

LUCIANA SILVA REGUEIRA

EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TOXINA BOTULÍNICA EM
GLÂNDULAS SALIVARES DE RATAS: ANÁLISES HISTOLÓGICAS,
MICROBIOLÓGICAS E IMUNOISTOQUÍMICAS

Recife – PE

2017

LUCIANA SILVA REGUEIRA

EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TOXINA BOTULÍNICA EM GLÂNDULAS
SALIVARES DE RATAS: ANÁLISES HISTOLÓGICAS, MICROBIOLÓGICAS E
IMUNOISTOQUÍMICAS

Tese apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em
Odontologia do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal de
Pernambuco como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutora em
Odontologia área de concentração em
Clínica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez
Co-orientadora: Profa. Dra. Liriane Baratella
Evêncio

Recife – PE

2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- R344e Regueira, Luciana Silva.
Efeitos do tratamento crônico com toxina botulínica em glândulas salivares de ratas: análises histológicas, microbiológicas e imunoistoquímicas / Luciana Silva Regueira. – 2017.
77 f.: il.; tab.; 30 cm.
- Orientador: Danyel Elias da Cruz Perez.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Pós-graduação em Odontologia. Recife, 2017.
Inclui referências e anexos.
1. Toxinas Botulínicas tipo A. 2. Glândulas Salivares. 3. Ratos Wistar.
4. Microbiologia. I. Perez, Danyel Elias da Cruz (Orientador). II. Título.
- 617.6 CDD (22.ed.) UFPE (CCS2017-315)

LUCIANA SILVA REGUEIRA

EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TOXINA BOTULÍNICA EM GLÂNDULAS
SALIVARES DE RATAS: ANÁLISES HISTOLÓGICAS, MICROBIOLÓGICAS E
IMUNOISTOQUÍMICAS

Aprovada em 02/02/2017

ORIENTADOR: Prof. Dr. DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ
CO ORIENTAÇÃO: Prof^a Dr^a LIRIANE BARATELLA EVÊNCIO

Banca examinadora

5º _____

Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez (examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

4º _____

Prof^a Dr^a Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho (examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

3º _____

Prof^a Dr^a Andrea dos Anjos Pontual (examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

2º _____

Prof^a Dr^a Luciana Maria Silva de Seixas Maia (examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco

1º _____

Prof. Dr. Fábio de Souza Mendonça (examinador externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Profa. Dra. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Prof^a. Dr^a. Alessandra Albuquerque Tavares de Carvalho

COLEGIADO

Prof^a. Dr^a. Alessandra Albuquerque Tavares de Carvalho

Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes

Prof^a. Dr^a. Andrea Cruz Camara

Prof^a. Dr^a. Andrea dos Anjos Pontual

Prof. Dr. Arnaldo de França Caldas Júnior

Prof^a. Dr^a. Bruna de Carvalho Farias Vajgel

Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar

Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Prof^a. Dr^a. Flavia Maria de Moraes Ramos Perez

Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Prof^a. Dr^a. Jurema Freire Lisboa de Castro

Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Prof^a. Dr^a. Maria Luiza dos Anjos Pontual

Prof^a. Dr^a. Renata Cimões Jovino Silveira

SECRETARIA

Oziclere Sena de Araújo

Dedico esse trabalho aos meus queridos pais Rose Regueira e Luiz Carlos Regueira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas graças e oportunidades concedidas e por ser sempre meu guia.

Aos meus pais, minha irmã e toda família pelo apoio constante, conselhos e pelo mais puro amor que eu sempre recebi e que foram fundamentais nas minhas conquistas.

Ao meu noivo Gabriel Perrusi pelo amor, torcida, compreensão e ajuda em todo momento.

Agradeço à Universidade Federal de Pernambuco, na pessoa do reitor Anísio Brasileiro de Freitas Dourado pela oportunidade e incentivo na área acadêmica.

A Propesq pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

Ao meu orientador Prof. Danyel Elias da Cruz Perez que me acolheu como orientanda e compartilhou seu conhecimento com imensa dedicação, muito obrigada pela contribuição no projeto, são pequenos gestos de grandes mestres que nos guiam na formação acadêmica e, sem dúvida, me espelharei no senhor para isso.

A minha co orientadora Liriane Baratella Evêncio. Liri, a você que me acompanhou desde o segundo período da graduação, ininterruptamente, até o doutorado, sempre me orientando, me ensinando da ciência às lições da vida, a você que torce e celebra minhas conquistas como uma mãe, a você que é meu maior exemplo de mestre eu dedico toda a minha gratidão e meu amor.

A minha equipe do dia a dia Jaciel Oliveira, Priscilla Suellen, Gabriela Valença, Juliana Cristina e Rair por todos os sufocos e alegrias que passamos juntos em prol das nossas pesquisas.

Aos professores Adriana Fontes, Célia Castro, Almir Wanderley, por disponibilizarem laboratórios para os procedimentos experimentais da pesquisa e compartilharem conhecimentos necessários para delinear a metodologia, a ajuda de cada

um agregou conhecimento técnico e científico e foi fundamental para o andamento do projeto.

Aos doutorandos Caroline Guimarães D'assunção, doutoranda do programa de pós-graduação em Biociência Animal (PPGBA-URFPE) e Paulo Euzébio Cabral Filho, do departamento de biofísica (CCS-UFPE), que me ajudaram na execução das reações de imunohistoquímicas e fotografias em microscópio de fluorescência.

A Sylvania Paz e Rogério Clericuzi pela ajuda na confecção das lâminas.

A toda equipe de Odontologia do IMIP em nome da Dra Verônica Kozminsky pelo carinho, pela torcida e pelo apoio constante durante a execução da pesquisa.

A toda equipe do biotério de cirurgia experimental da UFPE em especial a Sr. Paulo pela atenção e dedicação no tratamento dos animais.

Aos meus colegas do doutorado pela amizade que construímos e ajuda constante. As minhas amigas pelos conselhos, apoio e carinho que dão forças para seguir em frente.

A todos que participaram dessa conquista, meu sincero agradecimento.

“Muitas vezes as pessoas
são egocêntricas, ilógicas e insensatas.
Perdoe-as assim mesmo.
Se você é gentil,
as pessoas podem acusá-lo de interesseiro.
Seja gentil assim mesmo.
Se você é um vencedor,
terá alguns falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros.
Vença assim mesmo.
Se você é honesto e franco,
as pessoas podem enganá-lo.
Seja honesto e franco assim mesmo.
O que você levou anos para construir,
alguém pode destruir de uma hora para outra.
Construa assim mesmo.
Se você tem paz e é feliz,
as pessoas podem sentir inveja.
Seja feliz assim mesmo.
O bem que você faz hoje,
pode ser esquecido amanhã.
Faça o bem assim mesmo.
Dê ao mundo o melhor de você,
mas isso pode não ser o bastante.
Dê o melhor de você assim mesmo.
Veja você que, no final das contas,
é tudo entre você e Deus.
Nunca foi entre você e os outros.”

(Madre Tereza de Calcutá)

RESUMO

O estudo teve como objetivo analisar o impacto do tratamento repetido com a toxina botulínica tipo A na estrutura glandular e na microbiota oral de ratas. Utilizou-se 35 ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), divididas em três grupos: o grupo C (controle, n=7), onde os animais não sofreram nenhuma intervenção; o grupo G (n=14), submetido à injeção intraglandular com o estabilizante da toxina botulínica tipo A que é a gelatina bovina; e o grupo B (n=14) tratado com 2.5U de BoNT-A (Prosigne®, Cristália, SP, Brasil). Os grupos tratados receberam três aplicações no complexo submandibular-sublingual, intervaladas a cada 35 dias. Os grupos G e B foram subdivididos em 2 subgrupos de acordo com o dia da eutanásia: 12 e 35 dias após o fim do tratamento, datas em que os espécimens glandulares foram coletados para proceder às análises histométricas, relativas à área dos ácinos e espessura dos ductos estriados, e às análises imunoistoquímicas com marcação para calponina, actina músculo-específica e análise da apoptose pelo método TUNEL. Antes e após 12 dias do tratamento, a microbiota oral da região sublingual foi coletada para quantificação das Unidades Formadoras de colônias (UFCs) e caracterização geral dos gêneros bacterianos. Através dos testes de Mann-Whitney e de Wilcoxon, verificou-se uma diminuição da área acinar mucosa e serosa com aumento do espaço intersticial no grupo B após 12 dias do tratamento, tais características foram constatadas em menor grau após 35 dias. Ainda no grupo analisado após 12 dias, as imunomarcações sugerem uma ação da BoNT-A na diminuição de células mioepiteliais da região acinar serosa além de evidências de apoptose. Não houve diferença estatisticamente significativa na contagem de UFCs nem no padrão da colonização bacteriana dos animais. A aplicação repetida de BoNT-A provocou alterações histológicas em glândulas submandibulares de ratos após 12 e 35 dias com aparente caráter reversível. No entanto, não foi capaz de alterar a microbiota oral dos animais. Os resultados evidenciam a segurança no uso crônico da BoNT-A no complexo submandibular-sublingual de ratas.

Palavras-chave: Toxinas botulínicas tipo A. Glândulas salivares. Ratos Wistar.

Microbiologia.

ABSTRACT

The aim of the study was to analyze the impact of repeated treatment with botulinum toxin type A on the glandular structure and oral microbiota of rats. Thirty five Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) were divided into three groups: group C (control, n = 7), where the animals were not treated; The G group (n = 14) underwent intraglandular injection with the botulinum toxin type A stabilizer which is bovine gelatin; and group B (n = 14) treated with 2.5U botulinum toxin type A (Prosigne®, Cristália, SP, Brazil). The treated groups received three applications in the submandibular-sublingual complex, intervals every 35 days. Groups G and B were subdivided into 2 subgroups according to day of euthanasia: 12 and 35 days after the end of treatment, dates on which glandular specimens were collected for histometric analyzes, related to the area of the acini and thickness of the and to immunohistochemical analyzes with labeling for calponin, muscle-specific actin, and apoptosis analysis by the TUNEL method. Before and after 12 days of treatment, the oral microbiota of the sublingual region was collected for quantification of Colony Forming Units (CFUs) and general characterization of bacterial genera. The Mann-Whitney and Wilcoxon tests showed a decrease in the mucosal and serous acinar area with increase of the interstitial space in group B after 12 days of treatment. These characteristics were found to a lesser degree after 35 days. The immunolabels suggest an action of BoNT-A on the decrease of serous portion myoepithelial cells and evidences of apoptosis only in group B after 12 days of treatment. There was no statistically significant difference in the CFU counting nor in the bacterial colonization pattern of the animals. Repeated application of BoNT-A caused histological changes in rat submandibular-sublingual complex after 12 and 35 days with reversible character. However, it was not able to alter the rat oral microbiota.

Key words: Botulinum Toxins type A. Salivary Glands. Rats, Wistar. Microbiology.

LISTA DE ABREVIATURAS

TUNEL - Terminal Deoxynucleotidyl Transferase mediated dUTP nick and labeling assay.

BoNT - Neurotoxina botulínica

BoNT-A - Neurotoxina botulínica tipo A

AQP-5 - Aquaporina 5

SNARE - soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor

VAMP - Proteína de membrana asociada a vesícula

SNAP- 25 - Synaptosomal-Novel-Associated-Protein de 25kDa

Kda - Kilodaltons

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotomicrografias de glândulas submandibulares de ratas coradas em HE.

(A) ácinos mucosos do grupo controle; (B) ácinos mucosos do grupo B-12 com setas amarelas mostrando conteúdo intersticial fibrótico; (C), ácinos mucosos do grupo B-35; (D) ácinos serosos do grupo B-12 com asteriscos mostrando a presença de ductos granulosos desintegrados; (E e F): ácinos mucosos e serosos respectivamente do grupo B-12 evidenciando pontos de apoptose nas setas verdes. Barras A, B e C = 100µm, D=200 µm, E e F= 28 µm.

Figura 2: Imunomarcação para Actina HHF-35 e calponina Fotomicrografias evidenciando menos marcação de células mioepiteliais com maior evidência nos ácinos serosos do grupo B-12 em comparação com os grupos C e B-35. Barra equivalente a 100µm.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias e desvio padrão da área dos ácinos e espessura do ducto dos subgrupos B12 x B35 e G12 x G35.

Tabela 2 – Comparação da média e desvio padrão dos ácinos e ductos entre os grupos C, G e B.

Tabela 3 – Comparação da quantidade de UFCs entre grupos tratados e controle e entre tratados BTXA e Gelatina

Tabela 4 – Comparativo da quantidade de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) por subgrupo antes e após 12 do tratamento

Tabela 5 – Percentual bacteriano dos grupos tratados e controle antes e após 12 dias do tratamento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4	ARTIGO: EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TOXINA BOTULÍNICA EM GLÂNDULAS SALIVARES DE RATAS: ANÁLISES HISTOLÓGICAS, MICROBIOLÓGICAS E IMUNOISTOQUÍMICAS.....	33
5	CONCLUSÃO.....	59
6	REFERÊNCIAS.....	60
	ANEXO A - CARTA DO COMITÊ DE ÉTICA.....	68
	ANEXO B - NORMAS DA REVISTA ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY.....	69

1 INTRODUÇÃO

Histologia e fisiologia do complexo submandibular-sublingual

Em ratos, as glândulas submandibular e sublingual formam uma estrutura integrada chamada de complexo submandibular-sublingual, onde, sob análise microscópica, percebe-se que a glândula submandibular é composta principalmente por células serosas, enquanto que as glândulas sublinguais, tanto de roedores como de humanos, são mistas e apresentam células mucosas associadas a meias luas serosas. O tecido conectivo limítrofe entre o tecido sublingual e submandibular é de fácil identificação e inclui nervos parassimpáticos do gânglio submandibular¹.

Assim como nos humanos, as glândulas submandibulares e sublinguais de ratos apresentam-se envoltas por um tecido conjuntivo frouxo que adentra no parênquima glandular formando septos, os quais dividem a glândula em lóbulos. Cada lóbulo é composto de um conjunto de porções secretoras denominadas ácinos, as quais estão conectadas a um sistema de ductos².

