diniz, C. G. (2014). O papel da microbiota na modulação da homeostase dos hospedeiros: correlação entre micobioma intestinal e obesidade. *HU Revista.* 40, 109-118.
- Breheret, R., Bizon, A., Jeufroy, C. and Laccourreye, L. (2011). Ultrasound-guided botulinum toxin injections for treatment of drooling. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 128(5), 224-229. doi: 10.1016/j.anorl.2010.12.010
- Brito, E. H. S., Fontenelle, R. O. S., Brilhante, R. S. N., Cordeiro, R. A., Soares Júnior, F. A., Monteiro, A. J., Sidrim, J. J. C. and Rocha, M. F. G. (2007). Phenotypic characterization and in vitro antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. *Vet J.* 174, 147-153. doi: 10.1016/j.tvjl.2006.05.021
- Brown, M. R., Thompson, C. A. and Mohamed, F. M. (2005). Systemic candidiasis in an apparently immunocompetent dog. *J Vet Diagn Invest.* 17(3), 272-276. doi: 10.1177/104063870501700312
- Budtz-Jørgensen, E. (1990). Etiology, pathogenesis, therapy and prophylaxis of oral yeast infections. *Acta Odontol. Scand.* 48, 61-69. doi: 10.3109/00016359009012735

Carranza, J. M. (1949). *Técnicas e métodos elementares para el estudio de hongos sitopásitos*. 2ª ed. Universidad Nacional de La Plata, Bolívia.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2008). *M38-A2. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. Approved Standard*. 2nd Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, 28(16), Wayne, PA, U.S.A.

Dalmau, L. M. (1929). Remarques sur la technique mycologique. Caractères macroscopiques des cultures de champignons. *Ann Parasitol Hum Comp*. 7, 536-541. doi:

Demitto, F. O., Amaral, R. C., Biasi, R. P., Guilhermetti, E., Svidzinski, T. I. E. and Baeza, L. C. (2012). Antifungal susceptibility of *Candida* spp. in vitro among patients from Regional University Hospital of Maringá-PR. *J Bras Patol Med Lab*. 48(5), 315-321. doi: 10.1590/S1676-24442012000500003

Diaz, P. I., Strausbaugh, L. D. and Dongari-Bagtzoglou, A. (2014). Fungal-bacterial interactions and their relevance to oral health: linking the clinic and the bench. *Front Cell Infect Microbiol.*, 29(4). doi: 10.3389/fcimb.2014.00101

Ellies, M., Laskawi, R., Götz, W., Arglebe, C. and Tormählen, G. (1999). Immunohistochemical and morphometric investigations of the influence of botulinum toxin on the submandibular gland of the rat. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 256(3), 148-152. doi: 10.1007/s004050050129

Findley, K., Oh, J., Yang, J., Conlan, S., Deming, C., Meyer, J. A., Schoenfeld, D., Nomicos, E., Park, M., Kong, H. H. and Segre, J. A. (2013). Human Skin Fungal Diversity. *Nature*. 498(7454), 367-370. doi:10.1038/nature12171

Freire-Garabal, M., Núñez, M. J., Balboa, J., Rodríguez-Cobos, A., López-Paz, J. M., Rey-Méndez, M., Suárez-Quintanilla, J. A., Millán, J. C. and Mayán, J. M. (1999). Effects of Amphetamine on Development of Oral Candidiasis in Rats. *Clin Diagn Lab Immunol*. 6(4), 530-533. PMID: PMC95721

Gabal, M. A. (1988). Preliminary studies on the mechanism of infection and characterization of *Malassezia pachydermatis* in association with canine otitis externa. *Mycopathologia*. 104, 93-98. doi: 10.1007/BF00436933

Gama, P. D. (2010). Novos Horizontes Terapêuticos da Toxina Botulínica. *Neurotrends*, p. 43-50, 2010. Available in <<http://www.institutocerebro.com/?p=55>>. [Access in 21 Ago. 2012].

Gupta, A. K. and Kohli, Y. (2003). *In vitro* susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and in vitro evaluation of combination antifungal activity. *British J Dermatol*. 149(2), 296-305. doi: 10.1046/j.1365-2133.2003.05418.x

Hoog, G. S., Guarro, J., Gené, J. and Figueras, M. J. (2000). *Atlas of Clinical Fungi*. 2nd ed. Spain: The Netherlands Centraalbureau voor Schimmiscultures Baarn (CBS).

Jorge, A. O. C., Totti, M. A. G., De Almeida, O. P. and Scully, C. (1993). Effect of sialoadenectomy on the carriage of *Candida albicans* in the mouths of rats. *J. Oral Pathol. Med*. 22(3), 138-140. doi: 10.1111/j.1600-0714.1993.tb01045.x

- Klich, M. A. (2002). *A laboratory guide to the common Aspergillus species and their teleomorphs*. CSIRO - Division of Food Processing, Australia.
- Lacaz, C. S., Porto, E., Martins, J. E. C., Vaccari, E. V. and Melo, N. T. (2002). *Tratado de Micologia Médica*. 9ª ed. São Paulo: Savier.
- Leung, M. H. Y., Chan, K. C. K. and Lee, P. K. H. (2016). Skin fungal community and its correlation with bacterial community of urban Chinese individuals. *Microbiome*. 4, 46. doi: 10.1186/s40168-016-0192-z
- Meitner, S. W., Bowen, W. H. and Haidaris, C. G. (1990). Oral and esophageal *Candida albicans* infection in hyposalivatory rats. *Infect. Immun.* 58(7), 2228-2236. PMID: PMC258801
- Melfi, R. C. and Alley, K. E. (2010). *Embriologia e Histologia Oral de Permar: Manual para Estudantes de Odontologia*. 10ª ed. Santos: São Paulo.
- Meurman, J. H., Siikala, E., Richardson, M. D. and Rautemaa, R. (2007). Non-*Candida albicans* *Candida yeasts of the oral cavity*. In: MENDEZ-VILLAS, A. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Manchester: Formatex Publishing.
- Møller, E., Karlsborg, M., Bardow, A., Lykkeaa, J., Nissen, F. H. and Bakke, M. (2011). Treatment of severe drooling with botulinum toxin in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease: Efficacy and possible mechanisms. *Acta Odontol Scand.* 69(3), 151-157. doi: 10.3109/00016357.2010.545035
- Niewerth, M., Kunze, D., Seibold, M., Schaller, M., Korting, M. C., Hube and B. (2003). Ciclopirox Olamine Treatment Affects the Expression Pattern of *Candida albicans* Genes Encoding Virulence Factors, Iron Metabolism Proteins, and Drug Resistance Factors. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(6), 1805-1817. doi: 10.1128/AAC.47.6.1805-1817.2003
- Nobre, M. O., Meireles, M. C. A., Gaspar, L. F., Pereira, D., Schramm, R., Schuch, L. F., Souza, L. L. and Souza, L. (1998). *Malassezia pachydermatis* e outros agentes infecciosos nas otites externas e dermatites em cães. *Cienc. Rural.* 28(3), 447-452. doi: 10.1590/S0103-84781998000300016
- Ondo, W. G., Hunter, C. and Moore, W. (2004). A double-blind placebocontrolled trial of botulinum toxin B for sialorrhea in Parkinson's disease. *Neurology*. 62, 37-40. doi: 10.1212/01.WNL.0000101713.81253.4C
- Pannu, J., McCarthy, A., Martin, A., Hamouda, T., Ciotti, S., Fothergill, A., and Sutcliffe. J. (2009). NB-002, a Novel Nanoemulsion with Broad Antifungal Activity against Dermatophytes, Other Filamentous Fungi, and *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(8), 3273-3279. doi: 10.1128/AAC.00218-09
- Pedroso, R. S., Menezes, R. P., Ferreira, J. C., Penatti, M. P. A., Sá, W. M., Malvino, L. D. S., Candido, R. C. and Moreira, T. A. (2014). Sensibilidade de Isolados de *Candida spp.* a Antifúngicos por Disco-Difusão em Ágar e Microdiluição em Caldo. *Biosci. J.* 30, 304-311.
- Rapper, K. B. and Fennel, D. I. (1977). *The genus Aspergillus*. Publishing Company Malabar, Florida, U.S.A.

Reijula, K. and Tuomi, T. (2003). Mycotoxins of Aspergilli: exposure and health effects. *Front Biosci.*, 1(8), s232-235. PMID: 12700107

Sidrim, J. J. C. and Rocha, M. F. G. (2004). *Micologia Médica a Luz de Autores Contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Siu, W. J. J., Tatsumi, Y., Senda, H., Pillai, R., Nakamura, T., Sone, D. and Fothergill, A. (2013). Comparison of In Vitro Antifungal Activities of Efinaconazole and Currently Available Antifungal Agents against a Variety of Pathogenic Fungi Associated with Onychomycosis. *Antimicrob Agents Chemother.*, 57(4), 1610-1616. doi: 10.1128/AAC.02056-12

Sobel, J. D. (2006). The emergence of non-albicans *Candida* species as causes of invasive candidiasis and candidemia. *Curr Infect Dis Rep.* 8(6), 427-433. PMID: 17064635

Sreebny, L. M. (2000). Saliva in health and disease: an appraisal and update. *Int Dent J.* 5(3), 140-161. doi: 10.1111/j.1875-595X.2000.tb00554.x

Subissi, A., Monti, D., Togni, G. and Mailland, F. (2010). Ciclopirox: recent nonclinical and clinical data relevant to its use as a topical antimycotic agent. *Drugs.* 70(16), 2133-2152. doi: 10.2165/11538110-000000000-00000

Totti, M. A. G., Jorge, A. O. C., Almeirda, O. P. and Santos, E. B. (1996). Recuperação de *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermonddi* e *C. Krusei* na cavidade bucal de ratos normal e sialoadenectomizados. *Rev. Odontol. UNESP.* 25, 119-124.

Turk-Gonzales, M. and Odderson, I. R. (2005). Quantitative Reduction of Saliva Production with Botulinum Toxin Type B Injection into the Salivary Glands. *Neurorehabilitation & Neural Repair.* 19, 58-61. doi: 10.1177/1545968304273201

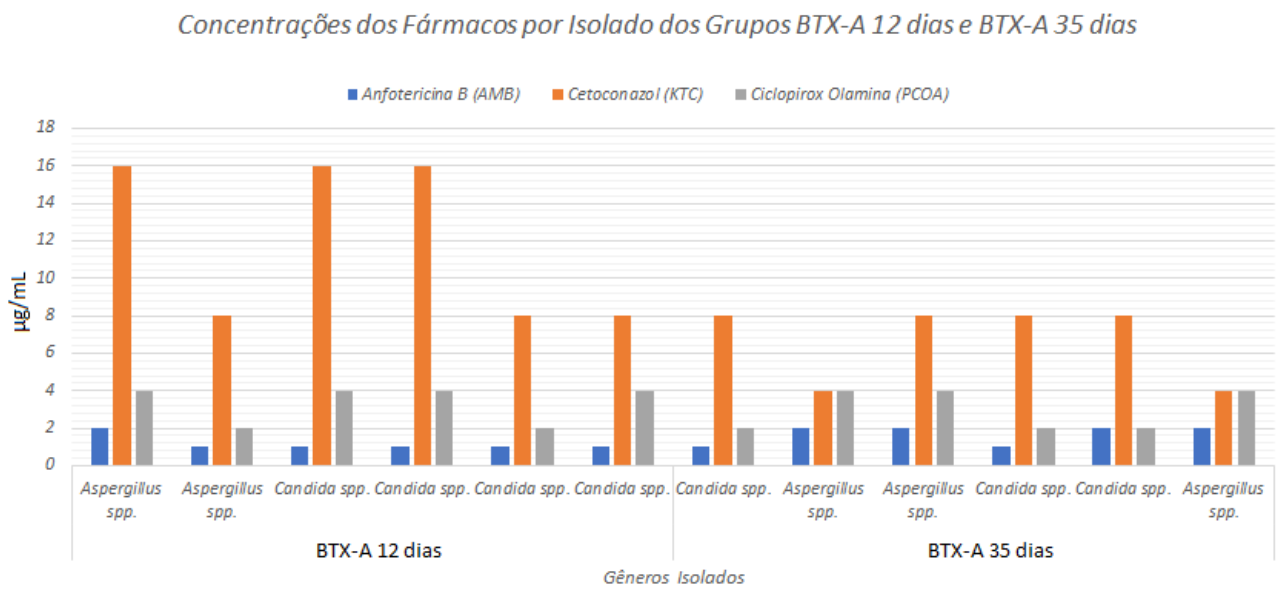
TABELA 1 | Perfil de resistência dos isolados *Candida spp.* e *Aspergillus spp.* provenientes da cavidade oral de ratos com glândula submandibular tratada com BTX-A à Concentração Inibitória Mínima (MIC) por Anfotericina B (AMB), Cetoconazol (KTC) e Ciclopirox Olamina (CPOA).

Grupos de Estudo	Identificação dos Isolados (Quanto ao gênero)	Sensibilidade à Anfotericina B	Sensibilidade à Cetoconazol	Sensibilidade à Ciclopirox Olamina
		Doses Utilizadas dos Antifúngicos (µg/mL)		
Controle	Não encontrado	-----	-----	-----
BTX-A 12 dias	Animal 1: <i>Aspergillus spp.</i>	2 µg/mL	16 µg/mL	4 µg/mL
	Animal 2: <i>Aspergillus spp.</i>	1 µg/mL	8 µg/mL	2 µg/mL
	Animal 3: <i>Candida spp.</i>	1 µg/mL	16 µg/mL	4 µg/mL
	Animal 4: <i>Candida spp.</i>	1 µg/mL	16 µg/mL	4 µg/mL
	Animal 5: <i>Candida spp.</i>	1 µg/mL	8 µg/mL	2 µg/mL
	Animal 6: <i>Candida spp.</i>	1 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL
BTX-A 35 dias	Animal 1: <i>Candida spp.</i>	1 µg/mL	8 µg/mL	2 µg/mL
	Animal 2: <i>Aspergillus spp.</i>	2 µg/mL	4 µg/mL	4 µg/mL
	Animal 3: <i>Aspergillus spp.</i>	2 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL
	Animal 4: <i>Candida spp.</i>	1 µg/mL	8 µg/mL	2 µg/mL
	Animal 5: <i>Candida spp.</i>	2 µg/mL	8 µg/mL	2 µg/mL
	Animal 6: <i>Aspergillus spp.</i>	2 µg/mL	4 µg/mL	4 µg/mL
GEL 12 dias	Não encontrado	-----	-----	-----
GEL 35 dias	Não encontrado	-----	-----	-----

Legenda da Figura

Figura 1 | Gráfico de barras mostrando as diferentes concentrações das drogas utilizadas para o teste de sensibilidade (anfotericina B em azul; cetoconazol em laranja; e ciclopirox olamina em cinza) por isolados, segundo os grupos BTX-A 12 e 35 dias. Observar que os isolados obtidos 35 dias após a aplicação da BTX-A foram mais sensíveis quando comparados com os isolados coletados 12 dias após a aplicação da droga.

Figura 01.JPGE



Apêndice III – Artigo 3

Aplicação local de toxina botulínica tipo A no complexo submandibular-sublingual de ratas: Análise bioquímica da saliva total

*Local Application of botulinum toxin type A in the submandibular-sublingual complex of rats:
Biochemical analysis of total saliva*

Jaciel Benedito de Oliveira^{a*}; Liriane Baratella-Evêncio^b; Leonardo Prezzi Dornelles^c;
Luciana Silva Regueira^d; Rair de Meneses Quirino^e; Joaquim Evêncio Neto^f

^a Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal (PPGBA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e Departamento de Anatomia do Centro de Biociências (CB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil;

^b Departamento de Histologia e Embriologia, CB, UFPE;

^c Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, CB, UFPE;

^d Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde (CCS), UFPE;

^e Curso de Graduação em Medicina, CCS, UFPE;

^f Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFO) e do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal (PPGBA), UFRPE, Recife, Pernambuco, Brasil.

***Autor para Correspondência:**

Prof. Jaciel Benedito de Oliveira, Departamento de Anatomia, Centro de Biociências (CB), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. CEP: 50670-901. Fone: +55 81 21268555 / E-mail: jacieloliveira@gmail.com

Resumo

Objetivo: Verificar possíveis alterações bioquímicas nos constituintes proteicos e eletrolíticos salivares de ratos wistar com glândulas submandibulares tratadas com aplicação de toxina botulínica tipo A (BTX-A).

Materiais e Métodos: 32 animais adultos e fêmeas, distribuídas em cinco grupos: Controle, sem tratamento (n=7); grupos BTX-A 12 (n=7) e BTX-A 35 (n=6), que receberam a aplicação de 2,5U de toxina botulínica tipo A em glândulas submandibulares direitas; e grupos GEL 12 (n=6) e GEL 35 (n=6), cujas glândulas direitas receberam injeção de 0,125 mg gelatina de origem bovina. Os grupos BTX-A 12 e GEL 12 foram analisados aos 12 dias após o tratamento, enquanto os grupos BTX-A 35 e GEL 35, foram analisados aos 35 dias após aplicação. A atividade proteolítica foi determinada utilizando azocaseína como substrato, e a detecção da atividade de α -Amilase utilizou amido como substrato, após incubação em diferentes valores de temperatura e pH. A concentração de proteínas foi realizada através de uma solução alcalina de cobre, solução de carbonato de sódio 2% em hidróxido de sódio 1% e adição do reagente de Folin-Ciocalteus. O ionograma foi realizado por um analisador automático para testes bioquímicos.