O desenvolvimento do complexo submandibular-sublingual, em ratos, envolve uma maturação progressiva dos ácinos e ductos. Inicia-se na primeira semana do desenvolvimento, onde os ácinos não são discriminados claramente, mas o sistema de ductos já está bem desenvolvido evidenciando os tipos intercalares, estriados, granuloso e excretores. Aos três meses de vida, a glândula se apresenta com maturação finalizada³. Os ácinos são compostos de células piramidais com núcleos basais e apresentam citoplasma com ribossomos, pequenas mitocôndrias, complexo de Golgi, esporádicas partículas de glicogênio e numerosos grânulos de secreção. O sistema de ductos se inicia com o ducto intercalar que está diretamente ligado a vários ácinos. Os ductos intercalares são revestidos por células epiteliais achatadas ou cúbicas e apresentam estreito calibre, por isso são de difícil visualização em glândulas adultas⁴. O ducto intercalar torna-se contínuo de forma abrupta com o elemento seguinte, o ducto granuloso⁵. A formação dos ácinos coincide com o aparecimento de túbulos granulares, o que leva a uma sugestão de que esta estrutura possa estar relacionada com a secreção da glândula submandibular do rato⁶.

O ducto granuloso ou túbulo granular convoluto é uma estrutura característica da glândula submandibular de roedores, que apresenta células colunares altas preenchidas com numerosos grânulos eosinofílicos. Localizam-se entre os ductos intercalares e estriados e apresentam acentuadas atividades de desidrogenases succínicas, lácticas e málicas em grânulos formados irregularmente na porção basal. Os ductos granuloso

possuem três tipos celulares, células estreitas densas, células granulares claras e células granulares escuras, todas com a sua porção basal rica em mitocôndrias. As células de ducto granular sintetizam uma série de proteínas biologicamente ativas, tais como fator de crescimento epidérmico e fator de crescimento nervoso. Os ductos granulosos são altamente influenciáveis por ação de hormônios⁷. Estima-se um ganho de 14,9 micrometros cúbicos por dia no volume das células do ducto granular do dia 28 ao 96 de desenvolvimento do rato⁸.

O ducto estriado dá continuidade ao ducto granuloso e também apresenta alta atividade enzimática e grande quantidade de mitocôndrias, as quais estão envolvidas no bombeamento de íons para a secreção salivar⁹.

As células mioepiteliais derivam do ectoderma, apresentam características fenotípicas de células epiteliais e musculares e são formadas por um corpo celular associado a 4-8 prolongamentos, o que lhes confere a forma de polvo ou um cesto ao redor de ácinos e ductos intercalares. Devido a sua forma e à presença de actina específica de músculo e miofilamentos, a contração da célula mioepitelial provoca a diminuição do lúmen glandular, exercendo, assim, um papel estimulante na excreção da secreção. Além disso, a célula mioepitelial está envolvida na produção de proteínas para a membrana basal como fibronectina, lamininas e elastinas¹⁰. A presença de colinesterase e de junções gap nas células mioepiteliais suportam a hipótese de que estas células participam da propagação do estímulo neural¹¹. Estas células mioepiteliais, quando visualizadas na superfície dos ácinos, são estreladas devido aos vários processos celulares primários e secundários se estendendo da porção principal da célula. Nos ductos intercalares, aparecem como uma bainha circunferencial de células fusiformes na superfície externa dos ductos¹². Marcadores imunoistoquímicos com anticorpos para vimentina, calponina e actina músculo-específica são utilizados para identificação de células mioepiteliais em diversos estágios de diferenciação¹³.

As glândulas salivares recebem inervações parassimpáticas e simpáticas. Os nervos parassimpáticos liberam acetilcolina, que ativa os receptores muscarínicos para estimular a secreção de fluidos. Enquanto os nervos simpáticos controlam a salivação através da ativação dos receptores adrenérgicos α e β , que estimulam a secreção rica em fluidos e em proteínas, respectivamente¹⁴.

O mecanismo de secreção do fluido salivar ocorre nas células acinares e pode ser dividido em seis etapas sucessivas: (1) síntese, (2) segregação, (3) transporte intracelular, (4) concentração, (5) armazenamento intracelular e (6) descarga. A fase de síntese consiste da captação de aminoácidos para sintetizar proteínas secretoras, as quais

segregam-se dentro do retículo endoplasmático rugoso de onde são transportadas para o complexo de Golgi. A condensação e a maturação seguem-se após as proteínas secretoras atingirem os vacúolos de condensação e, como resultado de sua maturação, esses vacúolos convertem-se em grânulos de secreção. O armazenamento temporário de proteínas secretoras na célula ocorre dentro de grânulos de secreção. A acetilcolina (de neurônios parassimpáticos) e a substância P ligam-se a receptores de membrana e causam elevação aguda de cálcio, resultando na exocitose da proteína armazenada nos grânulos¹⁵. O transporte de íons e eletrólitos ocorre devido aos canais de íons expressos na região apical e basal das membranas das células secretoras. Inicialmente, se produz um meio concentrado através de transporte iônico na direção secretória. Uma vez formado o gradiente osmótico, promove-se o movimento transcelular de água através da aquaporina 5 (Aqp5), o maior canal de água expresso na membrana apical de células acinares secretoras¹⁶. Esse fluido primário sofre modificações durante o seu percurso pelo sistema de ductos, os quais são responsáveis por adicionar enzimas de propriedades antimicrobianas e também por bombear íons deixando a saliva mais hipotônica. Mais de 90% da secreção salivar não estimulada é produzida pelas principais glândulas salivares: 20% das glândulas parótidas, 65% das submandibulares, 7-8% dos sublinguais e aproximadamente 10% das glândulas salivares menores¹⁷.

Saliva e microbiota oral

Em geral, a quantidade de saliva na boca após a deglutição é cerca de 0,4 a 1,4ml, não apenas de secreção glandular, mas também de substâncias advindas do fluido crevicular. Essa saliva residual forma o biofilme sobre os dentes e uma película rica em proteínas na superfície da mucosa oral¹⁸. Além de ter 99% de água, a composição da saliva engloba vitaminas, hormônios, proteínas, amilase e íons como sódio, cloro e bicarbonato, que influenciam diretamente o pH salivar e o processo de desmineralização dos dentes¹⁹. Estes componentes variam de acordo com o fluxo salivar. Geralmente, um ligeiro aumento na taxa de secreção conduz a um aumento de sódio, bicarbonato e pH, e uma diminuição de potássio, cálcio, fosfato, cloreto, ureia e proteínas²⁰.

A saliva contempla também o ambiente microbiano oral, que é composto por mais de 700 espécies de bactérias, as quais colonizam de forma diferenciada cada tipo de superfície encontrada na cavidade oral²¹. Nos dentes, os microrganismos colonizam-se na forma de biofilme, estruturas complexas com uma variedade microbiana diferenciada. A microbiota do biofilme subgengival é caracterizada pela frequência maior de bactérias

anaeróbicas obrigatórias como *fusobacterium*, *prevotella* e *treponema*. Em contraste, os grupos mais frequentes na área supragengival incluem os gêneros anaeróbicos facultativos como *streptococcus*, *capnocytophaga*, *neisseria*, *haemophilus*, *leptotrichia*, *actinomyces*, *rothia*, *corynebacterium* e *kingella*²². Já a colonização da gengiva, palato, bochechas e assoalho bucal possui menos microrganismos e tem os estreptococos como gênero em maior proporção, com predominância das espécies *Streptococcus oralis* e *Streptococcus sanguis*. Os gêneros *neisseria*, *haemophilus* e *veillonella* também foram isolados²³. A língua apresenta uma maior diversidade e densidade bacteriana por célula epitelial, assemelhando-se a população bacteriana da saliva²⁴. Além das conhecidas bactérias envolvidas na patogênese da cárie e doença periodontal, a saliva também apresenta bactérias de doenças sistêmicas quando em seu estado agudo, tais como *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pyogenes* e *Helicobacter pylori*. Da mesma forma, vírus podem ser detectados na saliva como o herpesvírus, papiloma vírus e vírus da hepatite C²⁵.

Enquanto a saliva mucosa desempenha papel importante na lubrificação da mucosa oral, a saliva fluida serosa é rica em substâncias bactericidas, tais como tiocianato, enzimas proteolíticas (lisozima, amilase) e anticorpos. Portanto, a alteração do fluxo salivar interfere diretamente na colonização bacteriana e sua consequente patogênese²⁶.

Radioterapia anti-neoplásica, medicações sistêmicas, doenças neuromotoras entre outras desordens podem afetar o fluxo salivar, causando a xerostomia ou a sialorréia²⁷. A secura bucal pode apresentar-se como um sintoma ou sensação subjetiva (xerostomia), um sinal detectado através da medição do fluxo salivar (hipofunção das glândulas salivares) ou ambos. Seja qual for a causa, diversos sintomas e fatores de risco estão associados à secura bucal, tais como ardor, risco aumentado de sialodênite, ulceração oral e infecções como a cárie e candidíase oral. Além disso, a falta de lubrificação adequada da mucosa oral decorrente da redução do fluxo salivar, leva a disgeusia, disfagia, disfonia, erosões dentárias e dificuldade em adaptar próteses dentais²⁸.

A alteração do fluxo salivar também pode ocorrer na forma de sialorréia provocando uma maior quantidade de saliva na boca. A sialorréia pode ocorrer devido a uma dificuldade do manejo da saliva na boca ou devido a uma hipersecreção da mesma. Quando ela ultrapassa os quatro anos de idade geralmente é considerada patológica²⁹. Assim como na xerostomia, diversas causas podem estar associadas a sialorréia, tais como gestação³⁰, medicações³¹ e doenças neuromotoras³².

A expressão em inglês *drooling* foi traduzida para o português como escape de saliva e ao contrário do que frequentemente se interpreta, esse ato não consiste na maior

produção e secreção de saliva, mas na dificuldade de deglutição da mesma³³. Esse é um quadro preocupante presente na rotina de pacientes portadores de diversas doenças como doença de Parkinson³⁴, paralisia facial e cerebral³⁵, esclerose lateral amiotrófica³⁶, síndrome de Down³⁷ e outras desordens neuromusculares. Além do desconforto social, os pacientes que acumulam saliva podem apresentar rupturas periorais, infecções, dificuldade na fala e na alimentação e ocasionalmente sofrem com o desenvolvimento de complicações pulmonares por aspiração salivar³⁸.

Uso da Toxina Botulínica para controle do fluxo salivar

O tratamento para o escape de saliva envolve uma abordagem multidisciplinar para trabalhar a fala, postura, consciência oromotora e sensorial. Além disso, como a secreção salivar está sob o controle parassimpático, o tratamento farmacológico com anticolinérgicos foi introduzido primeiramente a fim de inibir a produção de saliva, com resultados positivos. Entretanto, diversos efeitos colaterais como boca seca, visão turva e retenção urinária foram relatados³⁹. A cirurgia para ressecção da glândula também constitui uma opção efetiva. Reduz cerca de 80% do fluxo salivar e está pouco associado a complicações orais, apesar de ser uma abordagem invasiva e irreversível⁴⁰.

Outra opção terapêutica surge com a aplicação intraglandular da neurotoxina botulínica (BoNT) em glândulas salivares. Estudos confirmam que o uso da toxina botulínica tipo A em injeções intraglandulares nas parótidas e submandibulares, guiadas ou não por ultrassonografia, levam a diminuição da secreção salivar, trazendo benefícios aos pacientes e familiares⁴¹. Apesar da duração limitada, a injeção intraglandular de toxina botulínica tipo A é um procedimento pouco invasivo, com efeitos colaterais discretos ou nulos, constituindo uma ótima alternativa de tratamento⁴².

A injeção de toxina botulínica em glândulas salivares de pacientes com tetraplegia mostrou uma melhora dos sintomas da sialorréia durante 3 meses. Os autores associam a terapia oromotora para estimulação da postura e mastigação involuntária com as injeções de BoNT⁴³.

As bactérias *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum* e *Clostridium baratii* juntas produzem os oito tipos de toxina botulínica encontrados na natureza (A-H). Apenas os sorotipos A e B são formulados para comercialização⁴⁴.

As toxinas botulínicas tipo A e B são formadas por cadeias peptídicas de 150 kilodaltons (Kda). A toxina se torna ativa no momento em que ocorre uma clivagem proteolítica seletiva da cadeia, formando dois braços ativos, um pesado de 100kDa e um

leve de 50kDa. A cadeia pesada liga-se especificamente ao gangliosídeo GT1b e a um receptor de superfície celular (SV2) nas terminações nervosas colinérgicas, permitindo sua absorção pela endocitose e promovendo a translocação da cadeia leve para o compartimento citosólico. Uma vez que a cadeia leve é internalizada na célula, sua atividade proteolítica agirá diretamente nas proteínas no complexo SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor), com especificidade a depender do sorotipo de cada toxina. A BoNT tipo B cliva a proteína de membrana associada a vesícula (VAMP), também conhecida como sinaptobrevina II. A BoNT tipo A cliva a proteína SNAP 25 (Synaptosomal-Novel-Associated-Protein de 25kDa). Seja qual for a proteína alvo do complexo SNARE, a consequência da clivagem proteica pela BoNT será a inibição da exocitose da acetilcolina na junção neuromuscular, o que ocasiona uma desnervação química funcional, reduzindo a contração com consequente diminuição da secreção salivar. BoNT não afeta diretamente a síntese ou o armazenamento da acetilcolina, apenas impede sua liberação⁴⁵.

Em junções neuromusculares, a liberação de neurotransmissores como a acetilcolina na transmissão sináptica ocorre tanto devido ao tráfico de vesículas como devido ao rearranjo do citoesqueleto de actina. Esses processos são dirigidos por membros da família Ras de GTPases de baixo peso molecular, nomeadamente Rho, Rac e Cdc42. Esta reorganização de actina em células neuronais é considerada um pré-requisito para a liberação de neurotransmissores a partir de neurónios pré-sinápticos. A via de sinalização RhoB regula a liberação de ACh via retinulação do citoesqueleto de F-actina e a toxina botulínica inibe a neuroexocitose por alterar a via RhoB ^{46, 47}.

Durante o período inibitório provocado pela BoNT-A, neurónios da glândula submandibular de ratos expressam níveis mais baixos do canal Aquaporina 5 (AQP5) sob a membrana celular. Isso porque ocorre uma translocação dessas proteínas para o interior do citoplasma. Uma vez que a AQP5 desempenha função importante no transporte de água nas células glandulares, pode-se afirmar que a diminuição do fluxo salivar acontece não apenas pela clivagem pré-sináptica de SNAP-25, mas também pela redistribuição pós-sináptica da AQP5^{48, 49}.

Além da ação sobre a acetilcolina, a toxina botulínica também interfere na liberação de outros neurotransmissores que são estocados em vesículas intracelulares, tais como adrenalina, noradrenalina, dopamina, glutamato, substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (PRGC). Esses três últimos são relacionados com o sintoma de dor⁵⁰.

O óxido nítrico vem sendo destacado como um possível neuromodulador vascular na regulação de processos secretores específicos no trato aerodigestivo superior⁵¹. Como

um indicador de atividade do óxido nítrico, a óxido nítrico sintase neuronal é um marcador importante nas placas nervosas terminais das glândulas salivares⁵². Dessa forma, além de transmissores de acetilcolina, outros neurotransmissores, como o neuromodulador óxido nítrico, também podem estar envolvidos na regulação da função da glândula salivar. A BoNT-A em glândulas submandibulares de ratas provocou a diminuição da óxido nítrico sintase, demonstrando outro meio de ação da toxina botulínica na diminuição da secreção salivar⁵³. Além disso, sabe-se que a toxina botulínica é capaz de danificar diretamente as mitocôndrias dos nervos, o que causa uma inibição primária das correntes de cálcio evocadas pela despolarização normal que acompanha a atividade do nervo. Como essas correntes normalmente fornecem o cálcio que desencadeia a secreção do transmissor do nervo, a demonstração de sua inibição ajuda a explicar o mecanismo de ação da toxina botulínica⁵⁴.

Quando a toxina botulínica é injetada em um músculo estriado, ocorre uma redução no diâmetro de suas fibras e, caso haja uma administração da droga por longo período, uma atrofia muscular pode acontecer, embora esta não possa ser apontada como efeito usual da BoNT. A literatura aponta uma semelhança na ação da BoNT nos músculos estriados e lisos dado a sua interferência no sistema nervoso autônomo. Entretanto, poucos relatos descrevem as consequências da BoNT na musculatura lisa⁵⁵.

A toxina botulínica tem alta afinidade aos terminais colinérgicos da membrana pré sináptica. Supõe-se que exista uma pequena distribuição sistêmica do produto após o uso de doses terapêuticas. A neurotoxina permanece com sua estrutura e atividade biológica inalterada na corrente sanguínea, sofre pouca biotransformação e não se acumula significativamente nas células em circulação⁵⁶. O fígado demonstrou ser o órgão que possui maior retenção com taxa entre 30 e 40% e no baço o acúmulo está entre 5 e 7%⁵⁷.

O efeito da toxina é temporário, pois os neurônios recomeçam a secretar a acetilcolina após 1 mês do tratamento. Após 3 meses estão totalmente funcionais⁵⁸. Acredita-se que a desnervação química induzida pela toxina estimula o crescimento de brotamentos axonais laterais. Por estes brotamentos nervosos, o tônus muscular é parcialmente restaurado. Com o tempo há o restabelecimento das proteínas de fusão e a involução dos brotamentos de modo que a junção neuromuscular se recupera⁵⁹. As neurotoxinas de sorotipo A e C são as que possuem maior tempo de ação. A duração do efeito depende de vários fatores da molécula como a cadeia pesada, a persistência da atividade proteolítica e a resistência à renovação natural através do sistema ubiquitina-proteossoma (UPS)⁶⁰.

O tempo de ação da toxina botulínica em glândulas salivares de adultos com

disfagia neurológica é em média de 5,6 meses, com uma variação de ± 1 mês⁶¹. Um estudo com 53 pacientes portadores da doença de Parkinson identificou um tempo médio de ação de 4,38 meses com variação de ± 2.11 e período de latência de $10,06 \pm 9,63$ ⁶². Através de escalas de avaliação do escape de saliva (Drooling Frequency and Severity Scale e Teacher Drooling Scale (TDS), foi avaliada a persistência do efeito da toxina botulínica em crianças com paralisia cerebral nos períodos de 1 semana, 1, 2, 4, 6, 9 meses após a aplicação. Os resultados demonstraram melhora estatisticamente significativa no quadro clínico em todos os períodos analisados⁶³. Entretanto, relatos com a média de 5 meses são mais comuns na literatura^{64, 65}.

Atualmente, existem de cinco tipos de toxina botulínica tipo A comercializadas, que diferem entre si quanto à natureza molecular: onabotulinumtoxinA (Botox, Allergan Inc., California, Estados Unidos), abobotulinumtoxinA (Dysport, Ipsen Ltd., Wrexham, UK), Neuronox (neu-BoNT/A, Medytox Inc., Cheonwon-gun, Coreia do Sul), incobotulinumtoxinA (Xeomin, Merz Pharmaceuticals, Frankfurt, Alemanha) e BTXA (Lanzhou Biological Products Institute, China). Apesar de serem neurotoxinas do mesmo sorotipo, as formulações comercializadas possuem compostos e processos de fabricação diferentes e, portanto, possuem indicações clínicas, tolerabilidade e dosagens específicas⁶⁶.

A maior parte dos relatos científicos que abordam o uso da toxina botulínica tipo A em glândulas salivares se reportam ao uso da formulação americana comercializada como BOTOX®, por ter sido a pioneira no mercado. Em 1988, o Lanzhou Institute of Biological Products introduziu a Lanzhou Botulinum Toxin type A com o nome de BTX-A®, a qual foi aprovada para uso no Brasil e fabricada pela empresa Cristália (São Paulo, SP) com o nome de Prosigne®. Apesar de apresentar eficácia clínica similar à formulação americana, a Prosigne® difere quanto ao método de fabricação, pois utiliza como estabilizante uma gelatina de origem bovina e não albumina humana, o que lhe confere maior toxicidade. Além disso, a Prosigne® tem um custo de 8 a 10 vezes menor que o BOTOX®, fator relevante dentro de uma terapia com aplicações repetidas⁶⁷.

Estudos sobre hiperidrose revelam equivalência na eficácia e segurança ao testar diversas formulações de BoNT tipo A⁶⁸. Relata-se, também, uma equivalência em tolerabilidade, segurança e eficácia entre as formulações Botox e Prosigne para o tratamento da distonia cervical, blefaroespasma, e espasmo hemifacial^{69, 70}. Porém, pouco se identifica na literatura relatos sobre a segurança da Prosigne em glândulas salivares.

A eficácia na redução do fluxo salivar obtida pela BoNT já é bem estabelecida na literatura. Os demais efeitos dessa neurotoxina nas glândulas devem ser alvo pesquisas.

O estudo de Reddingh et al. (2010) estabelece um consenso internacional sobre o uso da toxina botulínica em pacientes com escape de saliva e identifica pontos fracos na literatura relacionada. Os autores acreditam na possibilidade de haver efeitos a longo prazo após repetidas doses e ressaltam a necessidade de estudos detalhados nesse assunto⁷¹.

A aplicação de BoNT-A em crianças com paralisia cerebral demonstrou uma diminuição do tamanho da glândula, avaliado por tomografia computadorizada realizada antes e após 3 semanas da aplicação de toxina botulínica tipo A (Botox®, Allergan Inc., California, Estados Unidos)⁷². A diminuição do volume de glândulas parótidas após a aplicação da toxina botulínica é facilmente observada por tomografia computadorizada e confere uma redução média de 12% do volume. Por isso, este tratamento tem sido procurado como uma alternativa cosmética por pacientes que apresentam alargamento da parótida devido a distúrbios alimentares⁷³.

Uma avaliação morfométrica de glândulas submandibulares de ratas submetidas a aplicação a toxina botulínica tipo A (Botox, Allergan, USA) não evidenciou clara diferença estatística entre os grupos experimental e controle, embora o tratado apresentasse contagem de núcleos ligeiramente maior. As medidas morfométricas não revelaram alterações no volume de células acinares⁷⁴. O mesmo grupo de estudo avaliou a presença da acetilcolina em parótidas de ratas que receberam a BoNT-A e constatou uma fraca marcação entre o 7º e o 14º dia após a aplicação, enquanto que ao 28º dia a expressão desse neurotransmissor apresentou-se similar ao grupo controle⁷⁵.

Em ratas que receberam 2,5U de BoNT-A (BTXA, Lanzhou, China) na glândula submandibular direita, foi observada uma atrofia dos ácinos e ductos após 10 dias da administração de BTXA. No entanto, esse efeito não foi mais identificado após 30 dias do tratamento. No mesmo estudo, identificou-se a diminuição transitória de substância P nas glândulas tratadas com BTXA⁷⁶.

Uma investigação histopatológica e imaginológica por ultrassonografia da glândula submandibular de ratos submetidos a injeção com toxina botulínica tipo A da marca americana, verificou a diminuição nas glândulas tratadas pela BTX-A tanto na avaliação após 14 dias do tratamento como após 28 dias. No entanto, não foram encontradas alterações vasculares e nenhuma alteração histopatológica nas glândulas. Portanto, os autores concluíram que a droga utilizada não interfere na morfologia das células⁷⁷.

Outro estudo morfológico da glândula de ratos tratados com BoNT-A (Botox), revelou ácinos menores e com forma mais alongada, além de áreas basofílicas basais mais pronunciadas devido à presença de material secretório. O lúmen dos canais

estriados granulares estava mais largo do que nos controles, assim como a marcação imunoistoquímica para amilase salivar foi significativamente mais fraca. As características descritas indicam alterações compatíveis com atrofia das células e organelas das glândulas tratadas. As glândulas foram analisadas apenas após 14 dias da aplicação, sem análise do tratamento a longo prazo⁷⁸. Outras características identificadas em glândulas tratadas com a BoNT-A que sugerem sinais de atrofia são variações morfológicas do retículo endoplasmático rugoso, degeneração mitocondrial, vacúolos secretores com variação em tamanho, forma e densidade eletrônica, núcleo com forma irregular e cromatina finamente dispersa⁷⁹.

O BTXA foi responsável por provocar uma atrofia celular e diminuição do polipeptídeo vasoativo intestinal em parótidas de ratos. Esses efeitos foram pouco observados após sete dias da aplicação, sendo mais evidentes após 12 dias e inexistente após 35 dias. Sugeriu-se que, o período de 12 dias refere-se ao pico de ação da droga, ausentando-se o efeito após 35 dias em ratos⁸⁰.

Ao avaliar a expressão de apoptose em glândulas submandibulares de coelhos que receberam BTXA, poucas células apoptóticas foram evidenciadas em alguns lóbulos glandulares uma semana após a injeção. Foi observada maior proporção nas células ductais que nas células acinares. Na avaliação após 14 dias, tanto células acinares como ductais mostraram apoptose, mas esse número reduziu após quatro semanas da aplicação e quase desapareceu completamente 12 semanas após a injeção BTXA. Pela análise histológica, os ácinos se apresentaram menores, com acúmulo de grânulos e formação de tecido fibroso no local da injeção após 12 dias da aplicação. Porém, essas alterações morfológicas encontradas não foram vistas após 28 dias do tratamento⁸¹.

Repetidas aplicações de BoNT-A em glândulas submandibulares causaram atrofia glandular observada pela ultrassonografia. Dessa forma, a literatura sugere correlacionar os achados sobre a redução do tamanho da glândula com a ocorrência de alterações histológicas como a apoptose⁸². Os achados morfológicos até então descritos são decorrentes de análises após uma única aplicação da BoNT-A. Assim, existe uma carência de relatos morfológicos das glândulas após a repetição do tratamento.

Devido à escassez de estudos com esta formulação da toxina, sobretudo quanto aos efeitos na glândula e na microbiota oral a longo prazo, o presente estudo se propõe a contribuir no esclarecimento quanto a segurança e eficácia da ação da toxina botulínica tipo A (BTXA da Prosigne®, Cristália, São Paulo, Brasil) no complexo submandibular-sublingual de ratas, com o objetivo de respaldar sua indicação pelos profissionais que atuam nesta área.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Observar aspectos histológicos, histométricos e imunoistoquímicos do complexo submandibular-sublingual de ratas submetidas a repetidas aplicações de toxina botulínica tipo A, bem como estudar possíveis alterações na microbiota oral dos animais advindas do tratamento.

Objetivos Específicos

Em ratas que receberam repetidas aplicações de toxina botulínica tipo A no complexo submandibular-sublingual:

- a* – Avaliar as características histológicas da glândula, como celularidade, hipoplasia, hiperplasia, hipotrofia ou hipertrofia das células, presença ou não de infiltrado inflamatório, comparando com os grupos controle positivo e negativo.
- b* – Analisar, histometricamente, a área dos ácinos mucosos e serosos e a altura da parede dos ductos estriados, comparando com os grupos controle positivo e negativo.
- c*- Quantificar a área e medir a densidade óptica média da marcação para calponina e actina músculo-específica nas células mioepiteliais, comparando com os grupos controle positivo e negativo.
- d*- Observar a presença de morte celular programada comparando com o seu controle positivo e negativo.
- e*- Analisar a microbiota oral com relação a quantidade de Unidades formadoras de colônia e tipos bacterianos mais comuns, através do esfregaço na região sublingual dos animais, comparando com os grupos controle positivo e negativo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho do estudo

O estudo foi realizado no Biotério do Núcleo de Cirurgia Experimental, no Laboratório de Histologia da Pós Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), no Laboratório de Patologia Oral da UFPE e no laboratório de Microbiologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA). A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob o processo de número 23076.023152/2014-14 (Anexo 1).

Trata-se de um estudo do tipo experimental, descritivo, analítico quantitativo, utilizando 35 ratas (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) fêmeas, adultas e saudáveis da linhagem Wistar, com peso entre 200-340g, provenientes do Biotério do Departamento de Nutrição da UFPE. Para excluir influências hormonais, foram utilizadas ratas sexualmente maduras com idade média de 4-6 meses, segundo modelo experimental utilizado em estudos prévios^{74,76,77}. Os animais foram alimentados com dieta padrão para roedores (Presence® – Paulínia, São Paulo, SP, Brasil), onde obtiveram livre acesso à ração e água, mantidos em gaiolas de polipropileno com tampa de arame zincado com 4 animais, com temperatura de 23 +/- 2° C, respeitando o ciclo dia/noite de 12h cada, segundo a recomendação ética do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e do National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

Os animais foram aleatoriamente agrupados em três grupos de estudo: o grupo B (n = 14), tratado com injeção intraglandular de toxina botulínica do tipo A da marca Prosigne® (Cristália, São Paulo, SP, Brasil) no complexo submandibular sublingual do lado direito; o grupo G (n = 14), submetido à injeção intraglandular apenas com o estabilizante da Prosigne® (Cristália, São Paulo, Brasil), a gelatina de origem bovina (Gelita do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil); e o grupo C (n=14), que corresponde ao controle negativo, onde os animais não sofreram intervenção. Os grupos G e B foram subdivididos em dois subgrupos (n=7), de acordo com a data de eutanásia após o fim do tratamento, sendo de 12 dias (G12 e B12) ou 35 dias (G35 e B35), datas equivalentes ao pico de ação da droga na estrutura glandular de ratos e término desse efeito respectivamente⁸⁰.