Resultados: A atividade proteolítica total da saliva aumentou no 12º dia após o tratamento, diminuindo no 35º dia, mas sem diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Observou-se aumento da concentração de α -amilase nos grupos tratados com BTX-A e gelatina, diferindo do grupo controle ($p = 0,000$). Ocorreu uma discreta diminuição da concentração proteica do grupo controle ($1,94 \pm 0,27$ mg/mL) quando comparado com o grupo BTX-A 12 dias ($1,74 \pm 0,15$ mg/mL), voltando a aumentar consideravelmente na análise com 35 dias ($2,39 \pm 0,36$ mg/mL). Houve diminuição de K^+ e Cl^- , porém aumento da concentração de Na^+ nos grupos BTX-A.

Conclusões: Desta forma, concluímos que a BTX-A não alterou a atividade proteolítica total da saliva, mas aumentou a secreção de amilase salivar. A dosagem proteica da saliva total tende a diminuir pouco tempo depois da aplicação da BTX-A, e aumenta consideravelmente com o passar do efeito da droga. São necessárias mais investigações sobre a mudança eletrolítica da saliva sob efeito da BTX-A e suas implicações para a saúde oral.

Palavras-chaves: Toxina botulínica tipo A; Sialorreia; Eletrólitos; Excreção salivar; Proteínas salivares

Abstract

Objective: Check for possible biochemical changes in the protein and electrolytes salivary constituents of wistar rats with submandibular glands treated with application of botulinum toxin type A (BTX-A).

Materials and methods: Thirty-two adult and female animals were used, distributed in five groups: Control, without treatment (n = 7); BTX-A 12 (n = 7) and BTX-A 35 (n = 6) groups, who received the application of 2.5U botulinum toxin type A in right submandibular glands; and GEL 12 (n = 6) and GEL 35 (n = 6) groups, whose right glands were injected with 0.125 mg gelatin of bovine origin. BTX-A 12 and GEL 12 groups were analyzed at 12 days post-treatment, while the BTX-A 35 and GEL 35 groups were analyzed at 35 days after application. Proteolytic activity was determined using azocasein as substrate, and the detection of α -Amylase activity utilized starch as substrate after incubation at different temperature and pH values. Protein concentration was achieved by alkaline copper solution, 2% sodium carbonate solution in 1% sodium hydroxide and addition of the Folin-Ciocalteus reagent. The ionogram was performed by an automatic analyzer for biochemical tests. The total proteolytic activity of saliva increased on the 12th day after treatment, decreasing on the 35th day, but without significant statistical difference ($p < 0.05$).

Results: There was a slight decrease in the protein concentration of the control group (1.94 ± 0.27 mg/mL) when compared to the 12-day BTX-A group (1.74 ± 0.15 mg/mL), 35-day analysis (2.39 ± 0.36 mg/mL). There was a decrease in K^+ and Cl^- , but an increase in Na^+ concentration in the BTX-A groups.

Conclusions: Thus, we concluded that BTX-A did not alter the total proteolytic activity of saliva, but increased secretion of salivary amylase. The protein dosage of total saliva tends to decrease shortly after the application of BTX-A, and increases considerably with the passing of the drug effect. More research is needed on the electrolytic shift of saliva under BTX-A and its implications for ora

Keywords: Botulinum toxins type A; Sialorrhea; Electrolytes; Salivary elimination; Salivary proteins and peptides

1. Introdução

A saliva é composta por água, proteínas, glicoproteínas, imunoglobulinas e produtos nitrogenados, como ureia e amônia, além de uma grande variedade de eletrólitos, incluindo sódio, potássio, cálcio, magnésio, bicarbonato e fosfatos. Os componentes salivares, particularmente as proteínas, são multifuncionais, redundantes (realizando funções similares, porém para diferentes amplitudes), e antifuncionais (atuando contra ou a favor do hospedeiro) (Humphrey & Williamson, 2001), tendo um papel fundamental na proteção da cavidade oral e na manutenção da saúde sistêmica, como por exemplo, solubilização dos alimentos; lubrificação das superfícies orais facilitando a percepção do paladar, mastigação, deglutição e fala; proteger os dentes e a mucosa oral; neutralizar ácidos (tamponamento); servir como defesa contra microrganismos e também participam da digestão (Brosky, 2007).

Por conta disso, distúrbios na secreção salivar ou na deglutição, podem acarretar em grande prejuízo a saúde e qualidade de vida do indivíduo, impactos negativos sobre funções psicossociais, educacionais e morfofuncionais (Hassin-Baer, Scheuer, Buchman, Jacobson, & Ben-Zeev, 2005). As alterações mais comuns são a xerostomia (“boca seca”), que é a diminuição ou interrupção do fluxo salivar e/ou volume salivar e o acúmulo de saliva na cavidade oral, conhecido como sialorreia ou hipersalivação (Miranda-Rius, Brunet-Llobet, Lahor-Soler, & Farré, 2015; Zlotnik, Balash, Korczyn, Giladi, & Gurevich, 2015). Devido as consequências da sialorreia, os pacientes necessitam de uma intervenção terapêutica eficiente para o tratamento desta condição clínica.

Estudos clínicos apontam que o uso da toxina botulínica tipo A (BTX-A) em injeções percutâneas intraglandulares nas parótidas e submandibulares é eficaz e leva à diminuição da sialorreia (Çiftç, Akinci, Yurttutan, & Akhan, 2013; Vashishta, Nguyen, Whit, & Gillespie, 2013), mantendo, dentre outros parâmetros, a boa saúde oral (Wu et al., 2011). A BTX-A ganhou popularidade rapidamente, e pode tornar-se o tratamento de escolha para a sialorreia (Lim et al., 2006), pois é capaz de deprimir a atividade secretora das glândulas salivares (Ellies, Mace, Reza-Nouraei, & Sandhu, 2004).

Nas três glândulas salivares maiores, a secreção de proteínas é controlada pelo sistema nervoso autônomo (Turner & Sugiya, 2002). As glândulas submandibulares são inervadas pelo sistema nervoso simpático e parassimpático que agem conjuntamente. A estimulação dos nervos parassimpáticos promove a liberação de um maior volume de saliva, porém com um menor conteúdo de proteína. De maneira diferente, a estimulação dos nervos simpáticos promove a secreção de um volume menor de saliva, mas com um conteúdo proteico mais

elevado (Garrett, Suleiman, Anderson, & Proctor, 1991; Carpenter, Proctor, & Garrett, 2005). Porém, quando ambos os nervos são estimulados, há uma cooperação entre os dois sistemas e há um aumento considerável na quantidade de proteína liberada na saliva (Anderson, Garrett, Zhang, Proctor, & Shori, 1994).

Dessa forma, fica clara a importância da saliva para a saúde oral e sistêmica do indivíduo, e fica o questionamento quanto à segurança da aplicação da toxina botulínica tipo A em relação a qualidade da saliva secretada após o tratamento com esta droga. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a concentração dos principais íons presentes na saliva total, atividade proteolítica total da saliva, detecção de α -amilase salivar, dosagem proteica da saliva total de ratas Wistar tratadas com injeção intraglandular de 2,5 U de BTX-A na glândula submandibular.

2. Materiais e Métodos

2.1. Considerações Ética, Grupos de Estudo e Tratamento

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Biociências (CB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob o parecer de número 23076.023152/2014-14. Foram utilizadas 32 ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*), fêmeas, adultas pesando entre 200-300 g. Os animais tiveram livre acesso a água e comida com uma dieta padrão para roedores do biotério (Presence[®] Nutrição Animal para Ratos, SP, Brasil) e foram mantidos 4 animais por gaiola de gaiolas de polipropileno (49x34x16 cm), em temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Todas as manipulações experimentais foram realizadas entre 7:00 e 10:00 horas.

Os animais foram divididos em cinco grupos: grupo controle com 7 animais, sem quaisquer tratamentos do complexo submandibular-sublingual; grupo BTX-A 12 dias, com 7 animais, cujas glândulas submandibulares dos complexos submandibulares-sublinguais direitos receberam injeção de 2,5 U toxina botulínica tipo A (*Prosigne*[®], Cristália, Itapira, SP, Brasil), reconstituída em 0,1 mL de solução de cloreto de sódio 0,9%, evitando-se o borbulhamento e agitação do diluente sobre a toxina, e analisadas 12 dias após a aplicação; grupo BTX-A 35 dias, com 6 animais, cujas glândulas salivares receberam o mesmo tratamento do grupo BTX-A 12 dias, porém analisadas 35 dias após a aplicação; grupo GEL 12 dias e grupo GEL 35 dias, com 6 animais cada, cujas glândulas receberam injeção de 0,125 mg gelatina de origem bovina (Gelita do Brasil Ltda., SP, Brasil), também diluída em 0,1 mL de cloreto de sódio 0,9%, e

analisadas 12 e 35 dias após a aplicação da gelatina, respectivamente (Ellies, Laskawi, Götz, Arglebe, & Tormählen, 1999).

Para a aplicação da toxina botulínica tipo A e da gelatina de origem bovina nas glândulas submandibulares do complexo, os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (50 mg/kg de peso – Clortamina[®], BioChimico, Itatiaia, RJ, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg de peso – Rompun[®], Bayer S.A., SP, Brasil), na proporção de 1:1 associados na mesma seringa e administrados por via intramuscular. A seguir, foi realizada antisepsia do local com digluconato de clorexidina 2% (FGM do Brasil[®], Joinville, SC, Brasil), tricotomia da região cervical dos animais e aplicação das drogas pelo método palpatório e localização anatômica do complexo submandibular-sublingual. Posteriormente, posicionou-se a agulha no terço médio do complexo, com a finalidade de injetar a droga apenas na glândula submandibular. As aplicações intraglandulares foram em dose única, utilizando-se seringa de insulina de 1 mL/cc ultrafina, com agulha de calibre de 8 mm (5/16") x 0,3 mm (30G) (BD, Curitiba, Paraná, Brasil).

2.2. Colheita de Saliva

Doze e trinta e cinco dias após o tratamento, realizou-se uma nova anestesia segundo descrito anteriormente e prosseguiu-se com a estimulação do fluxo salivar para coleta da saliva, através de Cloridrato de Pilocarpina a 0,5% (Fórmula Manipulada. Pharmapele, Recife, PE, Brasil), na dose de 0,4 mg/Kg de peso corporal, injetada por via intraperitoneal (Benard, Fabian, Rosen, Hoppert, & Hunt, 1956; Asari, Maruyama, & Kusama, 2009). O período entre a injeção da pilocarpina e a primeira gota de saliva foi considerado como fase lag (López-Solís et al., 2001). A saliva foi coletada por um período de 40 minutos em pote coletor universal de 80 mL. Posteriormente 1 mL da saliva secretada foi alíquotada com pipetador automático (Eppendorf do Brasil, SP, Brasil), armazenada em tubos de microcentrífuga de 2 mL (Eppendorf), mantidos em gelo e centrifugadas à 5000 rpm por 5 minutos, para remover possíveis células da mucosa oral. O precipitado foi descartado e o sobrenadante transferido para novos tubos de microcentrífuga de 2 mL e congelados em *freezer* na temperatura de -20°C , até o momento das dosagens.

2.3. Atividade Proteolítica Total

A atividade proteolítica foi determinada utilizando azocaseína como substrato, de acordo com Azeez et al. (2007). Alíquota (100 μL) da amostra (20 μL + 80 μL de água

destilada) foi incubada com 300 μL de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5, contendo azocaseína a 0,6% (p/v). Após adição de 100 μL de Triton X-100 0,1% (v/v), a mistura foi incubada a 37°C por 3 horas. A reação foi interrompida com a adição de 200 μL de ácido tricloroacético (TCA) à 10% (p/v) e a mistura foi incubada a 4°C por 30 minutos; em seguida, realizou-se centrifugação (9.000 rpm por 10 min) e a absorbância a 366 nm do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro GeneQuant 1300 (Exon Biotec, Belo Horizonte, MG, Brasil). Os ensaios-controle diferiram dos ensaios-teste apenas no momento da adição do TCA, a qual foi realizada antes da incubação a 37°C por 3 horas. Atividade proteolítica específica foi calculada através da razão entre a atividade enzimática (U), que corresponde à quantidade de enzima que aumenta em 0,01 a absorbância em relação ao teste controle, e a quantidade de proteínas (mg) utilizada no teste. Os ensaios foram realizados em triplicata e os valores expressos como média \pm DP.

2.4. Dosagem de Proteínas

A estimativa da concentração de proteínas foi realizada de acordo com Lowry et al. (1951), utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina (31,25 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A amostra (0,2 mL) foi incubada por 10 minutos com 1 mL de uma solução alcalina de cobre (1 mL de sulfato de cobre 0,5% [p/v] em citrato de sódio 1% [p/v]) e 50 mL de solução de carbonato de sódio 2% (p/v) em hidróxido de sódio 1% (p/v). Após incubação a 28°C, foi adicionado 0,1 mL do reagente de Folin-Ciocalteus (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), diluído 1:1 com água, e após 30 min, a absorbância a 720 nm foi determinada em espectrofotômetro DR 5000 (Hach Company, Loveland, Colorado, EUA). As dosagens foram realizadas em duplicata e os valores expressos como média \pm DP.

2.5. Detecção de α -Amilase

A detecção da atividade de α -Amilase foi realizada com base no método descrito por Bernfeld (1955), utilizando amido como substrato. Amostras de saliva (100 μL) foram incubadas a 50°C por 10 minutos contendo 400 μL de uma solução de amido 1% em acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5 contendo CaCl_2 0,02 M e NaCl 0,15 M. A reação foi bloqueada pela adição de 500 μL de DNS (ácido dinitrosalicílico). Após, os ensaios foram aquecidos a 100°C em água fervente por 6 minutos e imediatamente resfriados em gelo por 15 minutos. A absorbância a 540 nm foi determinada em espectrofotômetro de microplacas Epoch™, gerenciado pelo

software Gen5 2.06 (Biotek, Winooski, VT, EUA). A quantidade de açúcares redutores liberados foi determinada por uma curva de calibração de glicose na qual $y = 0,0026x + 0,4153$. Uma unidade de atividade de α -Amilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para gerar 1 μmol de glicose por minuto. As reações dos brancos foram realizadas sem o uso de amido ou das amostras. As dosagens foram realizadas em duplicata e os valores expressos como média \pm DP.

2.6. Ionograma da Saliva

Após o descongelamento da saliva armazenadas em tubos de polipropileno (Eppendorfs do Brasil, SP, Brasil), foram obtidas 150 μL de cada amostra, colocadas em cubetas plásticas de 5 mL, pré-diluídas e analisadas automaticamente por um analisador para testes bioquímicos e imunoquímicos, o LabMax 240[®] (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, MG, Brasil) a temperatura de 37°C, pelo método de sensores de íons seletivos (ISE).

O ionograma constou da mensuração dos seguintes eletrólitos: fósforo (PO_4^-), cálcio (Ca^{2+}), cloreto (Cl^-), sódio (Na^+) e potássio (K^+), utilizando os kits Cloretos Liquiform, Fósforo, Cálcio Arsenazo Liquiform, Potássio Enzimático e Sódio Enzimático (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, MG, Brasil). Todas as análises foram realizadas num mesmo período, de maneira a se obter o máximo de padronização em relação as amostras e aos aparelhos, minimizando a variabilidade analítica.

2.7. Análise Estatística

Os dados obtidos dos resultados dos testes bioquímicos salivares foram tabulados em planilha do programa *Microsoft Office Excel 2016* para *Windows 10* (*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 (normalidade) dos dados. Os dados obtidos nos testes de Atividade Proteolítica Total da Saliva, Detecção de α -Amilase Salivar e Dosagem Proteica da Saliva, assim como a dosagem dos íons cloreto e potássio no ionograma, foram considerados paramétricos, e utilizou-se o teste Análise de Variância (ANOVA) com o teste *Post-Hoc de Tukey*. Os dados obtidos das dosagens dos íons cálcio, fósforo e sódio foram considerados não paramétricos e por isto utilizou-se o teste Kruskal Wallis, seguido do *Mann-Whitney U Test*, quando havia diferença estatística significativa. O *software SPSS Statistics Desktop*[®] 22.0 (IBM, International Business Machines Corp., New York, EUA)

foi usado para a realização das análises estatísticas. Todas as conclusões levaram em consideração o nível de significância de 0,05 (5%) (Field, 2009).

3. Resultados

3.1. Atividade Proteolítica Salivar, Detecção de α -Amilase Salivar e Dosagem Proteica da Saliva Total

Para a Atividade Proteolítica Salivar (U/mg), o teste *Post-Hoc de Tukey*, mostrou haver diferenças significativas entre os grupos GEL 12 dias e BTX-A 35 dias ($p = 0,42$), e entre os grupos GEL 12 dias e GEL 35 dias ($p = 0,35$). Nota-se um aumento da atividade proteolítica no 12º dia após o tratamento, seguindo com a diminuição desta atividade enzimática, mas sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$) (Tabela 1).

As diferenças entre os grupos da Detecção de α -Amilase Salivar foram bastante significativas (Tabela 2), sendo observado um aumento significativo da atividade da enzima, estipulado pela concentração da mesma em mmol/min, nos grupos tratados com BTX-A 12 e 35 dias e GEL 12 e 35 dias, sendo o valor de $p = 0,000$ quando comparado com o grupo controle.