Todas as intervenções nos animais foram realizadas em horário fixo às 7hrs no mesmo biotério onde eles estavam alojados.

Tratamento dos animais

Foram realizados treinamentos do método de injeção intraglandular por palpação utilizando-se tinta tipo nanquim em animais do biotério destinados à eutanásia. Para o estudo, cada animal do grupo G e B recebeu um total de 3 aplicações intervaladas a cada 35 dias, sendo o tempo de análise de cada subgrupo contado a partir do dia seguinte à última aplicação. Para a realização da injeção intraglandular, os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (10 mg/kg de peso – Ketamin®, Cristália, São Paulo, Brasil) e Cloridrato de xilazina (0,5 mg/kg de peso – Rompum®, Bayer, São Paulo Brasil), associados na mesma seringa e administrados por via intramuscular. Foi realizada antissepsia da região cervical dos animais com clorexidina 2% e, através do método de palpação, procedeu-se a injeção apenas no complexo submandibular-sublingual do lado direito. O lado esquerdo não foi utilizado como controle para descartar alterações histológicas decorrentes de uma possível hiperfunção em resposta a baixa produção de saliva pela glândula contralateral. A cada aplicação, os animais do grupo G receberam 0,25 mg de gelatina bovina (Gelita do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) diluída em 0,1 ml de cloreto de sódio a 0,9%. De igual forma, nos animais do grupo B, foram administradas 2,5U de toxina botulínica tipo A (Prosigne®, Cristália, China) reconstituída em 0,1 ml de solução de cloreto de sódio a 0,9 % por aplicação.

A dose de toxina botulínica utilizada no presente estudo foi escolhida após a realização de um estudo piloto testando dose e intervalos, onde avaliou-se a eficácia em diminuir a secreção salivar e a tolerância do animal após a repetição da dose, concluindo-se a dosagem de 2.5U em apenas uma glândula. A quantidade de gelatina bovina injetada corresponde a proporção de gelatina contida em um frasco de Prosigne® e fracionada para um animal.

Os animais foram eutanasiados após 12 dias (G12 e B12) ou 35 dias (G35 e B35) após o término tratamento, datas equivalentes ao pico de ação da droga e término desse efeito na estrutura glandular de ratos respectivamente.

Nas respectivas datas de cada subgrupo (12 e 35 dias após a última aplicação do medicamento), os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de xilazina e quetamina, conforme descrito anteriormente, para anteceder a antissepsia com clorexidina a 2%. A seguir, com auxílio de um bisturi de lâmina nº 15, realizou-se uma incisão cervical mediana, divulsão dos tecidos com tesoura de ponta romba, exposição do complexo submandibular-sublingual, e posteriormente sua excisão. Após o procedimento de colheita dos espécimes, os animais foram eutanasiados por overdose anestésica e o descarte realizado segundo as normas preconizadas pelo Colégio

Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Coleta e análise da microbiota

A coleta da microbiota oral foi realizada antes do início do tratamento e após 12 dias da terceira (última) aplicação em cada subgrupo tratado. Para tal, os animais foram anestesiados e posicionados em uma mesa cirúrgica em decúbito dorsal com as patas contidas por elásticos presos à mesa. Este posicionamento facilitou a abertura bucal e o afastamento da língua utilizando uma pinça clínica esterilizada, permitindo assim, a realização da coleta da microbiota oral correspondente à saída dos ductos das glândulas submandibulares e sublinguais, na região de assoalho bucal, por meio de um swab embebido em 40µL de solução de cloreto de sódio 0,9% estéril.

Em seguida, este swab foi colocado em um tubo estéril contendo 460µL de Brain Heart Infusion - BHI (MERCK®, Darmstadt, Alemanha). Estes 500µL foram homogeneizados e diluídos, transferindo-se 100µL para outro tubo estéril contendo 900µL do BHI. Após a homogeneização do tubo contendo 1000µL, utilizou-se uma alça calibrada estéril de 1µL para semear placas de Petri contendo Ágar-sangue (Isofar, Duque de caxias, RJ, Brasil) e Ágar-Levine (Isofar, Duque de Caxias, RJ, Brasil) para isolamento das bactérias gram-positivas e gram-negativas, respectivamente. Posteriormente, estas placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas, o que permitiu o crescimento bacteriano. Lâminas foram confeccionadas a partir de esfregaços secos do material crescido nas placas à temperatura ambiente, fixadas pelo calor através da chama do bico de Bunsen e coradas pelo método de Gram (Newprov®, Pinhais, Paraná, Brasil) para avaliação das formas e arranjos bacterianos. De cada placa, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas através de um contador manual de colônias sob lupa e os seus percentuais foram calculados. Posteriormente, cada colônia foi isolada para identificação das bactérias utilizando-se os testes: Staphclin, Novobiocina e Optoquina (Laborclin®, Pinhais, Paraná, Brasil); Ágar Bile Esculina (Newprov®, Pinhais, Paraná, Brasil) e NaCl 6,5% (VETEC®, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil).

Avaliação Histológica e Histométrica

Os espécimes foram fixados em solução de formaldeído a 10% tamponado em solução tampão de fosfato de sódio 0,1 M e pH 7.2, durante 24 horas à temperatura ambiente, sendo posteriormente mantidos em geladeira a 4°C por 16-20 horas. Após a fixação o material foi encaminhado para processamento, através da técnica histológica convencional na seguinte sequência: desidratação em concentrações crescentes de

etanol, diafanização com xilol, embebição e inclusão em parafina, microtomia, estiramento em banho-maria histológico e dispostos em lâminas untadas com albumina de Mayer, secagem em estufa por aproximadamente 30 minutos a 37°C. Logo após as preparações foram coradas pela hematoxilina e eosina (HE) para proceder a análise histométrica.

De cada animal, foram obtidos 6 cortes seriados de 5µm de espessura, os quais foram corados por hematoxilina-eosina, montados em Entellan, e digitalizados pelo Pannoramic MIDI digital slide scanner (3Dhistech Kft; Budapeste, BP, Hungria) para análise através do software Pannoramic Viewer (3Dhistech Kft; Budapeste, BP Hungria) de domínio público.

Avaliou-se a altura da parede dos ductos estriados e a área dos ácinos serosos e mucosos em micrômetros. Por animal, foram obtidos 6 cortes seriados de cada glândula e em cada corte foram aleatoriamente escolhidos 5 ácinos, 5 túbulos e 5 ductos estriados para serem medidos. As estruturas escolhidas apresentavam secção transversal e circunferência circular para a correta mensuração da área dos ácinos serosos e mucosos, e espessura média da parede de ductos estriados.

Análise de apoptose

A detecção de apoptose foi executada pelo método TUNEL utilizando o Kit Apoptag® Red in situ (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os cortes foram imersos em uma solução de 800U/mL de Proteinase K em Tampão Fosfato Salino (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. Depois disso, foram incubados com o anticorpo antidigoxigenina conjugado à peroxidase de rábano. Em seguida, foram contracorados com DAPI (Sigma Missouri, EUA), desidratados em bateria crescente de etanol, diafanizados em xilol e montados em meio Entellan®.

As imagens de fluorescência para o DAPI foram obtidas em um microscópio de fluorescência invertido modelo DMI4000B (Leica, Alemanha). Para as análises foi utilizada uma magnitude de 400x. As imagens de fluorescência para o DAPI foram adquiridas utilizando um filtro de excitação no ultravioleta (UV) do tipo “band pass” (BP 360/40 nm) e a coleta foi feita no filtro de emissão BP 470/40nm. Para captar a fluorescência correspondente ao apoptag red foi utilizado os filtros de excitação BP 560/40 nm e emissão BP 645/75nm.

Análise imunoistoquímica

Foi utilizado o método da estreptavidina-biotina (SABC- Streptavidin-biotin complex). Reações imunoistoquímicas contra calponina (clone CALP, diluição 1:150, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA) e actina músculo-específico (clone HHF-35, diluição 1:100, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA) foram realizadas em cortes histológicos de 3µm de espessura dispostos em lâminas silanizadas polarizadas (Starfrost®, Knitellglass, Glher, Alemanha). Inicialmente, os cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados em banhos de concentrações decrescentes de etanol. Procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 6% e metanol na proporção de 1:1. Em seguida os cortes foram lavados em solução tampão fosfato (PBS 0.01M, pH 7,4) por 5 minutos. A recuperação antigênica foi realizada na câmara de pressão Pascal (Dako Corporation, California, Estados Unidos) em temperatura de 55°C. Os anticorpos primários foram incubados por 1 hora em temperatura ambiente (actina músculo-específico) ou por 18 horas a 4°C (calponina). Em seguida, fez-se a incubação com o anticorpo secundário biotinilado (DAKO LSAB Kit, Peroxidase, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA) por 30 min, à temperatura ambiente. Logo após, foi realizada a exposição ao complexo terciário streptavidina-biotina-peroxidase (DAKO LSAB Kit, Peroxidase) por 30 min à temperatura ambiente. Todas as etapas descritas foram seguidas de lavagem com a solução tampão fosfato. Os cortes foram então incubados com solução de diaminobenzidina (DAKO Liquid DAB, Dako Corporation, California, Estados Unidos) por 10 min e contracolorados com hematoxilina de Mayer. Os vasos sanguíneos contidos nos espécimes foram utilizados como controle positivo das reações da calponina e actina.

As lâminas foram escaneadas pelo Pannoramic MIDI digital slide scanner (3Dhistech Kft; Budapeste, BP, Hungria) e analisadas através do software Image Pro Plus (Media Cybernetics Inc, Rockville, MD, USA). Em cada lâmina, a área total de imunoexpressão de calponina e actina músculo-específica foi quantificada pela coloração promovida pelo cromógeno. Além disso, a intensidade de coloração foi medida através da densidade óptica média.

Análise estatística

Os dados referentes à quantidade de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e às medidas histométricas foram tabulados utilizando os Softwares SPSS 13.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, Estados Unidos) para Windows e o programa Excel 2010 (Microsoft, Redmond, Estados Unidos). Todos os testes foram aplicados com

95% de confiança. As variáveis numéricas foram representadas pelas medidas de tendência central e medidas de dispersão nas tabelas. Para comparação entre dois grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney (Não Normal) e para comparação entre grupos pareados, o teste de Wilcoxon (Não Normal).

Estudo Piloto

Até a presente data, não foram encontrados na literatura estudos que reportem a administração da toxina botulínica de forma repetida no complexo submandibular-sublingual de ratos. Portanto, não se conhece um protocolo da relação de dose/intervalo em animais para esse fim. Dessa forma, o estudo foi primeiramente delineado com a metodologia de aplicar a dose de 2,5U da toxina botulínica tipo A (Prosigne®, Cristália, São Paulo, SP, Brasil) nas duas glândulas submandibulares de cada animal, sendo as outras aplicações administradas com um intervalo de 28 dias. Esse protocolo foi estabelecido com base no estudo de Teymoortash e colaboradores (2007), que utilizaram a mesma dosagem em ratos e no estudo de Ellies (1999), que detectou uma normalidade na acetilcolinesterase após 28 da aplicação da toxina botulínica. Entretanto, ambos estudos realizaram apenas uma aplicação no animal. Ao se utilizar desta metodologia para repetidas aplicações, verificou-se que, por volta de 15 dias da data da segunda aplicação da toxina, os animais apresentavam-se com evidente perda de peso e pêlos, movimentação lenta e alimentação reduzida, culminando na perda dos 14 animais utilizados no grupo de estudo.

A necropsia realizada em todos os animais revelou manchas enegrecidas no fígado, estômago atrofiado e intestino com poucos dejetos, sinalizando a falta de alimentação. O exame macroscópico das glândulas submandibulares não revelou nenhuma alteração de cor, peso, tamanho ou volume. Foi coletada amostra sanguínea de um animal com sinais de doença, perda de pêlo, perda de peso, movimentos lentos e pouco reflexo. Os testes bioquímicos analisados constam na Tabela 1 e evidenciam os parâmetros de função hepática alterados.

Tabela 1: Exames bioquímicos do animal doente e valores referenciais para ratas segundo Lima et al., 2014

Exame	Valor do animal do estudo	Valor de referência para rata
TGO*	206 U/L	107 U/L)
TGP**	101 U/L	45 U/L
Bilirrubina total	0,11mg/ dl	0,24mg/dl

Bilirrubina direta	0,02mg/dl	0,02mg/dl
Bilirrubina indireta	0,09mg/dl	0,00
Gama GT	0 U/L	3,29 U/L
Colesterol total	43mg/dl	64,86

A presente pesquisa foi então desenvolvida após estudo piloto para o teste de doses, intervalos e eficácia na redução do fluxo salivar. Os resultados serão apresentados na forma de artigo a ser submetido na revista Archives of Oral Biology.

- 4 ARTIGO: EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TOXINA BOTULÍNICA EM GLÂNDULAS SALIVARES DE RATAS: ANÁLISES HISTOLÓGICAS, MICROBIOLÓGICAS E IMUNOISTOQUÍMICAS.

Título abreviado: TOXINA BOTULÍNICA EM GLÂNDULA SALIVAR

LUCIANA SILVA REGUEIRA*

Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife – Brasil.

LIRIANE BARATELLA-EVÊNCIO

Professora do Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife – Brasil.

DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ

Professor do Departamento de Clínica e Odontologia Preventiva da Universidade Federal de Pernambuco, Recife – Brasil.

Autor para correspondência:

Luciana Silva Regueira

Address: Rua Afonso Celso, 66 – Recife - PE 52060-110

Fone/Fax: + 81 996160941 e-mail: lu_regueira@hotmail.com

RESUMO

Objetivo: A aplicação intraglandular da neurotoxina botulínica tipo A (BoNT-A) é utilizada em pacientes com distúrbios neuromotores para controlar o escape de saliva. O estudo teve como objetivo analisar o impacto do tratamento repetido com a BoNT-A no complexo submandibular-sublingual e na microbiota oral de ratos. **Metodologia:** Utilizou-se 35 ratos Wistar, divididos em: grupo controle (C), onde os animais não receberam tratamento; grupo B tratado com injeções intraglandulares de 2.5U de BoNT-A (Prosigne®, Cristália, SP, Brasil) e o grupo G que recebeu a gelatina bovina (estabilizante da Prosigne). Foram realizadas três aplicações intervaladas a cada 35 dias. Nos períodos de 12 e 35 dias após o fim do tratamento, o complexo submandibular e sublingual foi coletado para proceder às análises histológicas e marcação para calponina, actina HHF35 e apoptose. Antes e após 12 dias do tratamento, a microbiota oral da região sublingual foi coletada para quantificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) e caracterização dos gêneros bacterianos dos grupos experimentais. **Resultados:** Através dos testes de Mann-Whitney e de Wilcoxon, verificou-se uma diminuição dos ácinos mucosos e serosos com aumento do espaço intersticial após 12 dias do tratamento com a BoNT-A, o que foi constatado em menor grau no 35º dia. Aos 12 dias, o grupo B evidenciou diminuição de células mioepiteliais dos ácinos serosos e evidências de apoptose. Não houve diferença na contagem de UFCs nem no padrão da colonização bacteriana entre os grupos. **Conclusão:** A BoNT-A provocou alterações histológicas com evidente caráter reversível, mas não foi capaz de alterar a microbiota oral dos animais, configurando uma segurança para uso crônico.

Palavras chave: Toxinas Botulínicas tipo A. Glândulas Salivares. Ratos Wistar. Microbiologia.

ABSTRACT

Objectives: Botulinum neurotoxin type A (BoNT-A) injections is used in patients with neuromotor disorders to control the drooling. The study aimed to analyze the impact of repeated injections with BoNT-A on submandibular-sublingual complex and oral microbiota of rats. **Method:** We used 35 Wistar rats, divided: control group (C), where the animals did not receive treatment; Group B treated with intra-glia injections of 2.5U BoNT-A (Prosigne®, Cristália, SP, Brazil) and group G receiving bovine gelatine (Prosigne stabilizer). Three applications were performed at intervals every 35 days. At 12 and 35 days after the end of treatment, the submandibular-sublingual complex were collected for histological analysis and labeling for calponin, HHF35 actin and apoptosis. Before and after 12 days of treatment, the oral microbiota of the sublingual region was collected for quantification of Colony Forming Units (CFUs) and characterization of bacterial genera of the experimental groups. **Results:** The Mann-Whitney and Wilcoxon tests showed a decrease in the mucosal and serous acinar area with increase of the interstitial space in group B after 12 days of treatment. with BoNT-A, which was observed to a lesser degree on the 35th day. At 12 days, group B showed decrease of myoepithelial cells on serous acini and evidences of apoptosis. There was no difference in the CFU counting nor in the pattern of bacterial colonization among the groups. **Conclusion:** BoNT-A caused histological changes in rats submandibular sublingual complex after 12 and 35 days with a reversible character, however, it was not able to alter the oral microbiota of the animals, configuring a safety for chronic use.

Key words: Botulinum Toxins type A. Salivary Glands. Rats, Wistar. Microbiology.

INTRODUÇÃO

O escape de saliva é um preocupante quadro presente na rotina de pacientes portadores de doenças com comprometimento neuromotor como doença de Parkinson¹, paralisia facial e cerebral², esclerose lateral amiotrófica³ e síndrome de Down⁴. Ao contrário do que frequentemente se interpreta, o escape de saliva não ocorre devido a sua maior produção e secreção, mas sim pela dificuldade de manejo oral e deglutição da mesma⁵. Esse fato resulta, além do desconforto social, em rupturas periorais, infecções, dificuldade na fala e na alimentação e ocasionalmente complicações pulmonares por aspiração salivar⁶.

Os tratamentos para o escape de saliva envolvem uma abordagem multidisciplinar para trabalhar fala, postura, consciência oromotora e sensorial. Entretanto, para obtenção de melhores resultados, associa-se uma terapia medicamentosa ou cirúrgica. O tratamento com anticolinérgicos é efetivo na inibição da produção de saliva, mas diversos efeitos colaterais como boca seca, visão turva e retenção urinária foram relatados⁷. A ressecção cirúrgica da glândula submandibular também é eficaz e apresenta cerca de 80% de redução fluxo salivar, apesar de possuir indicações restritas por consistir em uma abordagem irreversível e mais invasiva⁸. Neste contexto, a aplicação de toxina botulínica em glândulas salivares tem ganhado larga indicação por oferecer melhora significativa da sialorréia, além de ser pouco invasiva, segura e com raros efeitos colaterais^{9, 10}.

As bactérias *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum* e *Clostridium baratii* juntas produzem os sete tipos de toxina botulínica encontrados na natureza (A-G). Apenas os sorotipos A e B são formulados para comercialização¹¹. A toxina botulínica tipo A age clivando a proteína SNAP 25, cuja função é permitir a exocitose da acetilcolina na junção neuroglandular. A ausência de acetilcolina na sinapse ocasiona uma desnervação química funcional, impedindo a secreção salivar¹². A toxina botulínica tipo A (BoNT-A) também mostrou interferência no sistema de transporte de água nas células glandulares através da diminuição da disponibilidade dos canais de aquaporina 5 (AQP-5) em glândulas submandibulares de coelhos^{13, 14}.

Atualmente, existem cinco tipos de BoNT-A comercializadas, que diferem entre si quanto à natureza molecular, aos componentes estabilizantes e ao processo de fabricação. Por isso, possuem indicações clínicas, tolerabilidade e dosagens específicas. Por ter sido a pioneira no mercado, a maioria dos estudos que investiga a BoNT-A em glândulas salivares utiliza uma formulação americana (BOTOX®, Allergan Inc., California, Estados Unidos¹⁵.

Em 1988, o Lanzhou Institute of Biological Products introduziu a Lanzhou Botulinum Toxin type A com o nome de BTX-A®, a qual foi aprovada e comercializada no Brasil com o nome de Prosigne® (Cristália, São Paulo, SP, Brasil). Apesar de apresentar eficácia clínica similar à formulação americana, a Prosigne® difere quanto ao método de fabricação, pois utiliza como estabilizante uma gelatina de origem bovina e não albumina humana o que lhe confere uma maior toxicidade. Além disso, a Prosigne® tem um custo de 8 a 10 vezes menor que o do BOTOX®, fator de grande impacto na adoção desse tipo de tratamento na saúde pública¹⁶.

O efeito da BoNT-A é temporário, pois os neurônios recomeçam a secretar a acetilcolina com 1 mês e com 3 meses estão totalmente funcionais. Por isso o tratamento precisa ser repetido periodicamente¹⁷. A literatura reporta a diminuição transitória do volume glandular, da contagem de células acinares e ductais entre outros efeitos morfológicos após uma aplicação intraglandular de BoNT-A^{18, 19}. A literatura referente aos efeitos do tratamento com repetidas aplicações de BoNT-A em glândulas salivares é escassa. Um estudo de caso acompanhou 6 pacientes submetidos ao tratamento crônico com a toxina botulínica em glândulas submandibulares e concluiu que o tratamento possui boa eficácia e baixa taxa de morbidade associada²⁰. Apesar disso, não se tem descrito relatos a respeito da persistência desses efeitos após repetidas injeções da BoNT-A.

A redução do fluxo salivar decorrente de doenças ou terapias como radioterapia em face e medicações anticolinérgicas possuem influência específica e distinta sobre microbiota oral uma vez que a alteração na microflora depende da causa da hipossalivação e não da magnitude da diminuição salivar²¹. Sendo assim, a diminuição da sialorréia induzida pela BoNT-A pode trazer impactos característicos na microbiota oral dos pacientes e sendo a toxina botulínica um tratamento eficaz e difundido para o escape de saliva, é de fundamental importância conhecer o seu efeito na saúde bucal.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as características histológicas, histométricas e imunoistoquímicas do complexo submandibular-sublingual de ratos submetidas à injeção intraglandular de BoNT-A (BTX-A da PROSIGNE®), assim como a microbiota bucal desses animais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento do estudo

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (processo de número 23076.023152/2014-14) e segue a recomendação ética do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e do National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

Trata-se de um estudo do tipo experimental, descritivo, analítico quantitativo, o qual utilizou 35 ratas (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) fêmeas, adultas e saudáveis da linhagem Wistar, com peso entre 200 a 340g e idade média de 4-6 meses. Para excluir influências hormonais, foram utilizadas ratas sexualmente maduras. Os animais foram alimentados com dieta padrão para roedores (Presence® – Paulínia, São Paulo, Brasil), onde obtiveram livre acesso à ração e água, mantidos em gaiolas de polipropileno com tampa de arame zincado com 4 animais, com temperatura de 23 +/- 2° C, respeitando o ciclo dia/noite de 12 h cada.

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em três grupos de estudo: o grupo B (n = 14), tratado com injeção intraglandular de 2,5U toxina botulínica tipo A (Prosigne®, Cristália, China) reconstituída em 0,1 ml de solução de cloreto de sódio 0,9 %; o grupo G (n = 14), submetido à injeção intraglandular de 0,25 mg de gelatina bovina (Gelita do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) diluída em 0,1 ml de cloreto de sódio 0,9%; e o grupo C (n=14), que corresponde ao controle negativo, onde os animais não sofreram intervenção. Os animais dos grupos G e B receberam 1 aplicação a cada 35 dias, totalizando 3 aplicações. Posteriormente, os animais dos grupos G e B foram subdivididos em dois subgrupos (n=7), de acordo com a data de eutanásia e análise da glândula após o fim do tratamento. Os animais foram eutanasiados após 12 dias (G12 e B12) ou 35 dias (G35 e B35) após o término tratamento, datas equivalentes ao pico de ação e término de ação da droga na estrutura glandular de ratos respectivamente. O grupo C não sofreu intervenção, portanto, a coleta de microbiota e a exérese da glândula foram realizadas na idade correspondente ao início do tratamento dos demais animais.

Para a realização da injeção intraglandular, os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (10 mg/kg de peso – Ketamin®, Cristália, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (0,5 mg/kg de peso – Rompum®, Bayer, São Paulo Brasil), associados na mesma seringa e administrados por via intramuscular. Foi realizada antissepsia da região cervical dos animais com clorexidina aquosa a 2% e, através do

método de palpação, procedeu-se a injeção das substâncias apenas no complexo submandibular-sublingual do lado direito. O lado esquerdo não foi utilizado como controle para descartar alterações histológicas decorrentes de uma possível hiperfunção em resposta a baixa produção de saliva pela glândula contralateral. Todas as intervenções nos animais foram realizadas às 7:00AM.

Coleta e análise da microbiota

A coleta da microbiota oral foi realizada antes do início do tratamento e após 12 dias da última aplicação em todos os grupos experimentais e antes da eutanásia do grupo controle. Para tal, os animais foram anestesiados e a coleta foi realizada na saída dos ductos das glândulas submandibulares e sublinguais por um swab embebido em 40µL de solução de cloreto de sódio 0,9% estéril. O swab foi colocado em um tubo estéril contendo 460µL de Brain Heart Infusion -BHI (MERCK®, Darmstadt, Alemanha). Estes 500µL foram homogeneizados e diluídos transferindo-se 100µL para outro tubo estéril contendo 900µL do BHI. Após a homogeneização do tubo contendo 1000µL, utilizou-se uma alça calibrada estéril de 1µL para semear placas de Petri contendo Ágar-sangue e Ágar-Levine para isolamento das bactérias gram-positivas e gram-negativas, respectivamente. Posteriormente, estas placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas o que permitiu a obtenção do crescimento bacteriano. As lâminas foram confeccionadas a partir de esfregaços secos à temperatura ambiente, fixadas pelo calor através da chama do bico de Bunsen e coradas pelo método de Gram para avaliação das formas e arranjos bacterianos. De cada placa, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas através de um contador manual de colônias sob lupa e os seus percentuais calculados. Posteriormente, cada colônia foi isolada para identificação das bactérias utilizando-se os testes: Staphclin, Novobiocina e Optoquina (Laborclin®, Pinhais, Paraná, Brasil); Ágar Bile Esculina (Newprov®, Pinhais, Paraná, Brasil) e NaCl 6,5% (VETEC®, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil).

Avaliação Histológica e Histométrica

Os espécimes foram fixados em solução de formaldeído a 10% tamponado em por 24 horas e submetidos ao processamento histológico convencional. Seis cortes histológicos seriados de 5µm de espessura foram obtidos de tecidos embebidos em parafina, corados em hematoxilina-eosina (HE) e escaneados pelo Pannoramic MIDI digital slide scanner (3Dhistech Kft; Budapeste, BP, Hungria). Em seguida, foram analisados através do software Pannoramic Viewer (3Dhistech Kft; Budapeste, BP

Hungria), de domínio público.

Avaliou-se a altura da parede celular dos ductos estriados e a área dos ácinos serosos e mucosos em micrômetros. Por animal, foram obtidos 6 cortes seriados de cada glândula e em cada corte foram aleatoriamente escolhidos 5 ácinos serosos, 5 ácinos mucosos e 5 ductos estriados para serem medidos. As estruturas escolhidas apresentavam secção transversal e circunferência circular para a correta mensuração da área dos ácinos serosos e mucosos, e espessura da parede de ductos estriados (altura da célula ductal).

Análise de apoptose

A detecção de apoptose foi executada pelo método de TUNEL utilizando o Kit Apoptag® Red in situ (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os cortes foram imersos em uma solução de 800U/mL de Proteinase K em Tampão Fosfato Salino (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. Depois disso, os cortes foram incubados com o anticorpo antidigoxigenina conjugado à peroxidase de rábano. Em seguida, os cortes foram contracolorados com DAPI (Sigma Missouri, EUA), desidratados em bateria crescente de etanol, diafanizados em xilol e montados em meio Entellan®.

As imagens de fluorescência para o DAPI foram obtidas em um microscópio de fluorescência invertido modelo DMI4000B (Leica, Alemanha). Para as análises foi utilizada uma magnificação de 400x. As imagens de fluorescência para o DAPI foram adquiridas utilizando um filtro de excitação no ultravioleta (UV) do tipo “band pass” (BP 360/40 nm) e a coleta foi realizada no filtro de emissão BP 470/40 nm. Para captar a fluorescência correspondente ao “apoptag red” foi utilizado os filtros de excitação BP 560/40 nm e emissão BP 645/75 nm.

Análise imunoistoquímica

Para as análises imunoistoquímicas, foram confeccionados cortes de 3µm de espessura, dispostos em lâminas silanizadas polarizadas (Starfrost®, Knittelglass, Glher, Alemanha).