Já na Dosagem Proteica da Saliva Total (mg/mL), apenas o grupo BTX-A 12 dias diferiu significativamente dos grupos BTX-A 35 dias ($p = 0,47$) e GEL 35 dias ($p = 0,49$). Apesar do resultado estatístico não mostrar uma diferença significativa, observa-se uma discreta diminuição da concentração proteica da saliva total, quando comparado a saliva do grupo controle ($1,94 \pm 0,27$ mg/mL) com a saliva 12 dias ($1,74 \pm 0,15$ mg/mL) após a aplicação da toxina botulínica. A concentração volta a aumentar consideravelmente na análise com 35 dias ($2,39 \pm 0,36$ mg/mL) após o tratamento. Este padrão praticamente se repetiu com os dois grupos tratados com a gelatina bovina (Tabela 1).

3.2. Ionograma da Saliva

A análise dos dados da medição do nível de eletrólitos dos íons cálcio (Ca^{2+}), cloreto (Cl^-), fosfato (HPO_4^{2-}), potássio (K^+) e sódio (Na^+), mostrou pequenas variações individuais quando cada parâmetro foi avaliado (Tabela 3).

Tabela 1

Diferença entre as Médias dos Diversos Grupos de Estudo da Atividade Proteolítica, Detecção de α -Amilase Salivar e Dosagem Proteica da Saliva Total.

Análises	Controle	BTX-A 12 dias	BTX-A 35 dias	GEL 12 dias	GEL 35 dias	p-valor ¹
Atividade Proteolítica (U/mg)	115,09 ± 16,22	142,93 ± 27,59	110,26 ± 13,82	150,80 ± 27,86	109,22 ± 27,44	0,007
Detecção de α -Amilase Salivar (mmol/min)	23,01 ± 1,61	58,17 ± 3,30	58,60 ± 1,90	53,45 ± 4,07	57,18 ± 1,69	0,000
Dosagem Proteica (mg/mL)	1,94 ± 0,27	1,74 ± 0,15	2,39 ± 0,36	1,79 ± 0,54	2,39 ± 0,57	0,011

¹p-valor do teste da ANOVA (se p-valor < 0,05 as médias entre os grupos diferem significativamente).

Os valores são médias ± DP obtidos a partir do resultado de cada animal dos diferentes grupos.

Tabela 2

Grupos com diferenças significativas na Detecção de α -Amilase (mmol/min).

Grupos	Média (mmol/min)	Grupos	Médias (mmol/min)	p-valor ¹
Controle	23,01 ± 1,61	BTX-A 12 dias	58,17 ± 3,30	0,000
		BTX-A 35 dias	58,60 ± 1,90	
		GEL 12 dias	53,45 ± 4,07	
		GEL 35 dias	57,18 ± 1,69	
BTX-A 12 dias	58,17 ± 3,30	GEL 12 dias	53,45 ± 4,07	0,030
BTX-A 35 dias	58,60 ± 1,90	GEL 12 dias	53,45 ± 4,07	0,021

¹p-valor do teste *Post-Hoc de Tukey* (se p-valor < 0,05 as médias entre os grupos diferem significativamente).

Tabela 3

Médias, Desvios Padrões e Análise Estatística dos Parâmetros avaliados no Ionograma da Saliva Total nos Grupos de Estudo.

Exames e Unidades de Medidas	Grupos de Estudo					<i>p</i> -valor ^{1,2}
	Controle n = 7	BTX-A 12 dias n = 7	BTX-A 35 dias n = 6	GEL 12 dias n = 6	GEL 35 dias n = 6	
	Médias ± Desvios Padrões (DP) das médias					
Íon Cálcio mg/dL	2,13 ± 1,06	0,31 ± 0,09	0,62 ± 0,12	1,96 ± 1,23	0,86 ± 0,11	0,095 ²
Íon Cloreto mmol/L	58,94 ± 1,52	53,56 ± 2,06	61,12 ± 2,34	64,84 ± 2,19	64,76 ± 1,24	0,001 ¹
Íon Fosfato mg/dL	3,11 ± 0,24	2,29 ± 0,23	2,81 ± 0,22	2,61 ± 0,22	2,40 ± 0,16	0,077 ²
Íon Potássio mmol/L	23,16 ± 0,12	22,52 ± 0,12	22,78 ± 0,23	23,51 ± 0,19	23,68 ± 0,13	0,000 ¹
Íon Sódio mmol/L	32,29 ± 1,50	35,55 ± 1,61	38,70 ± 1,15	31,21 ± 1,63	30,11 ± 0,92	0,006 ²

¹p-valor do teste da ANOVA (se p-valor < 0,05 as médias entre os grupos diferem significativamente).

²p-valor do teste Kruskal Wallis (se p-valor < 0,05 as médias entre os grupos diferem significativamente).

Na dosagem de Cl⁻, o teste *Post-Hoc de Tukey* revelou diferenças significativas entre os grupos BTX-A 12 e GEL 12 dias (p = 0,002), e também BTXA-12 e GEL 35 dias (p = 0,002), sendo que os dois grupos tratados com gelatina bovina, tiveram maiores concentrações de íons cloreto.

As diferenças foram mais frequentes na concentração de K⁺. O grupo controle diferiu apenas do grupo BTX-A 12 dias (p = 0,042). Porém a concentração de íons potássio no grupo BTX-A 12 dias, além de ser significativamente menor em relação ao grupo controle, também foi menor do que o grupo GEL 12 (p = 0,001) e GEL 35 dias (p = 0,000). O mesmo ocorreu entre o grupo BTX-A 35 com os grupos GEL 12 (p = 0,030) e GEL 35 dias (p = 0,005).

Já o *Mann-Whitney U Test*, mostrou que o grupo BTX-A 35 dias teve uma concentração de Na⁺ significativamente maior que grupos controle (p = 0,004), GEL 12 (p = 0,025) e GEL 35 dias (p = 0,004). Além disso, também houve diferença entre os grupos BTX-A 12 e GEL 35 dias (p = 0,015).

4. Discussão

Nossos resultados demonstram uma diminuição da secreção de proteínas na saliva 12 dias após a aplicação da BTX-A, com aumento significativo aos 35 dias. Pelos dados coletados na presente pesquisa, pode-se supor que a inibição da secreção da saliva pela injeção intraglandular da BTX-A, pode causar uma leve diminuição da concentração proteica 12 dias após o tratamento, mas que quando os ácinos começam a se recuperar, há uma maior liberação de proteínas, quando comparado com o grupo controle. Isso sugere que o bloqueio sináptico na junção neuroglandular, promove acúmulo das proteínas sintetizadas no interior da célula acinar, ou até mesmo proteólise, e quando do seu retorno ao estímulo nervoso, a mesma libera estas proteínas acumuladas em maior quantidade, ou volta a sintetizá-la intensamente. É possível que o bloqueio farmacológico tenha interferido nesta produção. Estes dados são semelhantes com os obtidos por Osailan et al. (2006), após ligadura intraoral do ducto excretor da glândula submandibular de ratos, mas sem interrupção do fornecimento nervoso parassimpático, observaram perdas substanciais de proteínas secretoras. Estas perdas eram maiores nos grupos que também tinham a inervação parassimpática bloqueada.

Estima-se que mais de 2000 peptídeos estão presentes na saliva, dos quais em torno de 400 a 600 espécies de peptídeos provêm diretamente das glândulas salivares (Amado, Calheiros-Lobo, Domingues, Duarte, & Vitorino, 2010). De acordo com Amado et al. (2006), a identificação de proteínas salivares, permitem fazer comparações em diferentes condições glandulares correlacionando com distúrbios morfofisiológicos e bioquímicos.

O aumento da concentração de proteínas no grupo BTX-A 35 dias, embora não significativo em relação ao grupo controle, pode indicar um aumento da secreção de conteúdo mucinógeno na saliva (mistura de diversas mucossubstâncias ricas em glicoproteínas denominadas mucinas, conjugadas à carboidratos complexos), deixando-a mais viscosa e com menor teor de água. Estudos anteriores com crianças demonstraram que após a injeção intraglandular de BTX-A, a saliva ficou mais espessa e houve um aumento na viscosidade salivar a partir da segunda semana após a injeção, o que pode indicar um aumento na secreção de mucina na saliva, mesmo não havendo aumento significativo da concentração total de proteínas (Zussman, Yarin, & Nagler, 2007; Erasmus et al., 2010).

Para Abe & Nitta (1984), a concentração de proteína total na saliva varia de acordo com o fluxo salivar, ritmo circadiano, extensão do estímulo, dentre outros fatores, e, no ser humano, a proporção das diferentes proteínas varia consideravelmente de uma pessoa para outra. Anderson et al. (1995), afirmam que a estimulação nervosa parassimpática causa um fluxo

copioso de saliva com baixo teor de proteína, enquanto que a estimulação simpática causa um grande aumento na atividade de proteinases, sendo esta última atribuível à liberação exocitótica de grânulos secretores. Um ponto importante foi levantado por Amado et al. (2006), ao afirmar que elevados teores de mucina, detritos, bactérias e a atividade proteolítica da saliva, são limitantes na identificação e dosagem de proteínas salivares.

Corroborando com os resultados desta pesquisa, Watson et al. (1989), utilizando atropina sistêmica para inibir a salivação em ratos, com posterior indução por pilocarpina, verificaram diminuição da concentração de proteínas da saliva secretada pela glândula parótida ($p < 0,05$) e com aumento dos escores para a doença cárie ($p < 0,05$), nos animais alimentados com uma dieta cariogênica. Møller et al. (2015) e Petracca et al. (2015), verificaram que a elevação da concentração das proteínas totais na saliva pode dever-se a algum mecanismo compensatório sobre a ação do receptor β -adrenérgicos (ação simpática), podendo assim, aumentar a viscosidade da mesma.

As proporções relativas dessas proteínas podem variar entre os indivíduos analisados. Mais recentemente, Neyraud et al. (2006), estudando a proteômica salivar de glândulas parótidas humanas, descreveram diferenças no conteúdo proteico da saliva estimulada por diferentes sabores. Além disso, uma vez cessada a estimulação parassimpática, apenas a estimulação simpática irá produzir uma secreção menos fluida e altera o conteúdo e a composição das proteínas (Garrett, Suleiman, Anderson, & Proctor, 1991; Mittal, Bansal, Garg, Atreja, & Bansal, 2011).

Segundo Proctor e Carpenter (1998), dependendo do indivíduo, pode ocorrer variações significativas na concentração de diferentes proteínas, mas parece haver uma compensação funcional de uma proteína por outra. Além disso, para Carpenter (2013), existem diferenças entre as proteínas que cada glândula salivar sintetiza, resultando em uma enorme variedade de proteínas não só entre os indivíduos, mas também dentro do mesmo indivíduo em diferentes momentos do dia (devido à contribuição de glândulas diferentes). Alterman et al. (2012), concluíram em seus estudos que sob estresse luminoso, alterações sobre secreção de saliva pela glândula submandibular em ratos podem ocorrer. A mudança da composição salivar dependente de estímulos diversos. Na desnervação cirúrgica parassimpática da glândula parótida de ovelhas, os autores Edwards & Titchen (2002), observaram que a secreção salivar espontânea foi significativamente menor nas glândulas desnervadas, porém com mais proteínas.

Shan et al. (2009), concluíram não haver aumento da concentração de proteínas salivares após a aplicação da BTX-A. Porém, na presente pesquisa, foi observado que após o tratamento

com BTX-A e com gelatina bovina, a dosagem proteica da saliva diminuiu no 12º dia, aumentando significativamente no 35º dia após o tratamento. Sendo assim, pode-se sugerir a medida que a droga foi perdendo sua potência, as células acinares, talvez mais sensíveis por conta da falta de estímulo da acetilcolina, passou a secretar maior quantidade de proteínas. Uma explicação semelhante pode ser dada aos grupos tratados com gelatina bovina, não por pela inibição direta do estímulo colinérgico neuronal, mas por uma possível inflamação tecidual.

É importante ter em mente que a aplicação da BTX-A e da gelatina de origem bovina, causa um trauma no tecido que foi perfurado pela agulha da injeção, somado ao fato de introduzir uma substância estranha ao organismo, podendo, ambos os eventos, levarem a um processo inflamatório no estroma glandular. Alguns estudos, como os de Carpenter et al. (2007) e Yu (1986), sugerem que a presença de células inflamatórias reduz 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.

Em relação a atividade proteolítica, sua diminuição nas amostras pode ser explicada pela presença de inibidores de proteases secretada na saliva de ratos, como a cistatina S ou inibidor de cisteino-proteinase, bem como a presença de inibidores de serino, metalo e aspártico proteases (Chaparro, Yu, & Shaw, 1998). Pouco existe na literatura relatos sobre a atividade proteolítica da saliva, e menos ainda quando a mesma está sob efeito da BTX-A.

Na presente pesquisa, pode-se supor que a aplicação da BTX-A promoveria uma atrofia acinar, fazendo com que os mesmos não produzissem e/ou secretassem proteínas. Mas não se pode esquecer que a análise realizada no presente estudo, foi em relação a saliva total, e que as glândulas parótidas estavam livres da influência da toxina, e que na estimulação com pilocarpina, o fluxo secretório da mesma, supera o fluxo do complexo submandibular-sublingual (saliva estimulada). Segundo Proctor et al. (2007), poucos estudos coletam uma secreção submandibular ou sublingual verdadeiramente pura por causa das dificuldades anatômicas encontradas neste complexo.

Em relação a concentração de amilase salivar, Shan et al. (2009), estudando a secreção salivar de glândulas submandibulares de coelhos tratados com injeção intraglandular de BTX-A, concluíram que as concentrações de amilase não foram alteradas após o tratamento. Porém, em outra pesquisa realizada posteriormente, no qual Shan et al. (2013), analisaram a saliva da secreção basal e estimulada separadamente, descreveram que na secreção basal, após 1 e 4 semanas da aplicação, a concentração da amilase aumentou em relação aos animais do grupo controle. Na saliva estimulada por alimentos, esta concentração não se alterou em relação ao

observado grupo controle. Porém estes autores utilizam apenas a saliva excretadas pela glândula submandibular. O estímulo salivar advindo de alimeto provoca maior secreção de saliva pelas glândulas parótidas, sendo esta saliva rica de amilase.

Diferente do descrito por Shan et al. (2013), a salivação no presente estudo foi estimulada através do uso de cloridrato de pilocarpina a 0,5%, e foi observado um aumento da concentração de amilase nas ratas tratadas com BTX-A em relação ao grupo controle. Møller et al. (2011), também percebeu um aumento de amilase na saliva de pacientes após a injeção de toxina botulínica no tratamento da sialorreia. Esse mesmo autor sugere que o aumento da atividade da amilase, bem como o aumento da concentração de proteínas, se deve ao baixo fluxo salivar apresentado em pacientes tratados com toxina botulínica.

Sobre a dosagens dos eletrólitos dos íons presentes na saliva, ou ionograma, é importante estabelecer um padrão de secreção eletrolítica em pacientes que fazem uso de BTX-A para tratamento da sialorreia, pois, segundo Sanioto et al. (2013), alterações nestes íons, pode levar à diminuição do efeito-tampão, que a saliva realiza quando em quantidades normais, leva a um pH ótimo para a proliferação de microrganismos causadores de doenças oportunistas. Outra importância se encontra no fato de que, conforme relatado por Hay, Schluckebier, & Moreno (1986), os eletrólitos presentes na saliva, especialmente o Ca^{2+} , são influenciados por componentes proteicos salivares.

Shan et al. (2009), relataram não haver alterações nas concentrações dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- na saliva após injeção de BTX-A. Porém, mais tarde, Shan et al. (2013), verificaram que na salivação basal, as concentrações dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- não foram alteradas após o tratamento, mas que na salivação estimulada, a concentração do Na^+ aumentou no grupo tratado, quando comparado com o grupo controle, e as demais não se alteraram. Já os resultados do presente estudo, realizado com a saliva total, mostram que houve aumento do Na^+ no BTX-A em relação ao grupo controle. Porém, estes autores (SHAN et al., 2013), analisaram apenas a saliva colhida por meio de filtro de papel diretamente do ducto excretor da glândula submandibular de coelhos.

De acordo com Møller et al. (2015), em um estudo clínico com pacientes que utilizaram BTX-B a longo prazo, notaram que com a diminuição do fluxo salivar, aumenta a concentração de Na^+ , Cl^- e a proteína total na saliva. Almståhl e Wikstrom (2003), em um trabalho que avaliou os eletrólitos de saliva total estimulada em indivíduos com hipossalivação de etiologia diversas, concluíram que as concentrações dos diferentes eletrólitos (bicarbonato, potássio, cálcio e sódio) estão mais relacionadas com a causa da hipossalivação do que com a taxa da

secreção salivar. Paciente em tratamento com neurolépticos, a concentração de PO_4^{3-} foi maior. Em pacientes que passaram por radioterapia na região de cabeça e pescoço, secretaram maior quantidade de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} . Os portadores da Síndrome de Sjögren tiveram aumento do Na^+ . Todos os grupos apresentaram uma diminuição do íon HCO_3^- .