Para a análise da calponina, foi utilizado o método da estreptoavidina-biotina (SABC- Streptoavidin biotin complex) com o anticorpo monoclonal específico contra o antígeno da calponina (clone CALP) (Dako Corporation, California, Estados Unidos) na diluição de 1:150. O anticorpo monoclonal anti-actina músculo específica (clone HHF35) (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) na diluição de 1:100. Os cortes foram

desparafinizados em xilol e reidratados em banhos decrescentes de etanol. Procedeu-se o bloqueio da peroxidase peróxido de hidrogênio a 6% e metanol na proporção de 1:1, em seguida os cortes foram lavados em solução tampão Fosfato Salino (PBS 0.01M, pH 7,4) para posterior incubação dos anticorpos na câmara de pressão Pascal (Dako Corporation, California, Estados Unidos) em temperatura de 55°C. O anticorpo para actina passou 1 hora na incubação, enquanto que a calponina foi incubada overnight. Em seguida, fez-se a incubação com o anticorpo secundário biotinilado (DAKO LSAB Kit, Peroxidase, Dako Corporation, California, Estados Unidos), por 30 min, à temperatura ambiente e, então, à exposição ao complexo terciário streptavidina-biotina-peroxidase (DAKO LSAB Kit, Peroxidase), por 30 min à temperatura ambiente. Todas as etapas descritas foram seguidas de lavagem com a solução tampão. O material foi imerso para incubação com solução de diaminobenzidina (DAKO Liquid DAB, Dako Corporation, California, Estados Unidos), por 30 min e contracolorados com hematoxilina de Mayer.

Os vasos sanguíneos contidos nos espécimes foram utilizados como controle positivo das reações da calponina e actina. As lâminas foram escaneadas através do Panoramic MIDI digital slide scanner (3Dhistech Kft; Budapeste, BP, Hungria) e analisadas através do software Image Pro Plus (Media Cybernetics Inc, Rockville, MD, USA), onde as estruturas positivas para as imunomarcações foram selecionadas pela coloração específica para quantificação da sua área e da sua intensidade de coloração medida através da densidade óptica média.

Análise estatística

Os dados referentes a quantidade de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e às medidas histométricas foram tabulados utilizando os Softwares SPSS 13.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, Estados Unidos) para Windows e o programa Excel 2010 (Microsoft, Redmond, Estados Unidos). Todos os testes foram aplicados com 95% de confiança. As variáveis numéricas estão representadas pelas medidas de tendência central e medidas de dispersão nas tabelas. Para comparação entre dois grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney (Não Normal) e para comparação entre grupos pareados, o teste de Wilcoxon (Não Normal).

RESULTADOS

Não houve perda de animal e não foi identificado qualquer sinal de doença nos mesmos durante o período de estudo. Os animais pesavam em média 270g e não foi observada variação significativa de peso durante o tratamento.

Análise histológica

Em todos os grupos de estudo, a glândula submandibular apresentou ácinos serosos eosinofílicos com núcleos arredondados e com vacúolos citoplasmáticos frequentes, os quais também foram visíveis nos ácinos mucosos da glândula sublingual. Foi possível identificar a presença de ductos estriados em grande quantidade, ductos excretores intralobulares e extralobulares, e ductos intercalares. Não foi identificada a presença de infiltrado inflamatório em nenhum dos espécimes analisados (Figura 1).

O grupo analisado após 12 dias do fim do tratamento com a BTXA (B-12) apresentou ácinos mucosos atrofiados e maior espessura do estroma fibroso interacinar (Figura 1B). Esta característica não foi observada nos demais grupos. A porção serosa dos espécimes do grupo B-12 apresentou maior quantidade de ductos granulados, os quais exibiram intensa degranulação, fortemente eosinófilos e volumosos (Figura 1C). No grupo B-35, foi identificada a presença de vasos congestionados associados ao sistema de ductos e a persistência dos ductos granulados em degranulação na porção serosa da glândula.

Análise histométrica

Segundo as Tabelas 1 e 2, observa-se uma redução estatisticamente significativa na altura celular da parede dos ductos estriados no grupo B-12 em relação ao grupo B-35 ($p= 0,004$). No entanto, a média da altura das células ductais no grupo B-35 não apresentou diferença estatística quando comparada ao grupo controle ($p= 0,2$) e ao grupo gelatina ($p=0,109$). Não houve diferença entre os subgrupos B e G quanto às medidas dos ductos.

Com relação a área dos ácinos serosos, o grupo B-12 apresentou área média significativamente menor quando comparada ao grupo controle, ao grupo B-35 e ao grupo G-12. De igual forma, o grupo B-12 apresentou áreas de ácinos mucosos significativamente menores que os do grupo controle, grupo G-12 e grupo B-35. A medida da área dos ácinos mucosos do grupo B-35 não revelou diferença na comparação com o grupo G-35. Entretanto, elas foram significativamente menores quando comparadas ao

grupo C.

Na comparação entre os grupos C e G-12 houve diminuição estatisticamente significativa tanto da área serosa quanto da mucosa no grupo G-12, o que não foi observado no grupo G-35 em relação ao grupo C nem na área mucosa, nem na serosa.

Análise da apoptose

Todas as amostras submetidas ao teste de apoptose revelaram reação TUNEL positiva de forma difusa em núcleos, bem como em citoplasma na forma de blebs, tanto na porção mucosa como na porção serosa e ductal. Fibras colágenas e hemácias apresentaram autofluorescência para o vermelho. Sob análise descritiva, o grupo controle negativo (C), apresentou raras marcações para apoptose (+) (Figura 1). Os grupos B35, G12 e G35 apresentaram marcações ocasionais (++) e o grupo B12 evidenciou marcações frequentes (+++).

Análise imunoistoquímica

Do ponto de vista qualitativo, os ácinos apresentaram imunomarcacão positiva tanto para calponina como para actina músculo-específica, evidenciadas na região mucosa e serosa como pontos circundantes à periferia dos ácinos, sugerindo a marcação das células mioepiteliais em todos os grupos analisados (figuras 2 e 3). Os vasos sanguíneos apresentaram forte marcação e, portanto, constituíram o controle positivo da reação.

A quantificação da área corada pela imunoistoquímica da calponina demonstrou menor área ($0,25\mu\text{m}^2$) e menor densidade óptica média da marcação (27859) do grupo B12 com relação aos demais grupos, correspondendo a apenas um terço da área corada no grupo controle ($0,75\mu\text{m}^2$), o qual apresentou também maior intensidade do corante (65862). Os grupos B35, G35 e G12 apresentaram médias de área e intensidade semelhantes ao grupo controle. Essas alterações foram detectadas apenas na porção serosa.

A imunoreatividade para actina músculo-específica também revelou, na porção serosa, menor valor das médias de área ($0,20\mu\text{m}^2$) e densidade óptica média (24780) no grupo B12 com relação aos demais grupos, à exceção do grupo G12 que apresentou médias similares tanto de área ($0,26\mu\text{m}^2$) como de intensidade (30065). À semelhança

da marcação com calponina, o grupo controle apresentou médias mais elevadas de área imunorreativa ($0,63 \mu\text{m}^2$) e de intensidade (67333).

Análise microbiológica

Comparando a quantidade de UFCs após o tratamento, não foi identificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o controle, tampouco entre os grupos B-12 ($p=0,36$) e G-12 ($p=0,709$) (Tabela 3). A Tabela 4 demonstra a comparação do quantitativo de UFCs antes e após o tratamento no grupo B ($p=0,310$) e no grupo G ($p=0,733$), não evidenciando diferenças estatisticamente significativas. Com relação ao gênero das bactérias, observou-se uma predominância dos *Streptococcus sp.* seguido da *Corynebacterium sp.* em todos os grupos analisados (Tabela 5). Do gênero *Streptococcus* houve uma prevalência de bactérias do trato gastrointestinal representadas pelos *Streptococcus* do grupo D. Com relação ao teste de Gram, a maioria das espécies identificadas foi Gram positivas em todos os grupos de estudo. A análise qualitativa da cultura de bactérias não revelou alteração no padrão dos gêneros bacterianos encontrados nos animais que receberam a BTXA e nos animais dos grupos controle.

DISCUSSÃO

Por ser uma terapia eficaz, de alta especificidade e associada a poucos efeitos colaterais, a BoNT-A é uma alternativa prioritária no tratamento da sialorréia. Dado que a toxina botulínica é considerada a toxina de maior efeito letal ao ser humano, protocolos terapêuticos com essa droga devem ter rigoroso embasamento científico. No entanto, um consenso internacional sobre o uso da toxina botulínica em pacientes com escape de saliva apontou falta de evidência sobre os seus efeitos após repetidas doses²². Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo controlado com avaliação pormenorizada do tecido glandular após o uso crônico da BoNT-A em glândulas salivares.

Ao avaliar a histologia do complexo submandibular-sublingual de ratas submetidas ao tratamento repetido com a BoNT-A, o presente estudo identificou uma diminuição significativa do tamanho dos ácinos e da altura celular dos ductos estriados após 12 dias. Sob a análise tempo-curso, mostra-se que, após 35 dias do tratamento, os ácinos aumentaram o seu tamanho em relação ao grupo B12, sem, contudo, se igualar ao grupo controle que evidenciou medidas significativamente maiores que o grupo B nos dois momentos avaliados (12 e 35 dias). O menor tamanho dos ácinos encontrado no grupo B35 com relação ao controle pode ser justificado pela maior idade dos animais ao final do tratamento com a BoNT-A, pois com tempo de vida é comum encontrar atrofia acinar em glândulas submandibulares de ratos²³.

Ao investigar o mecanismo do efeito inibitório da BoNT-A na secreção da glândula parótida de ratos, foi identificada discreta atrofia das células acinares após 7 dias da aplicação de dose única de 2,5U de BTXA® (Lanzhou, China), sugerindo o início do efeito da droga. No mesmo estudo, os autores observaram que, após 12 dias da aplicação, houve uma atrofia significativa das células glandulares. Porém, após 35 dias, esta diferença não é mais identificada em comparação com o grupo que recebeu apenas solução salina. Sugeriu-se que o período de 12 dias se refere ao pico de ação da droga, ausentando-se o efeito após 35 dias²⁴. Os dados morfométricos encontrados no presente estudo estão de acordo pesquisas que analisaram o efeito da dose única de BoNT-A em glândulas de ratos e revelaram atrofia transitória de células acinares e ductais, aumento do tecido fibroso interacinar²⁵ e menor contagem de núcleos²⁶.

Em glândulas salivares, a atividade secretora está intimamente relacionada com o volume celular. Ratos com deficiência nos canais de AQP-5 apresentam diminuição da permeabilidade da membrana acinar e alteração do seu volume²⁷. Uma vez que a BoNT-

A é capaz de alterar a distribuição dos canais de AQP-5 na superfície dos ácinos, voltando-os para o citoplasma, a inativação desses canais pode estar associada à diminuição de volume acinar identificada no grupo B.

A literatura reporta efeitos ultraestruturais que suportam a evidente atrofia dos ácinos provocada pela desnervação química mediada pela BoNT-A, tais como variações morfológicas do retículo endoplasmático rugoso, degeneração mitocondrial, vacúolos secretores com variação em tamanho, forma e densidade eletrônica, núcleo com forma irregular e cromatina finamente dispersa em glândulas tratadas com a BoNT-A em dose única²⁸. Em conformidade com o presente estudo, já foi reportado o aumento do conteúdo fibroso intersticial da glândula e aumento dos grânulos densos de glicogênio e de mitocôndrias no citoplasma dos ductos estriados granulares evidenciados após o tratamento intraglandular com toxina botulínica²⁹.

Os ductos granulosos são estruturas características da glândula submandibular de roedores, apresentam rico componente proteico e mitocondrial, pois secretam fatores de crescimento e proteínas. Quando uma glândula é perdida, existe uma atividade compensatória da glândula contra-lateral através do aumento dos ductos granulosos³⁰. Dessa forma, a destacada evidência do ducto granuloso no grupo B-12 pode ter relação com a supressão da atividade secretória pelos ácinos induzida pela BoNT-A.

A apoptose é um evento comum em glândulas submandibulares de ratos no período pós natal, até cerca do 21º dia pós nascimento, quando as células pró acinares são completamente transformadas em células acinares. Nesse período a reação TUNEL mostra características morfológicas da apoptose, incluindo a fragmentação de núcleos e a presença de corpos apoptóticos no citoplasma³¹. A BoNT-A demonstrou induzir apoptose em próstata³² e glândula nasal de ratos³³. Em glândulas submandibulares de coelhos tratados com aplicação única de BTX-A (Prosigne®, Cristália, China) poucas células apoptóticas foram encontradas no grupo controle. No entanto, na avaliação após 14 dias, tanto células acinares como ductais mostraram apoptose. Além da morte celular, os autores constataram os ácinos menores, com acúmulo de grânulos e formação de tecido fibroso no local da injeção após 12 dias da aplicação. Essas alterações morfológicas encontradas não foram vistas após 28 dias do tratamento³⁴. Em consonância com a literatura exposta, a identificação de apoptose no grupo B12 do presente estudo confirma o estímulo da toxina botulínica sobre a morte celular em estruturas glandulares.

Sabe-se que a actina e a calponina, presentes nas células mioepiteliais, participam ativamente do processo de exocitose, realizando o rearranjo do citoesqueleto da célula necessário para a liberação de vesículas³⁵. A BoNT-A é capaz de impedir a

neuroexocitose através no bloqueio da retinulação da actina F do citoesqueleto celular em junções neuromusculares³⁶. Ela ainda está relacionada com a diminuição da expressão de actina e miosina em cultura de fibroblastos³⁷. A ação da BoNT-A sob as células mioepiteliais foi reafirmada uma vez que houve uma diminuição de sua quantidade no grupo B-12.

Recentemente foi publicado o primeiro estudo avaliando as interferências histopatológicas do tratamento repetido com BoNT-A em humanos. Ao analisar 17 glândulas que receberam ao menos 4 injeções de BoNT-A, não foram identificadas diferenças estatísticas com relação a morfologia e contagem das células acinares entre os grupos tratado e controle³⁸. Por se tratar de um estudo retrospectivo os autores não descrevem os períodos de avaliação após a injeção, o que dificulta a interpretação dos resultados encontrados quanto a ausência ou a reversibilidade do efeito da BoNT-A na glândula. Além disso, não foram realizadas imunomarcações, tampouco avaliados parâmetros relativos à área acinar,

A coerência dos resultados apresentados com os estudos que utilizaram dose única leva à sugestão de que o tratamento crônico com a BoNT-A na glândula tende a seguir o mesmo padrão de reversibilidade dos seus efeitos em dose única. Um aumento no volume dos ácinos, ductos e células mioepiteliais no grupo B35 em relação ao B12 suportam essa hipótese.

Com relação aos testes bacteriológicos executados, não foram constatadas alterações quanto à quantidade de UFCs e quanto ao padrão de espécies colonizadoras antes e após os tratamentos. Houve prevalência de bactérias gram positivas. Uma avaliação comparativa após a administração intraglandular de toxina botulínica em pacientes portadores de doenças neurodegenerativas não identificou alterações estatisticamente significantes na contagem de bactérias cariogênicas nem na alteração da composição salivar³⁹. De igual forma, a contagem de bactérias em crianças com paralisia cerebral tratadas com injeções de BoNT-A não mostrou alteração significativa⁴⁰. A prevalência de bactérias gram positivas na microbiota oral de ratos também foi relatada por Hide et al. (2012)⁴¹. Percentuais mais semelhantes de bactérias Gram-positivas foram observados no trabalho de Araújo et al. (2007), onde perfaziam um total de 91,2%, enquanto que o percentual de bactérias gram-negativas foi de 8,8%⁴². É possível que o tratamento em caráter crônico tenha induzido uma compensação na secreção salivar das demais glândulas salivares o que explicaria a não interferência na microbiota oral.

O *Streptococcus* do grupo D é comumente encontrado na flora do trato gastrointestinal e representou a bactéria encontrada em maior proporção tanto nos

animais tratados (B e G) como nos controles (C). O *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Veillonella spp.*, *Neisseria spp.* e *S. salivarius* são tipos predominantes de bactérias isoladas a partir da saliva, do dorso da língua, da mucosa bucal e sulco gengival de ratos⁴³. A BoNT-A tem alta afinidade com os terminais colinérgicos da membrana pré-sináptica e pequena distribuição sistêmica após o uso de doses terapêuticas. Portanto não se tem relatado efeitos à distância decorrentes da sua aplicação. Este fato pode explicar a ausência de alteração na microbiota oral relatada já que não há interferência dessa droga com íons, imunoglobulinas ou enzimas salivares, componentes estes fundamentais na função de defesa da saliva.

CONCLUSÃO

A aplicação crônica da toxina botulínica tipo A (Prosigne® Cristália, São Paulo, Brasil) foi capaz de provocar alterações histológicas no complexo submandibular-sublingual de ratas após 12 dias, havendo uma tendência à reversão aos 35 dias. As alterações constatadas incluem diminuição de ácinos serosos, mucosos e de ductos, diminuição das células mioepiteliais e ocorrência da apoptose celular. Por outro lado, o tratamento com a BoNT-A não provocou alteração no padrão de colonização bacteriana dos animais. A provável reversão das alterações celulares em glândulas submandibulares sugere que esta formulação de BoNT-A pode ser utilizada com segurança no tratamento do escape salivar.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Propesq- UFPE pelo apoio financeiro à pesquisa.

CONFLITO DE INTERESSE

Não houve conflito de interesse na presente pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Teive, H.A., Bertucci Filho B.C., Munhoz, R.P. (2016). Unusual motor and non-motor symptoms and signs in the early stage of Parkinson's disease. *Arquivos de Neuropsiquiatria*, 74, 781-784.
- Dias, B.L., Fernandes, A.R., Filho, H.S. (2016). Sialorrhea in children with cerebral palsy. *Jornal de Pediatria*, 92, 549-558.
- Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.
- Scott, K., Shannon, R., Roche-Green, A. (2016). Management os sialorrhea in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Palliative Medicine*, 19(1), 110-1.
- Rahul, V.K., Mathew, C., Jose, S., Thomas, G., Noushad, M.C., Feroz, T.P. (2015). Oral manifestation in mentally challenged children. *Journal of International Oral Health*, 7(2), 37-41.
- Srivanitchapoom, P., Pandey, S., Hallett, M. (2014). Drooling in Parkinson's Disease: a review. *Parkinsonism Relative Disorders*, 20(11), 1109–1118.
- Silvestre-Donat, F.J., Silvestre-Rangil, J. (2014). Drooling. *Monographs Oral Science*, 24, 126-34.
- Montgomery, J., McCusker, S., Lang, K., Grosse, S., Mace, A., Lumley, R., Kubba, H. (2016). Managing children with sialorrhoea (drooling): Experience from the first 301 children in our saliva control clinic. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 85, 33-9.
- Hornibrook, J., Cochrane, N. (2012). Contemporary surgical management of severe sialorrhea in children. *Pediatrics*, 2012, 364875.
- Mahadevan, M., Gruber, M., Bilish, D., Edwards, K., Davies-Payne, D., Van der Meer, G. (2016). Botulinum toxin injections for chronic sialorrhoea in children are effective regardless of the degree of neurological dysfunction: A single tertiary institution

experience. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 88, 142-5.

Jeung, I.S., Lee, S., Kim, H.S., Yeo, C.K. (2012). Effect of botulinum toxin a injection into the salivary glands for sialorrhea in children with neurologic disorders. *Annals of Rehabilitation Medicine*, 36(3), 340-6.

Poulain, B., Popoff, M.R., Molgo, J. (2008). How do the botulinum neurotoxins block neurotransmitter release: from botulism to the molecular mechanism of action. *Botulinum Journal*, 1, 14-87.

Matak, I., Lacković, Z. (2015) Botulinum neurotoxin type A: Actions beyond SNAP-25? *Toxicology*, 335(1), 79-84.

Xu, H., Shan, X.F., Cong, X., Yang, N.Y., Wu, L.L., Yu, G.Y., Zhang, Y., Cai, Z.G. (2015). Pre- and post-synaptic effects of botulinum toxin A on submandibular glands. *Journal of dental research*, 94(10), 1454-62.

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. *Journal Ophthalmology*, 7058537, 1-8.

Ko, E.J., Mun, S.K., Oh, I.Y., Kwon, T.R., Kim, B.J., Kim, M.N. Comparison of efficacy and diffusion of three formulations of botulinum toxin type A in two patients with forehead hyperhidrosis. *Clinical and Experimental Dermatology*, 39 (5), 673-5.

Tang, X., Wan, X. (2000). Comparison of Botox with a Chinese type A botulinum toxin. *Chinese Medical Journal*, 113(9), 794-798.

Blitzer, A., Sulica, L. (2001) Botulinum toxin: basic science and clinical uses in otolaryngology. *The Laryngoscope*, 111(2), 218-26.

Lee, Z.I., Cho, D.H., Choi, W.D., Park, D.H., Byun, S.D. (2011). Effect of botulinum toxin type a on morphology of salivary glands in patients with cerebral palsy. *Annals of Rehabilitation Medicine*, 35(5), 636-40.

Oliveira, J.B., Evêncio-Neto, J., Baratella-Evêncio, L. (2016). Histological and immunohistochemical findings of the action of botulinum toxin in salivary gland: systematic review. *Brazilian Journal of Biology*, 77(2).

Sillanpää, S., Sipilä, M., Numminen, J., Rautiainen, M. (2015). The Experience of Treating Drooling with Repeated Botulinum Toxin Injections. *Journal for Oto-Rhino-Laryngology and Its Related Specialties*, 77(6), 333-8.

Almståh, A., Wikström, M., Stenberg, I., Jakobsson, A., Fagerberg-Mohlin, B. Oral microbiota associated with hyposalivation of different origins. *Oral Microbiology and Immunology*, 18, 1-8.

Reddihough, D., Erasmus, C.E., Johnson, H., McKellar, G.M., Jongerius, P.H. Botulinum toxin assessment, intervention and aftercare for paediatric and adult drooling: international consensus statement. *European Journal of Neurology*, 17 (2), 109-21.

Lasisi, T.J, Shittu, S.T., Oguntokun, M.M., Tiamiyu, N.A. (2014). Aging affects morphology but not stimulated secretion of saliva in rats. *Annals of Ibadan Postgraduate Medicine*, 12(2),109-14.

Wen, W.D., Yuan, 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. *Chinese Journal of Stomatology*, 44(1), 38-40.

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. *Journal of clinical otorhinolaryngology*, 18 (9),558-60.

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. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 58(11), 1251-1256.

Krane, C.M., Melvin, J.E., Nguyen, H.V., Richardson, L., Towne, J.E., Doetschman, T., Menon, A.G. (2001). Salivary acinar cells from aquaporin 5-deficient mice have decreased membrane water permeability and altered cell volume regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (26), 23413-20.

Younis, R.E., Abou Elkhier, M.T., Mourad, M.I., 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.

Teymoortash, A., Sommer, F., Mandic, R., Schulz, S., Bette, M., Aumüller, G., Werner, J.A.

(2007). Intraglandular application of botulinum toxin leads to structural and functional changes in rat acinar cells. *Brazilian Journal of Pharmacology*, 152(1), 161-7.

Yagil, C., Michaeli, M., Zajicek, G. (1985). Compensatory proliferative response of the rat submandibular salivary gland to unilateral extirpation. *Virchows Archives*. 1985; 49:83-92.

Hayashi, H., Ozono, S., Watanabe, K., Nagatsu, I., Onozuka, M. (2000) Morphological aspects of the postnatal development of submandibular glands in male rats: involvement of apoptosis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 48 (5), 695-8.

Chuang, Y.C., Huang, C.C., Kang, H.Y., Chiang, P.H., Demiguel, F., Yoshimura, N., Chancellor, M.B. (2006). Novel action of botulinum toxin on the stromal and epithelial components of the prostate gland. *Journal of Urology*, 175 (1), 1158-63.

Rohrbach, S., Olthoff, A., Laskawi, R., Giefer, B., Götz, W. (2001). Botulinum toxin type A induces apoptosis in nasal glands of guinea pigs. *Annals of Otology Rhinology & Laryngology*, 110(11),1045-50.

Shan, X.F., Xu, H., Cai, Z.G., Wu, L.L., Yu, G.Y. (2013). Botulinum A inhibits submandibular gland secretion. *International Journal of Oral Science*, 5, 217–223.

Marxen, P., Bigalke, H. (1991).Tetanus and botulinum A toxins inhibit stimulated F-actin rearrangement in chromaffin cells. *Neuroreport*, 2(1), 33-6.

Ishida, H., Zhang, X., Erickson, K., Ray, P. (2004). Botulinum toxin type A targets RhoB to inhibit lysophosphatidic acid-stimulated actin reorganization and Acetylcholine release in nerve growth factor-treated PC12 cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 310(3), 881-9.

Yan, T., Chen, M., Ma, K., Liang, L., Liu, C., Lai, L., Fu, X. (2014). Effects of botulinum toxin type A on the expression of alpha-SMA and myosin-II of fibroblasts in scars. *Chinese Journal of Plastic Surgery*, 30(2),118-21.

Mosseri, A., Cardona, I., Blumenkrantz, M., Daniel, S.J. (2016). Histopathologic Effects of Onabotulinum Toxin A Treatment in Pediatric Submandibular Gland. *Otolaryngology Head Neck Surgery*, 22, 341-4.

Tiigimäe-Saar, J., Taba, P., Tamme, T. (2016). Does Botulinum neurotoxin type A treatment for sialorrhea change oral health? *Clinical Oral Investigation*, 26, 1-5.

Wu, K.P., 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), 838-43.

Hyde, E.R., Luk, B., Cron, S., Kusic, L., McCue, T., Bauch, T., Kaplan, H., Tribble, G., Petrosino, J.F., Bryan, N.S. (2014). Characterization of the rat oral microbiome and the effects of dietary nitrate. *Free Radical Biology and Medicine*, 77, 249-57.

Araújo, F.R.G., Castro, C.M.M.B., Severo, M.S. (2007). Normal microbiota of the perialveolar region of incisors of rats. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59, 1586-1588.

Marcotte, H., Lavoie, M.C. (1998). Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1), 71-109.

Öcal, D.N., Dolapç, İ., Karahan, Z.C., Tekeli, A.(2017). Investigation of biofilm formation properties of staphylococcus isolates. *Bulletin of microbiology*, 51(1),10-19.

LISTA DE FIGURAS

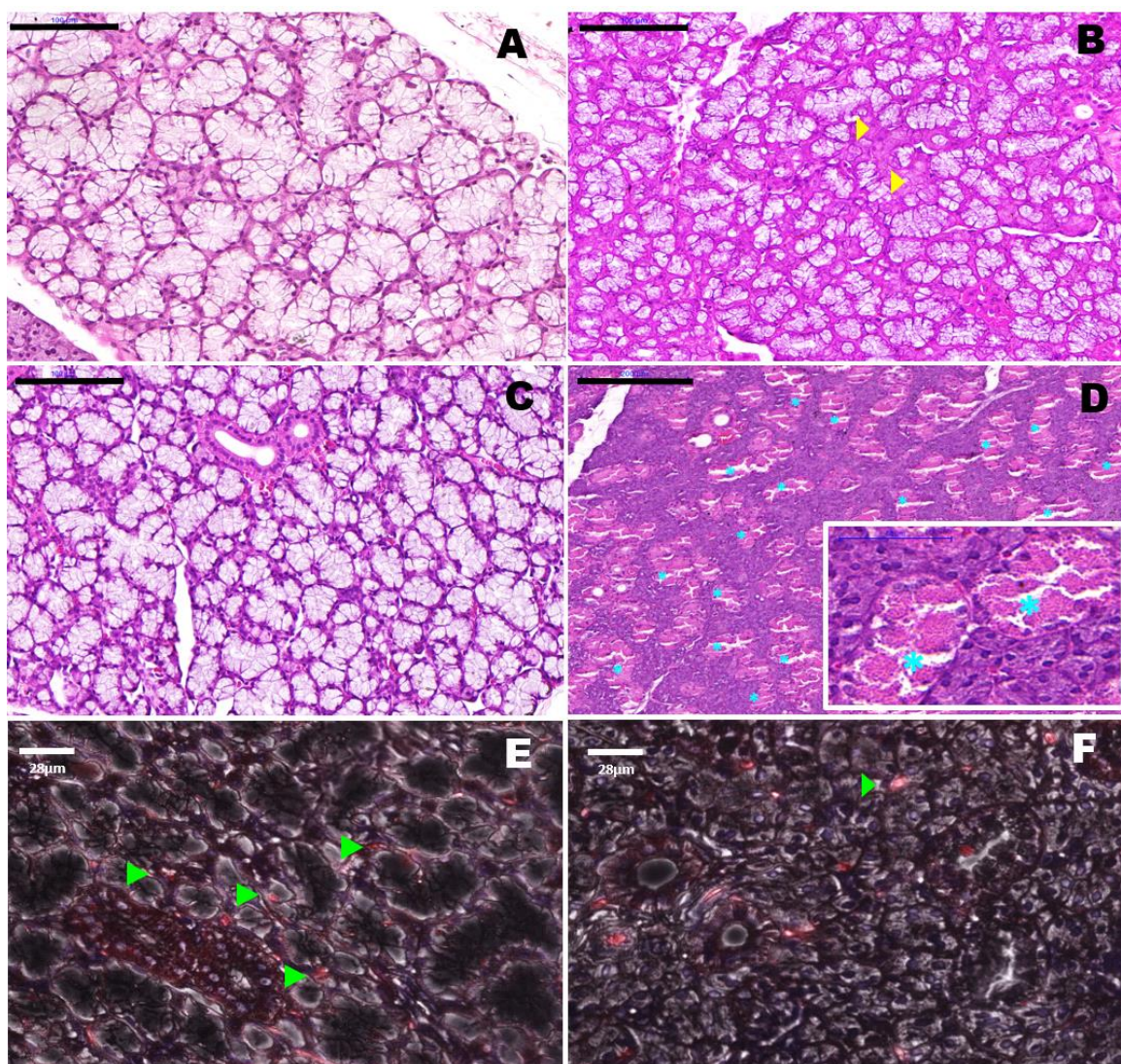


Figura 1. **Fotomicrografias de glândulas submandibulares de ratas coradas em HE.** (A) ácidos mucosos do grupo controle; (B) ácidos mucosos do grupo B-12 com setas amarelas mostrando conteúdo intersticial fibrótico; (C), ácidos mucosos do grupo B-35; (D) ácidos serosos do grupo B-12 com asteriscos mostrando a presença de ductos granulosos desintegrados; (E e F): ácidos mucosos e serosos respectivamente do grupo B-12 evidenciando pontos de apoptose nas setas verdes. Barras A, B e C = 100µm, D=200 µm, E e F= 28 µm.