Outro fator importante que deve ser considerado quando se trabalha com saliva, é a condição das funções renais. Segundo Westbrook (1978) e De Rossi e Glick (1996), por exemplo, em doença renal, normalmente, não há excreção de fosfatos. Quando fosfatos são retidos, estimulam as glândulas paratireoides a secretar paratormônio (PTH), causando o hiperparatireoidismo secundário compensatório, que eleva a calcemia. O aumento da concentração de íons no soro sanguíneo pode influenciar na produção de outras secreções corporais. Daí a importância de correlacionar um tratamento local, com toda a condição sistêmica do indivíduo.

5. Conclusões

Desta forma concluímos que a BTX-A não alterou a atividade proteolítica total da saliva, mas aumentou significativamente a secreção de amilase salivar nos grupos tratados com toxina botulínica e gelatina bovina. A dosagem proteica da saliva total tende a diminuir pouco tempo depois da aplicação da BTX-A, e aumenta consideravelmente com o passar do efeito da droga, sugerindo uma grande liberação de proteínas contidas na glândula submandibular.

A influência de BTX-A, sobre a glândula submandibular, tem uma grande importância na concentração final da saliva, especialmente para os ácinos serosos. São necessárias outras metodologias e mais investigações para determinar com certeza as implicações do tratamento da BTX-A para a composição salivar, e verificar a atuação gelatina bovina no tecido glandular.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

Abe, K. & Nitta, H. (1984). Amino acid composition of salivary protein secreted by the parotid glands of rats in response to parasympathomimetic and sympathomimetic drugs. *Archives of Oral Biology*, 29(2), 127-130, 1984. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9969\(84\)90115-8](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9969(84)90115-8).

Almståhl, A. & Wikstrom, M. (2003). Electrolytes in stimulated whole saliva in individuals with hyposalivation of different origins. *Archives of Oral Biology*, 48(5), 337-344. [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-9969\(02\)00200-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-9969(02)00200-5).

Alterman, A., Mathison, R., Coronel, C. E., Stroppa, M. M., Finkelberg, A. B., & Gallarà, R. V. (2012). Functional and proteomic analysis of submandibular saliva in rats exposed to chronic stress by immobilization or constant light. *Archives of Oral Biology*, 57, 663-669. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.12.008>.

Amado, F. M. L., Vitorino, R., Calheiros-Lobo, M. J., Domingues, P. M., & Duarte, J. A. (2006). Salivary glands and saliva composition: a proteomic approach. *Abstracts 3rd International Symposium on Salivary Glands in Honor of Niels Stensen*. Okazaki Conference Center, NINS, Japan. p. 21.

Amado, F., Calheiros-Lobo, M. J., Domingues, P., Duarte, J. A., & Vitorino, R. (2010). Salivary peptidomics. *Expert Review of Proteomics*, 7(5), 709-721. <http://dx.doi.org/10.1586/epr.10.48>.

Anderson, L. C., Yang, S. C., Xie, H., & Lamont, R. J. (1994). The effects of streptozotocin diabetes on salivary-mediated bacterial aggregation and adherence. *Archives of Oral Biology*, 39(4), p. 261-269. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9969\(94\)90115-5](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9969(94)90115-5).

Anderson, L. C., Garrett, J. R., Zhang, X., Proctor, G. B., & Shori, D. K. (1995). Differential secretion of proteins by rat submandibular acini and granular ducts on graded autonomic nerve stimulations. *Journal of Physiology*, 485(2), 503-511.

Asari, T., Maruyama, K., & Kusama, H. (2009). Salivation Triggered by Pilocarpine Involves Aquaporin-5 in Normal Rats but Not in Irradiated Rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 36(5-6), 531-538. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1681.2008.05104.x>.

Azeez, A., Sane, A. P., Bhatnagar, D., & Nath, P. (2007). Enhanced expression of serine proteases during floral senescence in *Gladiolus*. *Phytochemistry*, 68, 1352-1357. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.02.027>.

Benard, M. A., Fabian, F. W., Rosen, S., Hoppert, C. A., & Hunt, H. R. (1956). A Method for the Collection of Large Quantities of Rat Saliva. *Journal of Dental Research*, 35, 326-327. <http://dx.doi.org/10.1177/00220345560350022801>.

Bernfeld, P. (1955). Amylases: α and β . *Methods in Enzymology*, 1, 149-158.

Brosky, M. E. (2007). The Role of Saliva in Oral Health: Strategies for Prevention and Management of Xerostomia. *The Journal of Supportive Oncology*, 5(5): 215-225. PMID: 17564151

Carpenter, G. H., Proctor, G. B., & Garrett, J. R. (2005). Preganglionic parasympathectomy decreases salivary SIgA secretion rates from the rat submandibular gland. *Journal of Neuroimmunology*, 160, 4-11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.10.020>.

Carpenter, G. H., Osailan, S. M., Correia, P., Paterson, K. P., & Proctor, G. B. (2007). Rat salivary gland ligation causes reversible secretory hypofunction. *Acta Physiologica*, 189, 241-249. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-201X.2006.01662.x>.

- Carpenter, G. H. (2013). The Secretion, Components, and Properties of Saliva. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4, 267-276. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182700>.
- Chaparro, O., Yu, W.-H. A., Shaw, P. A. (1998). Isoproterenol-induced expression of the cystatin S gene in submandibular glands of parasympathectomized rats. *Molecular Brain Research*, 61, 136-146. [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-328X\(98\)00223-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-328X(98)00223-X).
- Çiftçi, T., Akinci, D., Yurttutan, N., & Akhan, O. (2013). US-guided botulinum toxin injection for excessive drooling in children. *Diagnostic and Interventional Radiology*, 19(1), 56-60. <http://dx.doi.org/10.4261/1305-3825.DIR.5940-12.1>.
- De Rossi, S. S., & Glick, M. (1996). Dental considerations for the patient with renal disease receiving hemodialysis. *Journal of the American Dental Association*, 127(2), 211-219. <http://dx.doi.org/10.14219/jada.archive.1996.0171>.
- Edwards, A. V., & Titchen, D.A. (2002). The effect of parasympathetic postganglionic denervation on parotid salivary protein secretion in anaesthetized sheep. *Autonomic Neuroscience*, 100(1-2), 50-57. [http://dx.doi.org/10.1016/S1566-0702\(02\)00148-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1566-0702(02)00148-0).
- Ellies, M., Laskawi, R., Götz, W., Arglebe, C., & Tormählen, G. (1999). Immunohistochemical and morphometric investigations of the influence of botulinum toxin on the submandibular gland of the rat. *European Archives of Otorhinolaryngology*, 256(3), 148-152. <http://dx.doi.org/10.1007/s004050050129>.
- Ellies, M., Gottstein, U., Rohrbach-Volland, S., Arglebe, C., & Laskawi, R. (2004). Reduction of salivary flow with botulinum toxin: extended report on 33 patients with drooling, salivary fistulas, and sialadenitis. *The Laryngoscope*, 114(10), 1856-1860. <http://dx.doi.org/10.1097/00005537-200410000-00033>.
- Erasmus, C. R., Hulst, K. V., Hoogen, F. J. V. D., Limbeek, J. V., Roeleveld, N., Veerman, E. C., Rotteveel, J. J., Jongerius, P. H. (2010). Thickened saliva after effective management of drooling with botulinum toxin A. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 52, e114-e118. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8749.2009.03601.x>.
- Field, A. P. (2009). *Discovering statistics using SPSS*. London, England: SAGE.
- Garrett, J. R., Suleiman, A. M., Anderson, L. C., & Proctor, G. B. (1991). Secretory responses in granular ducts and acini of submandibular glands in vivo to parasympathetic or sympathetic nerve stimulation in rats. *Cell and Tissue Research*, 264, 117-126. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00305729>
- Hassin-Baer, S., Scheuer, E., Buchman, A. S., Jacobson, I., & Ben-Zeev, B. (2005). Botulinum Toxin Injections for Children With Excessive Drooling. *Journal of Child Neurology*, 20(2), 120-123. <http://dx.doi.org/10.1177/08830738050200020701>.
- Hay, D. I., Schluckebier, S. K, & Moreno, E.C. (1986). Saturation of human salivary secretions with respect to calcite and inhibition of calcium-carbonate precipitation by salivary constituents. *Calcified Tissue International*, 39(3), p. 151-160. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02555111>.

- Humphrey, S. P., & Williamson, R. T. (2001). A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 85(2), 162-169. <http://dx.doi.org/10.1067/mpr.2001.113778>.
- Lim, M., Mace, A., Reza-Nouraei, S. A., & Sandhu, G. (2006). Botulinum toxin in the management of sialorrhoea: a systematic review. *Clinical Otolaryngology*, 31(4), 267-272. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-4486.2006.01263.x>.
- López-Solís, R., Puente, M., Durán, V., Morales-Bozo, I., Kemmerling, U., Pardo, R., & Wenk, C. (2001). Characterization of mouse salivary polypeptide secretion after oral administration of pilocarpine. *Revista Chilena de Historia Natural*, 74, 195-205. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2001000000023>.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Miranda-Rius, J., Brunet-Llobet, L., Lahor-Soler, E., & Farré, M. (2015). Salivary Secretory Disorders, Inducing Drugs, and Clinical Management. *International Journal of Medical Sciences*, 12, 811-824. <http://dx.doi.org/10.7150/ijms.12912>.
- Mittal, S., Bansal, V., Garg, S., Atreja, G., & Bansal, S. (2011). The diagnostic role of Saliva – A Review. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 3(4), e314-e320. <http://dx.doi.org/10.4317/jced.3.e314>.
- Møller, E., Dugaard, D., Holm, O., Winge, K., Bardow, A., Lykkeaa, J., Belhage, B., & Bakke, M. (2015). Repeated treatments of drooling with botulinum toxin B in neurology. *Acta Neurologica Scandinavica*, 131, 51-57. <http://dx.doi.org/10.1111/ane.12309>.
- Neyraud, E., Sayd, T., Morzel, M., & Dransfield, E. (2006). Proteomic analysis of human whole and parotid salivas following stimulation by different tastes. *Journal of Proteome Research*, 5(9), 2474-2480. <http://dx.doi.org/10.1021/pr060189z>.
- Osailan, S. M., Proctor, G. B., Mcgurk, M., & Paterson, K. L. (2006). Intraoral duct ligation without inclusion of the parasympathetic nerve supply induces rat submandibular gland atrophy. *International Journal of Experimental Pathology*, 87(1), 41-48. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0959-9673.2006.00453.x>.
- Petracca, M., Guidubaldi, A., Ticciardi, L., Ialongo, T., Del Grande, A., Stasio, E. D., & Bentivoglio, A. R. (2015). Botulinum toxin in sialorrhoea is safe and effective in long-term use. *Toxicon*, 93, S49-S50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.11.161>.
- Proctor, G. B., & Carpenter, G. H. (1998). The function of salivary proteins and the regulation of their secretion by salivary glands. *Biomedical Reviews*, 9, 3-15. <http://dx.doi.org/10.14748/bmr.v9.132>.
- Proctor, G. B., Osailan, S. M., Mcgurk, M., & Harrison, J. (2007). Sialolithiasis - pathophysiology, epidemiology and aetiology. In O. Nahlieli (Ed.), *Modern Management Preserving the Salivary Glands* (pp. 85-135). Herzeliya: IsraDon Publ.
- Sanioto, S. M., Amorim, J. B. O., Mancini, M. N. G., & Baldo, M. V. C. (2013). Regulação Neurovegetativa do Aparelho Estomatognático: Fisiologia da Secreção Salivar. In M. V. C.

- Baldo, & M. C. Regatão, *Fundamentos de Odontologia: Fisiologia Oral* (Chapter 5). São Paulo: Santos.
- Shan, X. -F., Cai, Z. -G., Wu, L. -L., Yu, & G. -Y. (2009). Effect of botulinum toxin-A on secretion of parasympathetic denervated rabbit submandibular gland. *Chinese Journal of Stomatology*, 44(9), 548-552. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2009.03.342>
- Shan, X. -F., Xu, H., Cai, Z. -G., Wu, L. -L., & Yu, G. -Y. (2013). Botulinum toxin A inhibits salivary secretion of rabbit submandibular gland. *International Journal of Oral Science*, 5(4), 217-223. <http://dx.doi.org/10.1038/ijos.2013.82>.
- Turner, R. J., & Sugiya, H. (2002). Understanding salivary fluid and protein secretion. *Oral Disease*, 8(1), 3-11. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1601-0825.2002.10815.x>.
- Vashishta, R., Nguyen, S. A., Whit, D. R., & Gillespie, M. B. (2013). Botulinum Toxin for the Treatment of Sialorrhea: A Meta-analysis. *Otolaryngology – Head and Neck Surgery*, 148(2), 191-196. <http://dx.doi.org/10.1177/0194599812465059>.
- Watson, G. E., Pearson, S. K., Falany, J. L., Culp, D. J., Tabak, L. A., & Bowen, W. H. (1989). The Effect of Chronic Atropine Treatment on Salivary Composition and Caries in Rats. *Journal of Dental Research*, 68(12), 1739-1745. <https://doi.org/10.1177/00220345890680120401>.
- Westbrook, S. D. (1978). Dental management of patients receiving hemodialysis and kidney transplants. *Journal of the American Dental Association*, 96(3), 464-468. <http://dx.doi.org/10.14219/jada.archive.1978.0091>.
- Wu, K. P. -H., Ke, J. -Y., Chen, C. -Y., Chen, C. -L., Chou, M. -Y., & Pei, Y. -C. (2011). Botulinum Toxin Type A on Oral Health in Treating Sialorrhea in Children With Cerebral Palsy: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Journal of Child Neurology*, 26(7), 838-843. <http://dx.doi.org/10.1177/0883073810395391>.
- Yu, J. -H. (1986). Modulating effects of prostaglandins on parasympathetic-mediated secretory activities of rat salivary glands. *Prostaglandins*, 31(6), 1087-1097. [http://dx.doi.org/10.1016/0090-6980\(86\)90212-1](http://dx.doi.org/10.1016/0090-6980(86)90212-1).
- Zlotnik, Y., Balash, Y., Korczyn, A. D., Giladi, N., & Gurevich, T. (2015). Disorders of the Oral Cavity in Parkinson's Disease and Parkinsonian Syndromes. *Parkinson's Disease*, 2015, 1-6. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/379482>.
- Zussman, E., Yarin, A. L., & Nagler, R. M. (2007). Age- and Flow-dependency of Salivary Viscoelasticity. *Journal of Dental Research*, 86(3), 281-285. <https://doi.org/10.1177/154405910708600316>.

Apêndice IV – Artigo 4

Uso Local de Toxina Botulínica Tipo A no Complexo Submandibular-Sublingual de Ratas: Análises Sorológica e Histopatológicas Hepáticas e Renais

Local Use of Botulinum Toxin Type A in the Submandibular-Sublingual Complex of Rats: Serological and Hepatic and Renal Histopathology Analyzes

Jaciel Benedito de Oliveira^{a*}, Liriane Baratella-Evêncio^b, Luciana Silva Regueira^c, Leonardo Prezzi Dornelles^d, Rair de Meneses Quirino^e, Joaquim Evêncio Neto^f

^aPrograma de Pós-Graduação em Biociência Animal (PPGBA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e Departamento de Anatomia do Centro de Biociências (CB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife Pernambuco, Brasil;

^bDepartamento de Histologia e Embriologia, CB, UFPE;

^cPrograma de Pós-Graduação em Odontologia, Centro de Ciências da Saúde, UFPE;

^dPrograma de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, CB, UFPE

^eCurso de Graduação em Medicina, CCS, UFPE

^fDepartamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFO) e do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal (PPGBA), UFRPE, Recife, Pernambuco, Brasil.

***Autor para Correspondência:**

Prof. Jaciel Benedito de Oliveira, Departamento de Anatomia, Centro de Biociências (CB), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. CEP: 50670-901.

Fone: +55 81 21268555 / E-mail: jacielolaiveira@gmail.com

Resumo

É cada vez mais comum a utilização da toxina botulínica tipo A (BTX-A) na terapêutica da sialorreia. Apesar de ser um tratamento local, há possibilidade de espalhamento da droga para o organismo e pouco se sabe sobre a sua metabolização e excreção. Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar as alterações bioquímicas séricas de enzimas hepáticas e produtos do metabolismo proteico, além de descrever as possíveis alterações na arquitetura tecidual do fígado e rins de ratas tratadas com injeção de BTX-A no complexo submandibular-sublingual. Foram utilizadas 32 ratas Wistar adultas, distribuídas em cinco grupos: Controle, sem tratamento (n=7); grupos BTX-A 12 (n=7) e BTX-A 35 (n=6), que receberam a aplicação de 2,5U de toxina botulínica tipo A em glândulas submandibulares direitas; e grupos GEL 12 (n=6) e GEL 35 (n=6), cujas glândulas direitas receberam injeção de 0,125 mg gelatina de origem bovina. Os grupos BTX-A 12 e GEL 12 foram analisados aos 12 dias após o tratamento, enquanto os grupos BTX-A 35 e GEL 35, foram analisados aos 35 dias após aplicação. Através de punção cardíaca, foi coletado de 4 a 5 mL de sague, que após a retração do coágulo foi centrifugado à 3000 rpm por 10 minutos para obtenção do soro sanguíneo. Foram realizadas análises bioquímicas séricas para AST, ALT, GGT, FA, creatinina, ureia e albumina, além dos eletrólitos Ca^{2+} , PO_4^- , Cl^- , K^+ e Na^+ . Os fragmentos hepáticos e renais removidos foram fixados em formol 10% tamponado, pH 7,2, encaminhados para processamento histológico convencional e corado com HE. Não foram visualizadas alterações histopatológicas nos fígados, porém os rins apresentaram modificações glomerulares e tubulares, sugestivos de lesões renais. Não se observou alterações significativas nos níveis de AST, FA e ureia. Dentre os íons, apenas K^+ aumentou significativamente entre os grupos de estudo. A análise dos parâmetros bioquímicos não permitem, por si só, concluir precisamente o diagnóstico dos tecidos afetados e a etiopatogenia das lesões hepáticas e renais, sendo a análise histopatológica fundamental para a conclusão final. A análise histopatológica revelou grandes alterações do parênquima renal, com graves insultos aos néfrons, lesão glomerulares e das células tubulares, tendo correlação com os níveis séricos de ureia e as tendências da concentração de creatinina.

Palavras-chaves: Toxina botulínica tipo A, Fígado, Rim, Eletrólitos, Técnicas de laboratório clínico

Abstract

The use of botulinum toxin type A (BTX-A) in the treatment of sialorrhea is increasingly common. Despite being a local treatment, there is a possibility of spreading the drug to the organism and little is known about its metabolism and excretion. Therefore, the objective of this research was to evaluate the biochemical serum changes of hepatic enzymes and products of protein metabolism, besides describing the possible alterations in liver and kidneys tissue architecture of rats treated with BTX-A injection in the submandibular-sublingual complex. Thirty-two adult and female animals were used, distributed in five groups: Control, without treatment (n = 7); BTX-A 12 (n = 7) and BTX-A 35 (n = 6) groups, who received the application of 2.5U botulinum toxin type A in right submandibular glands; and GEL 12 (n = 6) and GEL 35 (n = 6) groups, whose right glands were injected with 0.125 mg gelatin of bovine origin. BTX-A 12 and GEL 12 groups were analyzed at 12 days post-treatment, while the BTX-A 35 and GEL 35 groups were analyzed at 35 days after application. Through cardiac puncture, 4 to 5 mL of sage were collected, which after clot retraction was centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes to obtain blood serum. Serum biochemical analyzes were performed for AST, ALT, GGT, AF, creatinine, urea and albumin, besides the electrolytes Ca^{2+} , PO_4^- , Cl^- , K^+ and Na^+ . The removed hepatic and renal fragments were fixed in 10% buffered formaldehyde, pH 7.2, forwarded for conventional histological processing and stained with HE. No histopathological changes were seen in livers, but the kidneys presented glomerular and tubular modifications suggestive of renal lesions. No significant changes were observed in the levels of AST, FA and urea. Among the ions, only K^+ significantly increased between the study groups. The analysis of the biochemical parameters does not, by itself, accurately conclude the diagnosis of the affected tissues and the etiopathogenesis of the hepatic and renal lesions, being the histopathological analysis fundamental for the conclusion. Histopathological analysis revealed large alterations of the renal parenchyma, with grave insults to the nephrons, glomerular and tubular cell lesions, correlating with serum levels of urea and trends in creatinine concentration.

Keywords: Botulinum toxins type A, Liver, Kidney, Electrolytes, Clinical laboratory techniques

1. Introdução

A injeção intraglandular de toxina botulínica tipo A (BTX-A) é considerada um procedimento pouco invasivo e local, com discretos ou nulos efeitos colaterais locais ou sistêmicos, constituindo uma ótima alternativa de tratamento para a sialorreia (Gok et al., 2013; Mendes et al., 2010; Bhayani e Suskind, 2008; Cheng e Newall, 2003). Entretanto, há poucos relatos na literatura que relate com certeza a excreção da BTX-A a partir deste ponto de aplicação.

Apesar da toxina botulínica ser considerada a neurotoxina mais letal que existe (Bachur et al., 2009; Johnson e Bradshaw, 2001), com sua dose letal de 1 ng/kg de peso corporal, sendo 10 milhões de vezes mais tóxico do que o cianeto (Zhang e Varnum, 2012; Schantz e Johnson, 1992), esta toxina tornou-se foco de interesse para fins terapêuticos, tendo seu uso ampliado para tratamento de transtornos autonômicos e, mais recentemente, tem sido estudado seu efeito analgésico na dor neuropática (Cortés-Monroy e Soza, 2014).

Alguns autores afirmaram que após a aplicação da toxina botulínica, o excedente da droga é absorvido pela circulação sanguínea, sendo metabolizada sistemicamente através de proteases, com excreção urinária (Sposito, 2004; Simpson, 2013).

A homeostasia do corpo depende, dentre outros parâmetros, do bom funcionamento renal, pois exerce funções fisiológicas regulatórias e excretórias indispensáveis (Eaton e Pooler, 2016; Almeida et al., 2012; Funchal, Mascarenhas, Guedes, 2011; Guyton e Hall, 2011). Da mesma forma, o fígado tem um importante papel na homeostasia do corpo, desempenhando, dentre diversas funções, a secreção de bile, produção e metabolismo de proteínas, degradação e excreção de diversas drogas (Guyton e Hall, 2011; Schinoni, 2006).

A inexistência de trabalhos na literatura sobre os efeitos sistêmicos da BTX-A utilizada no tratamento local da sialorreia, sobretudo nas funções hepáticas e renais, em relação às alterações bioquímicas laboratoriais e histopatológicas, sustentam a proposta da presente pesquisa em avaliar as alterações bioquímicas séricas de enzimas hepáticas e produtos do metabolismo proteico, além de descrever as possíveis alterações na arquitetura tecidual do fígado e rins de ratas tratadas com injeção intraglandular de BTX-A.

2. Materiais e Métodos

2.1. Considerações Éticas e Tratamento dos Animais

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Biociências (CB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob o parecer de número 23076.023152/2014-14. Foram utilizadas 32 ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*), fêmeas, adultas pesando entre 200-300 g. Os animais tiveram livre acesso a água e comida com uma dieta padrão para roedores do biotério (Presence[®] Nutrição Animal para Ratos, SP, Brasil) e foram mantidos 4 animais por gaiola de gaiolas de polipropileno (49x34x16 cm), em temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Todas as manipulações experimentais foram realizadas entre 7:00 e 10:00 horas.

Os animais foram divididos em cinco grupos: grupo controle com 7 animais, sem quaisquer tratamentos do complexo submandibular-sublingual; grupo BTX-A 12 dias, com 7 animais, cujas glândulas submandibulares dos complexos submandibulares-sublinguais direitos receberam injeção de 2,5 U toxina botulínica tipo A (*Prosigne*[®], Cristália, Itapira, SP, Brasil), reconstituída em 0,1 mL de solução de cloreto de sódio 0,9%, evitando-se o borbulhamento e agitação do diluente sobre a toxina, e analisadas 12 dias após a aplicação; grupo BTX-A 35 dias, com 6 animais, cujas glândulas salivares receberam o mesmo tratamento do grupo BTX-A 12 dias, porém analisadas 35 dias após a aplicação; grupo GEL 12 dias e grupo GEL 35 dias, com 6 animais cada, cujas glândulas receberam injeção de 0,125 mg gelatina de origem bovina (Gelita do Brasil Ltda., SP, Brasil), também diluída em 0,1 mL de cloreto de sódio 0,9%, e analisadas 12 e 35 dias após a aplicação da gelatina, respectivamente (Ellies et al.,1999).

Para a aplicação da toxina botulínica tipo A e da gelatina de origem bovina nas glândulas submandibulares do complexo, os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (50 mg/kg de peso – Clortamina[®], BioChimico, Itatiaia, RJ, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg de peso – Rompun[®], Bayer S.A., SP, Brasil), na proporção de 1:1 associados na mesma seringa e administrados por via intramuscular. A seguir, foi realizado antissepsia do local com digluconato de clorexidina 2% (FGM do Brasil[®], Joinville, SC, Brasil), tricotomia da região cervical dos animais e aplicação das drogas pelo método palpatório e localização anatômica do complexo submandibular-sublingual. Posteriormente, posicionou-se a agulha no terço médio do complexo, com a finalidade de injetar a droga apenas na glândula submandibular. As aplicações intraglandulares foram em dose única, utilizando-se seringa de insulina de 1 mL/cc ultrafina, com agulha de calibre de 8 mm (5/16") x 0,3 mm (30G) (BD, Curitiba, Paraná, Brasil).

2.2. Punção Sanguínea e Colheita do Fígado e dos Rins

Nas respectivas datas de análise de cada grupo de estudo, com seringa descartável de 5 mL (Luer Lock, Descarpack, Fibra Cirúrgica, Joinville, SC, Brasil), foi feita punção cardíaca de 4 a 5 mL de sangue, que foi armazenado em tubos tipo Falcon seco e estéril de 15 mL (Global Trade, Monte Alto, SP, Brasil) sem anticoagulante ou ativador de coágulos e mantido em repouso (Costa et al., 2012).

Após a retração completa do coágulo, deixados a temperatura ambiente por 30 minutos, as amostras foram centrifugadas para obtenção do soro sanguíneo, à 3000 rotações por minuto, durante dez minutos. O soro sobrenadante foi acondicionado em tubos de polipropileno (Eppendorfs do Brasil, SP, Brasil) e congelado a -20°C até o momento das análises. O congelamento ocorreu para fazer as análises de todas os grupos em um único momento e todas as amostras foram descongeladas apenas no momento de processamento. Após a punção sanguínea, foi realizada uma incisão na cavidade abdominal dos animais, e o fígado e rins foram removidos, fixados em formol 10% tamponado, pH 7,2.

2.3. Análise da Bioquímica Sérica

As análises bioquímicas séricas foram realizadas no Analisador Bioquímico Semiautomático Bio-200F (Bioplus[®], Barueri, São Paulo, Brasil), utilizando kits bioquímicos comerciais específicos da Dolles[®] Reagentes (Goiânia, GO, Brasil), seguindo a orientação do fabricante. Foram determinados os seguintes parâmetros bioquímicos: alanina aminotransferase (ALT ou TGP), aspartato aminotransferase (AST ou TGO), gama-glutamil transferase (Gama-GT ou GGT), fosfatase alcalina (FA), creatinina, ureia e albumina séricas.

2.4. Ionograma do Soro Sanguíneo

Após o descongelamento do soro sanguíneo armazenados em tubos de polipropileno (Eppendorfs do Brasil, SP, Brasil), foram obtidas 150 μL de cada amostra, colocadas em cubetas plásticas de 5 mL, pré-diluídas e analisadas automaticamente por um analisador para testes bioquímicos e imunoquímicos, o LabMax 240[®] (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, MG, Brasil).

Foram dosados os íons fósforo (PO_4^-), cálcio (Ca^{2+}), cloreto (Cl^-), sódio (Na^+) e potássio (K^+), utilizando os kits Cloretos Liquiform, Fósforo, Cálcio Arsenazo Liquiform, Potássio Enzimático e Sódio Enzimático (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, MG, Brasil). Todas as análises foram realizadas num mesmo período, de maneira a se obter o máximo de padronização em relação as amostras e aos aparelhos, minimizando a variabilidade analítica.

2.5. Análises Histopatológicas do Fígado e dos Rins

Após a fixação, fragmentos dos fígados e metade de cada um dos rins dos animais foram encaminhados para processamento, através da técnica histológica convencional, com inclusão em parafina histológica. Cortes histológicos semisseriados foram obtidos com aproximadamente 5 μm , estirados em banho-maria histológico, dispostos em lâminas, corados pela hematoxilina e eosina (HE), e montados em Entellan[®] (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) (Tolosa et al., 2003).

2.6. Análise Estatística

Os dados obtidos do ionograma do soro sanguíneo foram tabulados em planilha do programa *Microsoft Office Excel 2016* para *Windows 10* (*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. Para a análise estatística paramétrica, utilizou-se o teste Análise de Variância (ANOVA) com o teste *Post-Hoc de Tukey*. O teste Kruskal Wallis foi aplicado nos parâmetros formados por dados não paramétricos, seguido do *Mann-Whitney U Test*, quando houvesse diferença significativa. O *software SPSS Statistics Desktop*[®] 22.0 (IBM, International Business Machines Corp., New York, EUA) foi usado para a realização das análises estatísticas. Todas as conclusões levaram em consideração o nível de significância de 0,05 (5%) (FIELD, 2009). Os valores dos dados foram expressos em média \pm desvio padrão (DP).

3. Resultados

3.1. Análise da Bioquímica Sérica

A análise dos dados mostrou pequenas variações individuais quando cada parâmetro foi avaliado. Os dados apresentados na Tabela 1, são referentes aos parâmetros bioquímicos

analisados onde estão demonstrados o número de animais por grupo, a média e o desvio padrão da média (DP) dos resultados obtidos.

Após a aplicação do teste ANOVA para verificar as diferenças entre os grupos do exame ALT, o teste *post-Hoc de Tukey* mostrou que a média e desvio padrão do grupo BTX-A 35 dias foi significativamente menor quando comparada com as médias dos outros quatro grupos de estudo ($p < 0,02$). Os outros grupos (controle, BTX-A 12, GEL 12 e GEL 35 dias) não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

Tabela 1

Médias, Desvios Padrões e Análise Estatística dos Parâmetros avaliados nos grupos de estudo.

Exames e Unidades de Medidas	Grupos de Estudo					<i>p</i> -valor ^{1,2}
	Controle (7 animais)	BTX-A 12 dias (7 animais)	BTX-A 35 dias (6 animais)	GEL 12 dias (6 animais)	GEL 35 dias (6 animais)	
	Médias ± Desvios Padrões (DP) das médias					
AST (U/L)	225,29 ± 30,90	194,14 ± 21,95	178,67 ± 20,21	200,83 ± 26,01	278,17 ± 17,35	0,71 ¹
ALT (U/L)	62,29 ± 3,91	62,71 ± 6,21	36,33 ± 2,73	76,50 ± 3,84	74,17 ± 8,40	0,000 ¹
FA (U/L)	478,14 ± 59,98	435,29 ± 65,52	401,67 ± 84,10	458,17 ± 96,74	406,33 ± 59,67	0,934 ¹
GGT (U/L)	3,96 ± 0,90	3,65 ± 0,83	1,66 ± 0,38	2,04 ± 0,53	4,44 ± 0,64	0,031 ²
Albumina (g/dL)	3,39 ± 0,15	3,32 ± 0,013	2,76 ± 0,13	3,23 ± 0,21	2,97 ± 0,12	0,034 ¹
Ureia (mg/dL)	39,43 ± 1,13	50,57 ± 4,35	58,33 ± 8,04	45,67 ± 4,88	54,33 ± 2,34	0,058 ¹
Creatinina (mg/dL)	0,56 ± 0,06	0,64 ± 0,03	0,56 ± 0,08	0,76 ± 0,03	0,74 ± 0,09	0,041 ²

¹p-valor do teste da ANOVA (se p-valor < 0,05 as médias entre os grupos diferem significativamente).

²p-valor do teste Kruskal Wallis (se p-valor < 0,05 as médias entre os grupos diferem significativamente).

A aplicação do *Mann-Whitney U Test* nos diferentes grupos de estudo de análise do GGT, mostrou haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos: controle e BTX-A 35 dias ($p = 0,45$); BTX-A 35 e GEL 35 dias ($p = 0,009$); e GEL 12 e GEL 35 dias ($p = 0,022$).

O teste *post-Hoc de Tukey* da estatística da dosagem de albumina sérica, mostrou haver uma pequena diferença estatisticamente significante apenas entre o grupo controle e o grupo BTX-A 35 dias ($p = 0,42$), tendo o grupo controle uma concentração em g/dL maior quando comparado ao grupo analisado com 35 dias após a aplicação da BTX-A (Tabela 1).

Com relação aos níveis séricos de creatinina, após a aplicação do *Mann-Whitney U Test*, verificou haver diferença significativa entre os grupos: controle e GEL 12 dias ($p = 0,011$); BTX-A 12 e GEL 12 dias ($p = 0,023$); e BTX-A 35 e GEL 12 dias ($p = 0,024$). Ou seja, a média da creatinina do grupo GEL 12 dias foi significativamente maior que a média dos grupos controle, BTX-A 12 e BTX-A 35 dias.

2.2. Ionograma do Soro Sanguíneo

A análise estatística dos dados obtidos, mostrou pequenas variações individuais quando cada parâmetro foi avaliado. Os dados apresentados na Tabela 2, são referentes aos parâmetros bioquímicos de eletrólitos analisados, onde estão demonstrados o número de animais por grupo, a média e o desvio padrão da média (DP) dos resultados obtidos.

O único parâmetro onde foi encontrado diferença estatisticamente significativa, foi na dosagem do cátion potássio ($p = 0,010$). O teste *Post-Hoc de Tukey*, revelou que houveram diferenças estatísticas entre o grupo Controle e os grupos BTX-A 12 dias ($p = 0,41$) e GEL 12 dias ($p = 0,12$).

Tabela 2

Médias, Desvios Padrões e Análise Estatística dos Parâmetros avaliados no Ionograma do Soro Sanguíneo nos Grupos de Estudo (Ca^{2+} , PO_4^- , Cl^- , K^+ e Na^+).

Exames e Unidades de Medidas	Grupos de Estudo					<i>p</i> -valor ^{1,2}
	Controle n = 7	BTX-A 12 dias n = 7	BTX-A 35 dias n = 6	GEL 12 dias n = 6	GEL 35 dias n = 6	
	Médias ± Desvios Padrões (DP) das médias					
Íon Cálcio mg/L	10,61 ± 0,37	11,31 ± 0,31	10,69 ± 0,37	11,28 ± 0,92	10,75 ± 0,50	0,784 ¹
Íon Fosfato mg/dL	14,72 ± 0,85	16,87 ± 1,75	14,27 ± 0,66	15,63 ± 2,39	12,92 ± 0,73	0,348 ²
Íon Cloreto mmol/L	111,54 ± 2,07	110,35 ± 1,02	115,01 ± 3,14	110,46 ± 5,35	107,59 ± 2,53	0,351 ²
Íon Potássio mmol/L	4,58 ± 0,16	6,36 ± 0,43	5,18 ± 0,46	6,75 ± 0,56	5,62 ± 0,54	0,010 ¹
Íon Sódio mmol/L	277,31 ± 15,6	303,72 ± 19,2	312,67 ± 30,5	286,47 ± 19,0	275,00 ± 24,6	0,690 ¹

¹p-valor do teste da ANOVA (se p -valor < 0,05 as médias entre os grupos diferem significativamente).

²p-valor do teste Kruskal Wallis (se p -valor < 0,05 as médias entre os grupos diferem significativamente).

2.3. Análises Histopatológicas do Fígado e dos Rins

Macroscopicamente, os fígados e rins não apresentaram quaisquer alterações anatômicas, considerando aspectos como tamanho, cor e forma. A avaliação histopatológica dos fragmentos hepáticos do grupo controle, demonstrou um padrão microscópico de normalidade, com o fígado revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso e dividido em compartimentos de forma aproximadamente hexagonal, formando os lóbulos hepáticos. Na região onde os vértices dos lóbulos hepáticos confluíam, o espaço porta, se apresentava preenchido por tecido conjuntivo contendo ramos da artéria hepática, veia porta-hepática e o ducto biliar. No centro do lóbulo, observamos a veia centrolobular, e partido desta, de maneira radial, os hepatócitos se arrumam em cordões, enfileirados. Entre os cordões, e convergindo para a veia centrolobular, encontramos diversos capilares sinusoides hepáticos, dentro do quais, de forma muito característica, encontramos um macrófago fixo, de núcleo achatado e citoplasma irregular (células de Küpffer). Os hepatócitos apresentaram-se com morfologia típica, citoplasma abundante com aspecto homogêneo e núcleo central (Fig. 1A – C). Os grupos tratados com BTX-A e analisados com 12 dias (Fig. 1D) e 35 dias (Figura 1E), assim como os grupos tratados com gelatina bovina (Fig. 1F), apresentaram-se semelhante à descrição do grupo controle, apresentando padrão lobular normal, sem desagregação dos cordões de hepatócitos ou dilatação dos capilares sinusoides, nem aumento aparente do número de hepatócitos binucleados ou com cariomegalocitose, citoplasma preservado sem sinais de esteatose microvesicular ou macrovesicular (acúmulo intracelular de lipídeos), nem pigmentações, amiloidoses, presença de congestão, infiltração inflamatória, colestase e necrose hepática degenerações, seja na região centrolobular ou periférica do lóbulo hepático.

Os rins apresentaram-se com superfície externa envolvida por cápsula opalescente, que se destaca com facilidade do parênquima, envolvidos por uma gordura perirrenal esbranquiçada, e ao corte transverso, conseguia-se visualizar os limites das pirâmides renais.

A avaliação histopatológica dos fragmentos renais do grupo controle, demonstram um padrão microscópico de normalidade, sendo formados por uma região cortical e região medular bem distintas, sendo revestido externamente por uma cápsula de tecido conjuntivo denso modelado (Fig. 2).

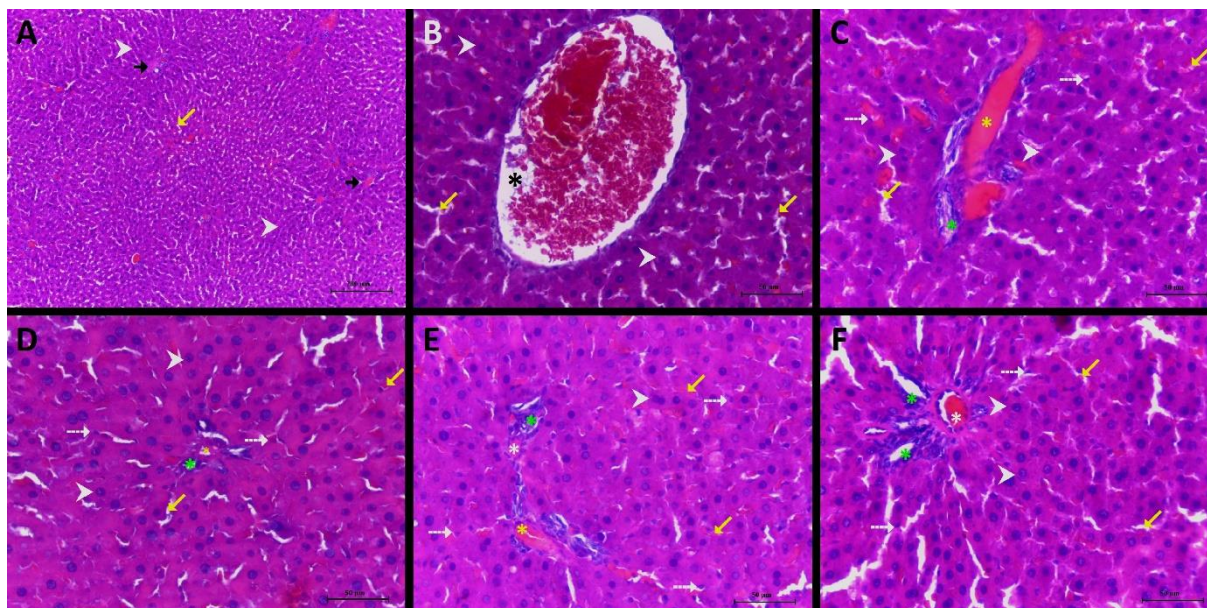


Fig. 1. Fotomicrografias de fragmentos hepáticos de ratas dos diversos grupos de estudo. Em A, B e C, grupo controle. Em D, grupo BTX-A 12 dias. Em E, grupo BTX-A 35 dias. Em F, grupo GEL 35 dias. Veia centro lobular (asterisco preto); Espaço porta (seta curta preta); hepatócitos e cordões de hepatócitos (cabeças de setas brancas); capilares sinusoides hepáticos (setas amarelas); ramos da artéria hepática (asterisco branco); ramos da veia porta (asteriscos amarelos); ductos biliares (asteriscos verdes); células de Kupffer (setas pontilhadas brancas). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Em A, barra = 200 μ m. Em B, C, D, E e F, barra = 50 μ m.

Na região cortical observou-se uma grande quantidade de corpúsculos renais, formados por uma anastomose de capilares (glomérulo renal), envoltos pela cápsula de Bowman. O folheto parietal da cápsula de Bowman estava bem distinto, formado por um epitélio pavimentoso simples, e com o espaço urinário (capsular ou de Bowman) bem preservados. Várias regiões dos túbulos renais mostraram-se normais sem alterações no espessamento mesangial ou deposição hialina. As várias secções de túbulos contorcidos proximais, mais intensamente eosinofílicos, formado por um epitélio cúbico simples como microvilosidades em seu polo apical, formando uma borda em escova, e delimita uma pequena luz central. Já as secções dos túbulos contorcidos distais estavam em menor quantidade, e apesar de também ter sua parede formada por epitélio cúbico simples, estas células possuíam altura mais baixa, com luz maior, sem borda em escova e menos corada, quando comparada com as células do túbulo contorcido proximal. Sobre a alça do néfron, tanto as suas porções proximal e distal, são espessas e semelhantes à estrutura descrita para o túbulo contorcido proximal (epitélio cúbico simples). Já a porção delgada, seguimento entre as outras duas porções da alça do néfron, se apresentou na região da pirâmide renal com células epiteliais pavimentosas. Nas secções dos túbulos coletores, visualizou-se células cúbicas simples, de coloração mais clara e nítidos limites celulares. O estroma renal ou interstício renal (tecido conjuntivo entre os túbulos

uriníferos), tanto na região medular quanto na cortical, apresentava-se em quantidade escassa e pouco notável, porém com uma grande quantidade de vasos sanguíneos (Fig. 2).

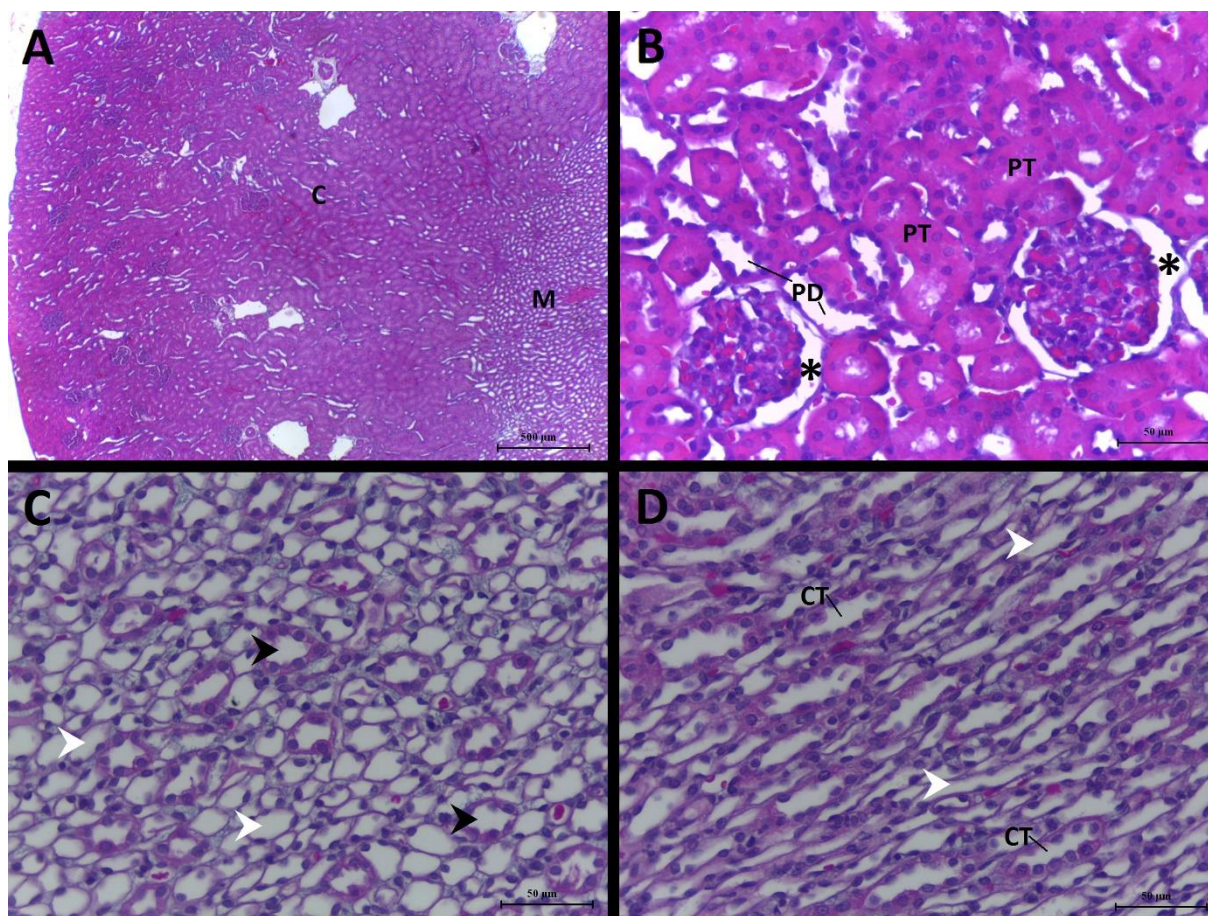


Fig. 2. Fotomicrografias de fragmentos renais de ratos do grupo Controle. Em A, a região cortical (C), o começo da pirâmide renal na região medular (M). Em B, região ampliada do córtex renal, observa-se nos corpúsculos renais o espaço da cápsula de Bowman bem característico (asteriscos pretos) com glomérulo renal ao centro. Secções de túbulos contorcidos proximais (PT), secções de túbulos contorcidos distais (DT). Em C e D, região medular, notam-se secções de porções espessas da alça do néfron (cabeças de setas pretas), secções de porções delgadas da alça do néfron (cabeças de setas brancas), secções de túbulos coletores (CT). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Em A, barra = 500 µm. Em B, C e D, barra = 50 µm.

Já nos grupos tratados com toxina botulínica tipo A, apesar da organização estrutural geral ser semelhante ao grupo controle, a análise histopatológica da região cortical mostrou desarranjo na arquitetura dos corpúsculos renais e no epitélio dos túbulos renais. O espaço de Bowman dos corpúsculos renais estavam ausentes em boa parte do parênquima renal, principalmente dos néfrons corticais, tanto no grupo analisado com 12 dias (BTX-A 12), como no grupo descrito com 35 dias (BTX-A 35) após a aplicação da toxina. As células dos túbulos contorcidos proximais estavam intumescidas, lúmen bastante reduzido, porém mantendo seus contornos, núcleos em menor número e com basofilia esmaecida, semelhante ao estado de cariólise, quando comparado com o grupo controle. Alguns túbulos contorcidos distais

apresentam células destacadas presentes no lúmen tubular, separadas de suas membranas basais. A congestão glomerular e a congestão de vasos sanguíneos foram evidentes, sugestivo de lesão renal aguda com degeneração em células epiteliais dos túbulos contorcidos proximal e distal, como agressão tubular direta (Fig. 3A e 3D). Já na região medular, Figura 3B, observa-se um aumento do interstício renal e a tumefação dos vasos sanguíneos. Ainda na Figura 3D, do grupo BTX-A 35 dias, os túbulos contorcidos proximais apresentam intensa redução da quantidade de núcleos, e o citoplasma das células com pequenos vacúolos (vacuolização), além de granulação citoplasmática de células tubulares. Na Figura 3E, em uma área mais superior à esquerda do observador, vê-se ausência de núcleos dos túbulos contorcidos proximais; no restante da fotomicrografia, os núcleos das células epiteliais se apresentam com características de picnose, onde vê-se a retração nuclear e aumento da basofilia, além do citoplasma com um certo aspecto granuloso. Aspecto parecido encontra-se na Figura 3F, porém com vários vacúolos citoplasmáticos espalhados pelas células. A Figura 3C, mostra que a lesão renal acentua-se da superfície do órgão em direção a região medular.

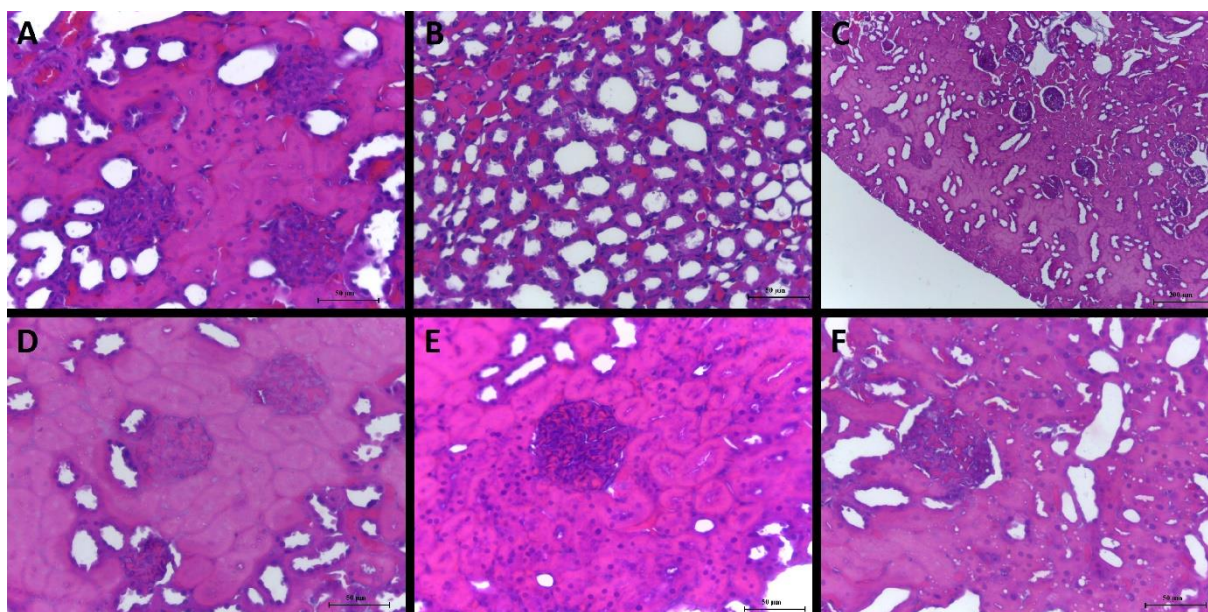


Fig. 3. Fotomicrografias de fragmentos renais de ratas dos grupos tratados com toxina botulínica tipo A. Em A, região cortical de BTX-A 12 dias. Em B, região medular de BTX-A 12 dias. Em C, D, E e F, parênquima renal do grupo BTX-A 35 dias. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Em A, B, D, E e F, barra = 50 µm. Em C, barra = 200 µm.

As análises do grupo GEL 12 dias, foi semelhante ao descrito para os grupos tratados com toxina botulínica tipo A (Fig. 4A e B). Porém no grupo GEL 35 dias, encontrou-se regiões do parênquima renal bastante preservadas (Fig. 4C), assim como regiões características de lesão renal, como descrito anteriormente (Fig. 4D).

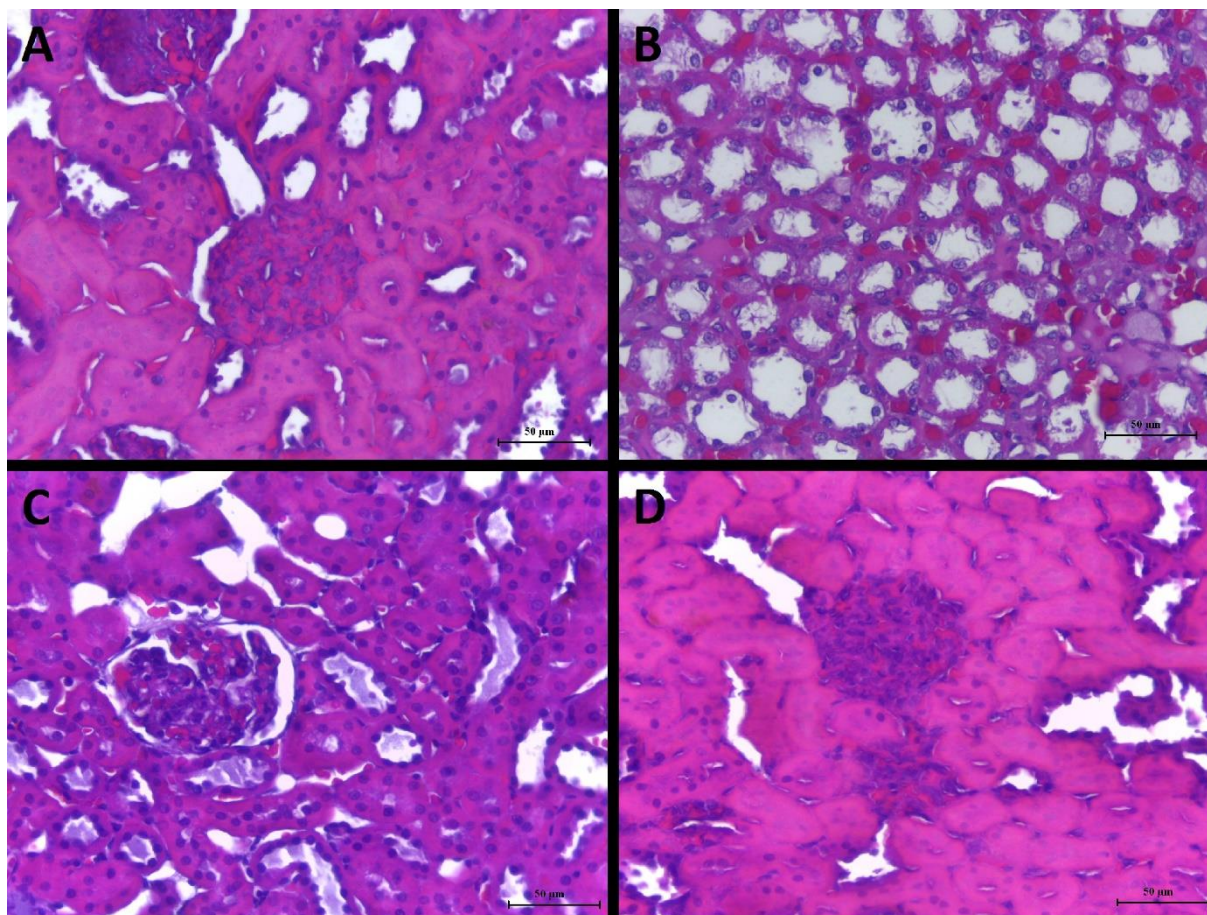


Fig. 4. Fotomicrografias de fragmentos renais de ratas dos grupos tratados com gelatina de origem bovina. Em A, região cortical de GEL 12 dias. Em B, região medular de GEL 12 dias. Em C, região cortical íntegra do grupo GEL 35 dias. E em D, região cortical sob injúria do grupo GEL 35 dias. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Barra = 50 µm.

4. Discussão

Poucos dados foram relatados na literatura sobre a toxicidade e metabolização da toxina botulínica tipo A. Segundo Simpson (2013), após a administração da toxina botulínica, apenas uma minoria entra nos terminais nervosos dos neurônios alvos, enquanto a maior parte permanece no compartimento extracelular. Não existe ainda uma compreensão completa dos mecanismos de metabolismo e eliminação da toxina, tanto no compartimento extracelular, como no intracelular. Este autor ainda conclui que o sangue poderia ser um bom candidato à inativação da toxina botulínica, pois existem células e proteases circulantes que podem englobar e/ou degradar essas substâncias. Porém, para a toxina botulínica estes mecanismos parecem falhos, pois a mesma é muito estável na circulação sanguínea e ainda não há nenhuma evidência de captação celular ou proteólise.

Cheng et al. (2009), descreveram que na contaminação pela toxina botulínica via oral, a mesma não sofre biotransformação durante a translocação de membrana epitelial do intestino,

ou pela interação com os componentes sanguíneos, chegando, assim, na forma ativa nos tecidos alvos. De acordo com Lebeda et al. (2010), Ravichandran et al. (2006) e Sampaio et al. (2004), na corrente sanguínea, a BTX-A continua estrutural e funcionalmente intacta, ou seja, o sangue tem pouca capacidade de alterar a toxina (há pouco ou nenhum metabolismo) ou interferir na sua biodisponibilidade (não possui ligação de alta afinidade com albumina) dentro do intervalo de tempo que é relevante para o início da intoxicação.

Não há relatos de outros estudos clínicos ou experimentais que tenham aferidos parâmetros bioquímicos séricos para verificar as funções hepáticas e renais em tratamentos com toxina botulínica.

Segundo Botox® [Bula] (2015), Silva (2012) e Sposito (2004), não existem estudos sobre absorção, distribuição, biotransformação e eliminação da substância ativa. Mas relatam que a BTX-A, após a injeção muscular, é metabolizada sistemicamente, após ligar-se a grandes moléculas proteicas do plasma sanguíneo, onde será catabolizada, provavelmente, por proteases, tendo os componentes moleculares reciclados através do metabolismo normal, cujo produto final é excretado pelos rins na formação da urina.

Em nossos estudos, houve diminuição significativa apenas dos níveis séricos ALT e GGT do grupo BTX-A 35 dias, embora para GGT o grupo BTX-A 35 dias também tenha diferido grandemente do grupo controle e GEL 35 dias. Tais dados corroboram com o padrão de normalidade visualizados na análise histopatológica do fígado de todos os grupos estudados. Segundo Gonçalves e colaboradores (2010), algumas diferenças nas análises séricas desta espécie animal (*Rattus norvegicus albinus*), se deva ao nível de estresses e pela idade.

Desta forma pode-se supor que a diferença estatística entre os valores de alguns parâmetros bioquímicos relacionados com a função hepática, sobretudo na dosagem de ALT e GGT, pode ser uma resposta adaptativa fisiológica do animal, mas que precisa ser melhor investigada enquanto que as análises de FA e AST não indicam lesão hepática, sugerindo o não envolvimento do fígado na metabolização da BTX-A.

Segundo os pesquisadores Rodwell et al. (2015), Harris (2005), Motta (2003), Al-Habori et al. (2002) e Miller e Gonçalves, (2001), a elevação os níveis séricos destas duas enzimas no sangue podem indicar lesões ou alteração de função no tecido hepático, sendo, inclusive, consideradas sensíveis indicadores de dano hepatocelular, assim como em outros tecidos que as mesmas estão presentes como no músculo e cérebro, e dentro dos limites pode fornecer uma avaliação quantitativa do grau de danos sofridos pelos hepatócitos. Ainda segundo

estes autores, a maior parte da AST encontra-se presente no citoplasma e na mitocôndria, enquanto que a ALT é encontrada apenas no citoplasma do hepatócito. Em danos hepatocelulares leves a forma predominante no soro é a citoplasmática. Desta forma, conforme Thapa e Walia (2007), as suas elevações sejam mais severas ou mais moderadas, AST e ALT ajudam no diagnóstico diferencial de necrose hepatocelular. Teixeira et al. (2009), Kerr (2003) e Al-Habori et al. (2002), ALT é um indicador mais sensível de hepatotoxicidade do que a AST, pois a ALT é liberada mais rapidamente no sangue em grandes quantidades quando há dano à membrana do hepatócito, resultando em aumento da permeabilidade, e, dentro de limites, pode fornecer uma avaliação quantitativa do grau do dano sofrido pelo fígado. Para os pesquisadores Carneiro et al. (2014), a elevação sérica de ALT é a melhor opção para indicação de hepatotoxicidade ou injúria hepatocelular, produzidas ou não por drogas (agentes exógenos químicos).

A FA, uma enzima fosfohidrolase, está relacionada com danos no sistema hepatobiliar, e alterações séricas da mesma podem indicar forte indicio de lesão (González e Silva, 2006). Já a enzima GGT, que tem um papel chave na síntese e degradação da glutatona (GSH, tripeptídeo que protege as células de várias toxinas), atua como marcador da função biliar e/ou diminuição ou interrupção do fluxo da bile a partir do fígado, conhecida como colestase intra e extra-hepática (Thapa e Walia, 2007; González e Silva, 2006; Harris, 2005). Para Kerr (2003), a GGT está associada à quadros hepáticos mais crônicos e tende a aumentar quando ou outras enzimas indicativas de lesões hepáticas estão baixas. De acordo com Thapa e Walia (2007), o diagnóstico com a mensuração de FA é apoiado quando se observa valores aumentados de GGT. E quando associada a valores altos de transaminases, indica lesão hepatocelular.

Já para albumina, houve uma diminuição nos seus níveis séricos nos grupos tratados com BTX-A e gelatina bovina, apesar do teste estatístico ANOVA não indicar diferença significativa entre os mesmos, exceto para os animais tratados com BTX-A e checados com 35 dias após a sua aplicação, sendo divergente do grupo controle. O referido diagnóstico poderia sugerir uma possível diminuição da atividade hepática.

A albumina, juntamente com globulina e ureia são indicadores importantes da interpretação do perfil proteico. A albumina é principal proteína e está presente em grande quantidade no sangue, produzida exclusivamente pelo fígado, sendo de fundamental importância para manter a pressão osmótica coloidal e transportar grandes moléculas orgânicas. As causas de hipoalbuminemia incluem, dentre outras desordens de debilitações orgânicas, insuficiência hepática, glomerulonefropatias e inanição ou estados de desnutrição (Levitt e

Levitt, 2016; Koeppen e Stanton, 2009; Kerr, 2003; Meyer et al., 1995). A produção de albumina também é importante em relação à ligação da toxina com as proteínas plasmáticas. Pois, quanto mais proteínas disponíveis no sangue, maior a taxa de ligação as moléculas da droga, aumentando o tempo de meia-vida e sua circulação pelo organismo (Silva, 2010). Assim, pode-se relacionar que, se o indivíduo possuir pouca produção de proteínas pelos hepatócitos, menor será o metabolismo da toxina e o mesmo terá uma maior fração livre de toxicantes, tendo, desta forma, maiores efeitos tóxicos sobre o organismo.

Desta forma, diante do apresentado pelas análises bioquímica e histopatológicas hepáticas, e em conformidade a conclusão de Nantel e WHO (2002), a BTX-A parece não afetar o fígado. Para Simpson (2013), o mecanismo mais plausível de metabolização e eliminação da BTX-A, é a biotransformação hepática, onde reações de clivagem e, talvez, de conjugação, poderiam promover a transformação da toxina em metabólitos inativos, prelúdio a sua eliminação. Porém ainda não há evidência para estes mecanismos com a BTX-A. O longo tempo de meia-vida sistêmica da BTX-A no corpo humano pode ser devido ao fato de que o título circulante da toxina seja demasiadamente baixo para ser facilmente detectado pelo fígado ou qualquer outra célula metabólica.

Em relação aos rins, Silva (2013), afirma que a resposta inflamatória à toxina botulínica, leva a isquemia renal com necrose tubular, a alteração patológica mais comum de insuficiência renal aguda induzida por toxinas animais. Adebayo et al. (2003) em seus estudos, verificaram a toxicidade da administração prolongada do extrato etanólico de *Khaya senegalensis* sobre os rins de ratos, e concluíram que pode causar alterações das concentrações de parâmetros bioquímicos séricos, como Na^+ , K^+ , ureia e FA, sendo atribuída à necrose tecidual, uma vez que o órgão está relacionado com a excreção de substâncias estranhas. Kumar et al. (2010), afirmam que a resposta celular frente a injúrias causadas por toxinas e drogas, pode causar a morte celular, pela necrose ou pela via apoptótica, inclusive em fígado e rim. A necrose é causada por um distúrbio ambiental grave e devido às alterações fisiológicas normais.

Na dosagem de ureia e creatinina nos animais tratados com BTX-A e gelatina bovina, pode-se observar que os níveis sérios destes produtos metabólicos aumentaram em comparação com o grupo controle. Todavia, os testes estatísticos só descreveram diferenças significativas na inspeção da creatinina, especialmente entre o grupo GEL 12 e os grupos controle, BTX-A 12 dias e BTX-A 35 dias. Estes resultados sugerem uma disfunção ou sobrecarga renal e podem justificar os achados histopatológicos nos grupos tratados, pois, segundo Eaton e Pooler (2016) e Funchal et al. (2011), para que ocorra a secreção renal, é necessário transporte ativo de

substâncias através do citosol das células epiteliais, para a luz dos túbulos do néfron, as quais devem estar saudáveis. Segundo o Laboratório Diagnóstica S.A. (LABTEST, 2012), a elevação na uremia pode ser causada por defeitos de excreção, seja por fatos pré-renais, renais ou pós-renais.

As alterações renais descritas no presente estudo, podem ser explicadas por uma possível ação nefrotóxica da BTX-A sobre os néfrons. Assim como as conclusões de Hofmeister et al. (1986), que pesquisaram a relação das enzimas na urina de rato para diagnóstico de nefrotóxicidade, os resultados mostram uma boa correlação entre os achados renais histopatológicos e níveis séricos de ureia e creatinina, apesar da pouca diferença estatística entre os grupos.

Apesar de não ter ocorrido diferença significativa nos níveis de creatinina entre os grupos controles e tratados com BTX-A, nota-se uma tendência de concentração menor no grupo controle, que corrobora para o diagnóstico histopatológica dos rins. Os altos valores para os grupos tratados com gelatina, devem ser realizados mais estudos para elucidar o referido resultado.

De acordo com Simpson (2013), apesar dos rins serem sítios especializados em depuração e excreção, o limite do peso molecular para a filtração renal em mamíferos é de 50 kDa, enquanto que a toxina botulínica pesa 150 kDa, sugerindo que pacientes com função renal normal não eliminam quantidades significativas da toxina botulínica, pelo menos, intacta na urina. Mas desta forma, e pelas lesões descritas no parênquima renal do presente estudo, pode-se hipotetizar, que a toxina pode sofrer algum processo metabólico em um nível pré-renal, ou então que substâncias inflamatórias ou nocivas sejam geradas e danifiquem os néfrons. São necessários mais estudos sobre este mecanismo, analisando, dentre outros fatores, a presença de BTX-A na urina.

Os testes bioquímicos também visam analisar alterações nos equilíbrios hídrico, eletrolítico e de mineral, justificando a importância da realização do ionograma sérico ou dosagens séricas de alguns eletrólitos. Este estudo investigou as concentrações dos íons Ca^{2+} , PO_4^- , Cl^- , K^+ e Na^+ no soro sanguíneo e apenas a concentração de K^+ apresentou níveis significativamente elevados nos grupos BTX-A e GEL, ambos analisados com 12 dias. Mas, embora não tenha ocorrido diferenças estatísticas significantes entre os outros grupos, observou-se que a concentração sérica dos íons Ca^{2+} , PO_4^- , e Na^+ , também foi maior nos grupos BTX-A e GEL 12 dias, a semelhança da dosagem do K^+ , diminuído para estes quatro íons, suas concentrações ao longo do tempo, ou seja, nos grupos BTX-A e GEL 35 dias.

A investigação dos eletrólitos se faz importante, pois, segundo Ceneviva e Vicente (2008), na doença renal, há diminuição da produção de urina acompanhada da retenção dos principais íons presentes no organismo, independe da situação bioquímica do meio interno. Para Kaplan e Pesce (2009), a quantificação de Na^+ , K^+ e Cl^- permite uma avaliação global da função renal, pois estes eletrólitos quantificados no soro e na urina indicam de que forma estão a ocorrer os processos de reabsorção e secreção tubular e concentração da urina.

Segundo Lowe e Anderson (2016), alterações bioquímicas sistêmicas, pode ser causada por alterações renais como ocorre na necrose tubular aguda, insuficiência renal aguda e crônica, gerando disfunções tubulares. Falhas nos túbulos contorcidos proximais dos néfrons pode resultar em problemas na excreção de H^+ e K^+ , gerando um quadro de acidose sanguínea e hipercalemia (ou hiperpotassemia).

Para Silva et al. (2007), na cloremia, os níveis elevados são encontrados por causa da acidose tubular renal, enquanto a filtração glomerular geralmente é muito pouco afetada. Porém, tal afirmação não condiz com o diagnóstico histopatológico dos grupos tratados, nos quais observou-se alterações glomerulares.

Entretanto, de acordo com Ceneviva e Vicente (2008), na doença renal também existe uma tendência ao aumento da cloremia. Ao contrário do esperado normalmente, nesta pesquisa houve uma tendência à diminuição da concentração do Cl^- . Sabe-se que no aumento da concentração de Na^+ , por exemplo, o paciente pode apresentar um quadro de sede excessiva, levando-o a ingerir grandes quantidades de água, o que pode explicar esta tendência à hipocloremia, pois, segundo Ceneviva e Vicente (2008), uma das causas desta condição é a ingestão excessiva de água, denominada de hipocloremia dilucional ou intoxicação hídrica, sem alterar, no entanto, a quantidade do soluto Cl^- .

Sendo assim, pode-se supor que a lesão dos néfrons induz a uma tendência do aumento dos valores das concentrações dos eletrólitos H^+ , K^+ , Ca^{2+} e PO_4^- , como observado em nossos dados, embora para alguns sem diferença estatística significativa. Porém, segundo Martínez e Carvalho (2010), no início da doença renal, os rins possuem mecanismos compensatórios e conseguem manter a homeostasia destes eletrólitos.

5. Conclusões

O presente estudo destaca a importância da monitorização das funções hepáticas e renais em pacientes que fazem uso da BTX-A, seja de forma estética ou terapêutica. A análise

histopatológica revelou grandes alterações do parênquima renal, com graves insultos aos néfrons, lesão de suas células tubulares, tendo correlação com os níveis séricos de ureia e a tendência das concentrações de creatinina observados, sugerindo que a BTX-A e seu veículo, podem ter uma ação sistêmica a partir de um tratamento local, alterando a estrutura dos rins, como demonstrado pela análise histopatológica desses órgãos no presente estudo. Por outro lado, o diagnóstico histopatológico do fígado e as poucas alterações das enzimas hepáticas, principalmente pela diminuição dos níveis de AST, FA e GGT, são evidências de que a BTX-A e a gelatina bovina não possuem características de hepatotoxicidade.

A análise dos parâmetros bioquímicos não permitem, por si só, concluir precisamente o diagnóstico dos tecidos afetados e a etiopatogenia das lesões hepáticas e renais, sendo a análise histopatológica fundamental para a conclusão final.

Nossos dados são indubitavelmente preliminares, podendo ser um importante marco inicial para mais investigações moleculares e funcionais, cujo objetivo seja verificar a ação sistêmica da toxina botulínica, sobretudo no tecido hepático e renal, além de propor mais um parâmetro de segurança para a toxina a partir do ponto de vista deste trabalho. É pouco é descrito na literatura sobre os possíveis efeitos toxicológicos produzidos pela toxina botulínica em ensaios pré-clínicos e clínicos, em órgãos vitais como fígado e rim. Considerando o interesse em obter-se medicamentos eficazes, porém seguros para a população, é necessário ampliar os estudos que verifiquem a toxicidade da BTX-A em órgãos vitais do organismo, sobretudo quando o tratamento requerer doses repetidas verificando toxicidade subcrônica e crônica. Isto infere em implicações importantes para a compreensão do mecanismo de ação da droga, como para dá subsídios e segurança para o profissional, devendo estar presente no julgamento ao prescrever a toxina botulínica tipo A para o tratamento de sialorreia e outras condições clínicas.

Referências

- Adebayo, J.O., Yakubu, M.T., Egwim, E.C., Owoyele, V.B., Enaibe, B.U., 2003. Effect of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters of rat kidney. *J Ethnopharmacol.* 88, 69-72. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00193-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00193-4).
- Al-Habori, M., Al-Aghbari, A., Al-Mamary, M., Baker, M., 2002. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. *J Ethnopharmacol*, 83(3), 209-217. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00223-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00223-4).
- Almeida, T.L.A.C., Santos, K.K.F., Vaz, S.G., Silva, R.B.P., Texeira, M.N., Rêgo, E.W., Manso Filho, H.C., 2012. Efeito do tratamento hemodialítico sobre as concentrações de uréia e creatinina em cães com síndrome de insuficiência renal crônica. *Ciênc. vet. tróp.* 15, 32-40.

Bachur, T., Veíssimo, D., Souza, M., Vasconcelos, S., Sousa, F., 2009. Toxina Botulínica: de Veneno a Tratamento. *Revista Eletrônica Pesquisa Médica*. 3, 9-19.

Bhayani, M.K., Suskind, D.L., 2008. The use of botulinum toxin in patients with sialorrhea. *Oper. tech. otolaryngol. - head neck surg.* 19(4), 243-247. <http://dx.doi.org/10.1016/j.otot.2008.10.008>.

BOTOX®. [Bula]. Bula para o profissional de Saúde. 32 f. Farmacêutico Responsável: Dra. Elizabeth Mesquita – CRF/SP nº 14.337. Westport, Irlanda: Allergan Pharmaceuticals Ireland, 2015.

Carneiro, P.G., Brandão, D.B., Barca, F.A. Zanluchi, A.T., Grecco, F.C.A., Okano, W., Cunha Filho, L.F.C., Patelli, T.H.C., 2014. Efeitos do nitroxinil 34% administrado em ratos (*Rattus norvegicus albinus*) no perfil hepático e renal. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, 08(2), 287-296.

Ceneviva, R., Vicente, Y.A.M.V.A., 2008. Equilíbrio hidroeletrólítico e hidratação no paciente cirúrgico. *Medicina*, 41(3), 287-300. <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v41i3p287-300>.

Cheng, A.S., Newall, A., 2003. Control of Oral Secretions in Bulbar Amyotrophic Lateral Sclerosis Using Botulinum Toxin Type A: A Pilot Study and Safety Trial. *Arch Phys Med Rehabil.* 84, A33. [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-9993\(03\)00711-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-9993(03)00711-1).

Cheng, L.W., Stanker, L.H., Henderson Li, T.D., Lou, J., Marks, J.D., 2009. Antibody Protection against Botulinum Neurotoxin Intoxication in Mice. *Infect Immun.* 77(10), 4305-4313. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00405-09>.

Cortés-Monroy, C., Soza, S., 2014. Usos prácticos de la toxina botulínica en adultos en medicina física y rehabilitación. *Re Med. Clin. Condes*, 25(2), 225-236. [http://dx.doi.org/10.1016/S0716-8640\(14\)70033-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0716-8640(14)70033-1).

Costa, J.P., Lourenço, N.V., Santos, C.C.M., Tomé, A.R., Sousa, G.F., Sousa, D.P., Almeida, R.N., Freitas, R.M., 2012. Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 33(3), 421-428.

Eaton, D.C., Pooler, J. P., 2016. Fisiologia renal de Vander. 8ª ed. Porto Alegre: AMGH, 2016.

Ellies, M., Laskawi, R., Götz, W., Arglebe, C., Tormählen, G., 1999. Immunohistochemical and morphometric investigations of the influence of botulinum toxin on the submandibular gland of the rat. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 256(3), 148-152. <http://dx.doi.org/10.1007/s004050050129>.

Field, A.P., 2009. *Discovering statistics using SPSS*. London, England: SAGE.

Funchal, C., Mascarenhas, M., Guedes, R., 2011. *Correlação clínica e técnicas de uroanálise: teoria e prática*. 2ª ed. Porto Alegre: Sulina, Porto Alegre: Editora Universitária Metodista IPA.

Giknins, M.L.A., Clifford, C.B., 2006. *Clinical Laboratory Parameters for Crl:CD(SD) Rats*. Charles River Laboratories. Available in

<http://www.criver.com/files/pdfs/rms/cd/rm_rm_r_clinical_parameters_cd_rat_06.aspx>. [Accessed in 25 Mar. 2015].

Gok, G., Cox, N., Bajwa, J., Christodoulou, D., Moody, A., Howlett, D.C., 2013. Ultrasound-guided injection of botulinum toxin A into the submandibular gland in children and young adults with sialorrhoea. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 51(3), 231-233. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjoms.2012.07.012>.

Gonçalves, A.A.B., Silva, K.S.M., Faial, K., Araújo, L.L., 2010. Perfil Bioquímico das Colônias de Roedores Produzidos pelo SACPA/IEC/SVS/MS. Anais do 8º Seminário Anual de Iniciação Científica e 2º Seminário de Pesquisa da UFRA. 20 a 22 de outubro de 2010. Available in <<http://www.pibic.ufra.edu.br/attachments/article/141/Alexandra%20Ariadine%20Bittencourt%20Gon%C3%A7alves.pdf>>. [Accessed in 07 Jul. 2015].

González, F.H.D, Silva, S.C., 2006. Introdução à bioquímica clínica veterinária. 2ª ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS.

Guyton, A.C., Hall, J.E., 2011. Guyton & Hall: Tratado de Fisiologia Médica. 12ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier.

Harris, E.H., 2005. Elevated liver function tests in type 2 diabetes. *Clin Diabetes.* 23(3), 115-119. [10.2337/diaclin.23.3.115](https://doi.org/10.2337/diaclin.23.3.115).

Hofmeister, R., Bhargava, A.S., Günzel, P., 1986. Value of enzyme determinations in urine for the diagnosis of nephrotoxicity in rats. *Clin Chim Acta.*,160(2), 163-167. [http://dx.doi.org/10.1016/0009-8981\(86\)90138-5](http://dx.doi.org/10.1016/0009-8981(86)90138-5).

Johnson, E.A., Bradshaw, M., 2001. *Clostridium botulinum* and its neurotoxins: a metabolic and cellular perspective. *Toxicon.* 39(11), 1703-1722. [http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00157-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00157-X).

Kaplan, L., Pesce, A., 2009. Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation. 5th ed. Sant Louis: Mosby Elsevier.

Kerr, M.G., 2003. Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária. Bioquímica Clínica e Hematologia. 2ª edição. São Paulo: Editora Roca.

Koepfen, B.M., Stanton, B.A., 2009. Berne e Levy: Fisiologia. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier.

Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Aster, J.C., 2010. Robbins & Contran – Patologia: Bases Patológicas das Doenças. 8ª ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier.

LABTEST – Laboratório Diagnóstica S.A. [Bula]., 2012. Uréia UV Liquiform Vet - Instruções de Uso (Ref.: 1013). Labtes Diagnóstica S.A. Lagoa Santa (MG).

Lebeda, F.J., Cer, R.Z., Stephens, R.M., Mudunuri, U., 2010. Temporal characteristics of botulinum neurotoxin therapy. *Expert Rev Neurother.* 10, 93-103. <http://dx.doi.org/10.1586/ern.09.134>.

- Levitt, D.G., Levitt, M.D., 2016. Human serum albumin homeostasis: a new look at the roles of synthesis, catabolism, renal and gastrointestinal excretion, and the clinical value of serum albumin measurements. *Int J Gen Med.* 9, 229-255. <http://dx.doi.org/10.2147/IJGM.S102819>.
- Lowe, J.S., Anderson, P.G., 2016. Stevens & Lowes: *Histologia Humana*. 4ª ed. [tradução] Rio de Janeiro: Editora Elsevier.
- Martínez, P.P., Carvalho, M.B., 2010. Participação da excreção renal de cálcio, fósforo, sódio e potássio na homeostase em cães saudáveis e cães com doença renal crônica. *Pesq. Vet. Bras.*, 30(10), 868-876. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2010001000010>.
- Mendes, M.R., Zabeu, J.S., Caldana, M.L., Berretin-Félix, G., Brasolotto, A.G., 2010. Botox e atuação interdisciplinar. *Pet Informa*, 23(3/4), 26-31.
- Meyer, D.J., Coles, E.H., Rich, L.R., 1995. *Medicina de laboratório veterinária: interpretação e diagnóstico*. 1ª ed. São Paulo: Roca.
- Miller, O., Gonçalves, R.R., 2001. *Laboratório para o clínico*. 8ª ed. São Paulo: Editora Arheneu.
- Motta, V.T., 2003. *Bioquímica Clínica para o Laboratório: princípios e interpretações*. 4ª ed. São Paulo: Editora Robe.
- Nantel, A.J., World Health Organization (WHO), 2002. *Internacional Programme on Chemical Safety (IPCS). Poisons Information Monograph 858. Bacteria*. Geneva: World Health Organization (WHO), 1-32. Available in <http://www.who.int/csr/delibepidemics/clostridiumbotulism.pdf> or <http://www.inchem.org/documents/pims/bacteria/pim858.htm>. [Accessed in 25 Feb. 2016].
- Ravichandran, E., Gong, Y., Al Saleem, F.H., Ancharski, D.M., Joshi, S.G., Simpson, L.L., 2006. An initial assessment of the systemic pharmacokinetics of botulinum toxin. *J Pharmacol Exp Ther.* 318(3), 1343-1351. <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.106.104661>.
- Rodwell, V.W., Bender, D.A., Botham, K.M., Kennelly, P.J., Weil, P.A., 2015. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 30th ed. Columbus, OH (USA): McGraw-Hill Education/Medical.
- Sampaio, C., Costa, J., Ferreira, J.J., 2004. Clinical comparability of marketed formulations of botulinum toxin. *Mov. Disord.* 19(suppl.8), S129-S136. <http://dx.doi.org/10.1002/mds.20066>.
- Schantz, E.J., Johnson, E.A. 1992. Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. *Microbiol Rev.* 56, 80-99. PMID: PMC372855.
- Schinoni, M.I., 2006. Fisiologia Hepática. *Gaz. Méd.* 76(supl.1), S5-S9.
- Silva, A.C.S., Lima, C.J.C.A., Souto, M.F.O., 2007. Acidose Tubular Renal em Pediatria. *J Bras Nefrol.* 29, 38-47.
- Silva, J.N.F., 2012. Master Thesis. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto, Portugal. A aplicação da Toxina Botulínica e suas complicações.

Silva, N.A., 2013. Master Thesis. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. Estudo dos efeitos renais da peçonha do escorpião *Tityus stigmurus* (THORELL, 1876) (Scorpiones: Buthidae) em perfusão de rim isolado de ratos.

Silva, P., 2010. Farmacologia. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Simpson, L., 2013. The life history of a botulinum toxin molecule. *Toxicon*. 68, 40-59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.02.014>.

Sposito, M.M.M., 2004. Toxina botulínica tipo A – propriedades farmacológicas e uso clínico. *Acta Fisiátr*. 11(supl.1), S7-S44.

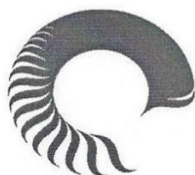
Teixera, M.A., Chaguri, L.C.A.G., Carissimi, A.S., Souza, N.L., Mori, C.M.C., Gomes, V.M.W., Poli-Neto, A., Nonoyama, K., Merusse, J.L.B., 2000. Hematological and biochemical profiles of rats (*Rattus norvegicus*) kept under microenvironmental ventilation system. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 37(5). <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-95962000000500001>.

Teixeira, L.T.A., Júnior, L.S.S., Queiroz, F.M., Oliveira, C.N., Schwarz, A., 2009. Avaliação de efeitos toxicológicos e comportamentais da *Hypericum perforatum* da *Piper methysticum* em ratos. *Rev. bras. toxicol.* 22(1/2), 42-49.

Thapa, B.R., Walia, A., 2007. Liver function tests and their interpretation. *Indian Journal of Pediatrics*. *Indian J Pediatr.* 74(7), 663-671. <http://dx.doi.org/10.1007/s12098-007-0118-7>.

Tolosa, E.M.C., Rodrigues, C.J., Behmer, O.A., Freitas Neto, A.G., 2003. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2ª ed. Editora Manoele Ltda. Barueri, São Paulo.

Zhang, Y., Varnum, S.M., 2012. The receptor binding domain of botulinum neurotoxin serotype C binds phosphoinositides. *Biochimie*, 94, 920-923. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2011.11.004>.

ANEXO I – Primeiro 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, 9 de outubro de 2014.

Ofício nº 58/14

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Profª. Liriane Baratella Evencio**

Departamento de Histologia

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.023152/2014-14

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, **“Efeito do tratamento com toxina botulínica tipo A em glândulas submandibulares de ratos: Análise morfológica, microbiológica e imunohistoquímica”**.

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; Animal: ratos; Idade: 30 dias;
Peso: 150-200g; Sexo: fêmeas; Número total de animais
previsto no protocolo: 60.

Atenciosamente,

 Profª Marcia Vasconcelos
Vice-Presidente do CEUA/CCB-UFPE
SIAPE 2199635

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

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

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, 16 de março de 2017.

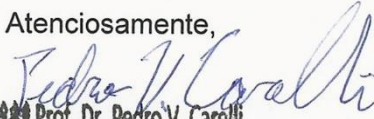
Ofício nº 11/17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: Prof. Liriane Baratella Evencio
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº **23076.023152/2014-14**

Certificamos que a proposta intitulada “**Efeito do Tramento com Toxina Botulinica Tipo A no Complexo Submandibular-Sublingual de Ratos: Análise Morfológica, Microbiológica, Bioquímica e Imunohistoquímica**”, registrada com o nº **23076.023152/2014-14** sob a responsabilidade de Prof.º **Liriane Baratella Evencio** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 08/03/2017.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	
Espécie/linhagem/raça	Ratos Wistar
Nº de animais	60
Peso/Idade	150-200g 30 dias
Sexo	Femea
Origem	Biotério de Depto de Nutrição

Atenciosamente,


Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
UFPE SIAPE 1801584