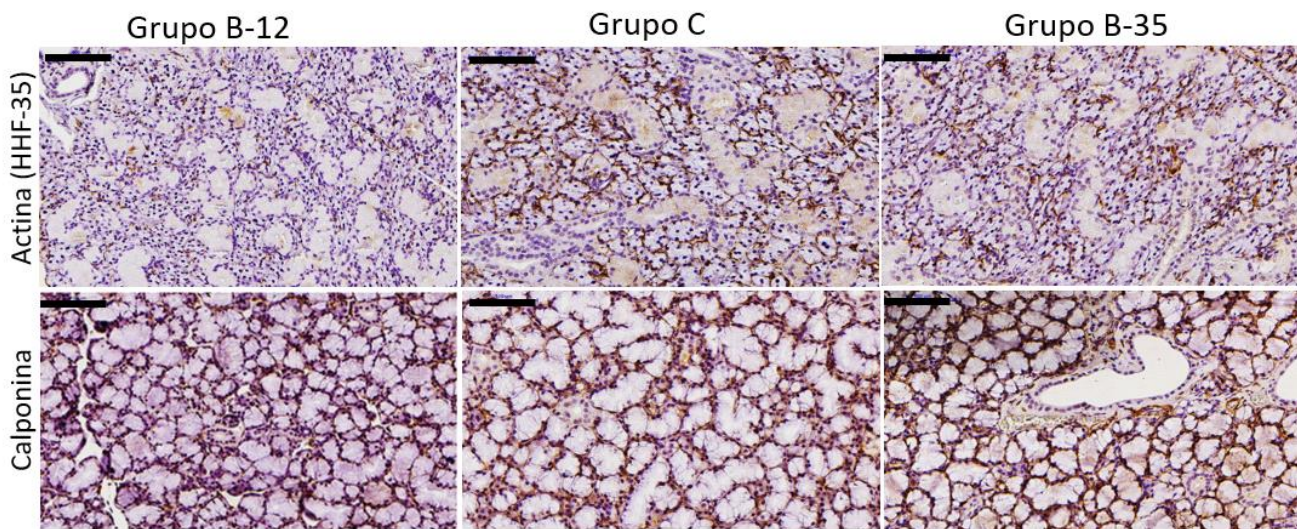


Figura 2: **Imunomarcacão para Actina HHF-35 e calponina** Fotomicrografias evidenciando menos marcação de células mioepiteliais com maior evidência nos ácinos serosos do grupo B-12 em comparação com os grupos C e B-35. Barra equivalente a 100µm.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias e desvio padrão da área dos ácinos e espessura do ducto dos subgrupos B12 x B35 e G12 x G35.

Variáveis	Momentos		p-valor *
	12 Dias Média ± DP	35 Dias Média ± DP	
BTXA			
Espessura do ducto (μ)	12,64 ± 0,71	14,42 ± 0,43	0,004
Área serosa (μm ²)	376,06 ± 52,23	614,61 ± 139,88	0,006
Área mucosa (μm ²)	497,08 ± 51,57	1026,84 ± 135,74	0,004
Gelatina			
Espessura do ducto (μ)	15,96 ± 1,53	15,11 ± 0,81	0,262
Área serosa (μm ²)	481,57 ± 117,96	708,97 ± 138,15	0,025
Área mucosa (μm ²)	940,72 ± 123,72	1314,65 ± 206,43	0,006

(*) Teste de Wilcoxon

Tabela 2 – Comparação da média e desvio padrão dos ácinos e ductos entre os grupos C, G e B.

Momento	Variáveis	Grupos		p-valor *
		Controle	BTXA	
		Média ± DP	Média ± DP	
12 dias	Espessura do ducto (μ)	16,59 ± 2,53	12,64 ± 0,71	0,004
	Área do ácino seroso (μm ²)	915,60 ± 121,80	376,06 ± 52,23	0,004
	Área mucosa (μm ²)	1607,48 ± 405,07	497,08 ± 51,57	0,004
35 dias	Espessura do ducto (μ)	16,59 ± 2,53	14,42 ± 0,43	0,200
	Área serosa (μm ²)	915,60 ± 121,80	614,61 ± 139,88	0,004
	Área mucosa (μm ²)	1607,48 ± 405,07	1026,84 ± 135,74	0,012
		Controle	Gelatina	
		Média ± DP	Média ± DP	
	Espessura do ducto (μ)	16,59 ± 2,53	15,96 ± 1,53	0,631
12 dias	Área serosa (μm ²)	915,60 ± 121,80	481,57 ± 117,96	0,004
	Área mucosa (μm ²)	1607,48 ± 405,07	940,72 ± 123,72	0,004
	Espessura do ducto (μ)	16,59 ± 2,53	15,11 ± 0,81	0,337
35 dias	Área serosa (μm ²)	915,60 ± 121,80	808,97 ± 138,15	0,106
	Área mucosa (μm ²)	1607,48 ± 405,07	1314,65 ± 206,43	0,200
		BTXA	Gelatina	
		Média ± DP	Média ± DP	
	Espessura do ducto (μ)	12,64 ± 0,71	15,96 ± 1,53	0,004
12 dias	Área serosa (μm ²)	376,06 ± 52,23	481,57 ± 117,96	0,025
	Área mucosa (μm ²)	497,08 ± 51,57	940,72 ± 123,72	0,004
	Espessura do ducto (μ)	14,42 ± 0,43	15,11 ± 0,81	0,109
35 dias	Área serosa (μm ²)	614,61 ± 139,88	808,97 ± 138,15	0,423
	Área mucosa (μm ²)	1026,84 ± 135,74	1314,65 ± 206,43	0,055

(*) Teste de Mann-Whitney

Tabela 3 – Comparação da quantidade de UFCs entre grupos tratados e controle e entre tratados BTXA e Gelatina

GRUPOS	Média ± DP	p-valor *
Antes		
BTX-A	140,14 ± 126,46	0,136
Controle	46,57 ± 35,47	
Gelatina	62,14 ± 57,77	0,709
Controle	46,57 ± 35,47	
Depois		
BTX-A	107,43 ± 98,26	0,233
Controle	46,57 ± 35,47	
Gelatin	51,57 ± 65,90	0,681
Controle	46,57 ± 35,47	
Antes		
BTX-A	140,14 ± 126,46	0,201
Gelatina	62,14 ± 57,77	
Depois		
BTX-A	107,43 ± 98,26	0,565
Gelatina	51,57 ± 65,90	

(*) Teste de Mann-Whitney

Tabela 4 – Comparativo da quantidade de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) por subgrupo antes e após 12 do tratamento

Grupo	Momento		p-valor *
	Antes Média ± DP	Depois Média ± DP	
BTX-A 12 dias	140,14 ± 126,46	107,43 ± 98,26	0,310
GELATINA 12 dias	62,14 ± 57,77	51,57 ± 65,90	0,933

(*) Teste de Wilcoxon

Tabela 5 – Percentual bacteriano dos grupos tratados e controle antes e após 12 dias do tratamento

GRUPO	BTX-A antes de 12 dias		BTX-A depois de 12 dias		Gelatina antes de 12 dias		Gelatina depois de 12 dias		Controle	
	n	%	N	%	n	%	n	%	n	%
<i>Corynebacterium sp</i>	2 8 0	28 ,5	5 9	7, 8	11 7	26 ,9	3 8	10 ,5	6 9	21 ,0
<i>Bacillus sp</i>	9 7	9, 9	1	0, 1	2 2	5, 1	1 4	3, 9	1 5	4, 6
<i>Streptococcus grupo D</i>	2 7 1	27 ,6	5 7 3	76 ,2	2 0 0	46 ,0	2 5 0	69 ,3	7 2	22 ,0
<i>Streptococcus enterococcus</i>	1 3 5	13 ,8	6 4	8, 5			3 4	9, 4	1 2 5	38 ,1
<i>Streptococcus grupo Viridans</i>							6	1, 7		
<i>Streptococcus grupo B</i>			2	0, 3	5 6	12 ,9				
<i>Staphylococcus coagulase negative</i>	6	0, 6	5 5	7, 3	7 8	18	3	0, 9		
<i>Staphylococcus aureus</i>	3 1	3, 2			1 8	4, 1	7	1, 9	4 7	14 ,3
<i>Escherichia coli *</i>	1 5 6	15 ,9								
<i>Aeromonas Viridans *</i>							7	1, 9		

*Bactérias Gram negativas

5 CONCLUSÃO

A aplicação crônica da toxina botulínica tipo A (Prosigne® Cristália, São Paulo, Brasil) foi capaz de provocar alterações histológicas no complexo submandibular-sublingual de ratas após 12 dias, havendo uma tendência à reversão aos 35 dias. As alterações constatadas incluem diminuição de ácinos serosos, mucosos e de ductos, diminuição das células mioepiteliais e ocorrência da apoptose celular. Por outro lado, o tratamento com a BoNT-A não provocou alteração no padrão de colonização bacteriana dos animais. A provável reversão das alterações celulares em glândulas submandibulares sugere que esta formulação de BoNT-A pode ser utilizada com segurança no tratamento do escape salivar.

REFERÊNCIAS

- Cecchini MP, Parnigotto M, Merigo F, Marzola P, Daducci A, Tambalo S, Boschi F, Colombo L, Sbarbati A. 3D printing of rat salivary glands: The submandibular-sublingual complex. *Anat Histol Embryol*. 2014; 43(3): 239-44.
- Catalán MA, Nakamoto T, Melvin JE. The salivary gland fluid secretion mechanism. *J Med Invest*. 2009; 56:192-6.
- Dvorák M. The secretory cells of the submaxillary gland in the perinatal period of development in the rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 1969; 99(3): 346-56.
- Barbosa DB, Taga R. Estudo Estereológico dos Diferentes Componentes estruturais de Glândulas Submandibulares de Ratos Machos e Fêmeas. *Rev. Fac odontol Bauru*. 1997; 5(3/4): 51-57.
- Jacoby F, Leeson CR. The post-natal development of the rat submaxillary gland. *Journal of Anatomy*. 1959; 93(2): 201-216.
- D'Avola TE, Ogawa K, Alves e Silva MR, Motoyama AA, Inácio E, König Junior B, Watanabe IS. Three-dimensional characteristics of submandibular salivary gland of ageing rats: an HRSEM study. *Ann Anat*. 2006; 188(5): 431-8.
- Denny PC, Ball WD, Redman RS. Salivary glands: a paradigm for diversity of gland development. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997; 8(1): 51-75.
- Coire, Umemura ALO, Cestari TA, Taga R. Increase in the cell volume of the rat submandibular gland during postnatal development. *Braz J morphol Sci*. 2003; 20(1): 37-42.
- Fukuda M. Histochemical studies on the rat submaxillary gland during post-natal development. *Histochemie*. 1967; 8: 342--354.
- Chitturi RT, Veeravarmal V, Nirmal RM, Reddy BV. Myoepithelial Cells (MEC) of the Salivary Glands in Health and Tumours. *J Clin Diagn Res*. 2015; 9(3): 14-8.
- Redman RS. Myoepithelium of salivary glands. *Microscopy research and technique*. 1994; 27: 25-45.
- Norberg L, Dardick I, Leung R, Burford-Mason AP, Rippstein P. Immunogold localization of actin and cytokeratin filaments in myoepithelium of human parotid

salivary gland. *Ultrastruct Pathol.* 1992; 16: 555-568.

Cavalcante RB, Lopes FF, Ferreira AS, Freitas R de A, de Souza LB. Immunohistochemical expression of vimentin, calponin and HHF-35 in salivary gland tumors. *Braz Dent J.* 2007; 18(3): 192-7.

Patel VN, Hoffman MP. Salivary Gland Development: A Template for Regeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 2014; 0: 52–60.

Quissell DO, Watson E, Dowd FJ. Signal transduction mechanisms involved in salivary gland regulated exocytosis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1992; 3(1-2): 83-107.

Delporte C, Bryla A, Perret J. Aquaporins in Salivary Glands: From Basic Research to Clinical Applications. *Int J Mol Sci.* 2016 Jan 27;17(2).

Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent.* 2001; 85(2):162-9.

Dawes C. Physiological factors affecting salivary flow rate, oral sugar clearance, and the sensation of dry mouth in man. *J Dent Res.* 1987; 66: 648–653.

Melvin JE, Yule D, Shuttleworth T, Begenisich T. Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. *Annu Rev Physiol.* 2005; 67: 445–469.

Dawes, C. Effects of diet on salivary secretion and composition. *J Dent Res.* 1970; 49(6):1263–1273.

Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5721–5732.

Segata N, Haake SK, Mannon P, Lemon KP, Waldron L, Gevers D, Huttenhower C, Izard J. Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biol.* 2012; 13(6):1-18.

Zaura E, Keijser BJF, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC Microbiol.* 2009; 9 (259): 1–12.

Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Stoneking M. Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Res.* 2009; 19(4): 636-43.

Slots J, Slots H. Bacterial and viral pathogens in saliva: disease relationship and infectious risk. *Periodontology 2000.* 2011; 55(1): 48 -69.

Hidas A, Noy AF, Birman N, Shapira J, Matot I, Steinberg D, Moskovitz M. Oral health status, salivary flow rate and salivary quality in children, adolescents and young adults with ADHD. *Arch Oral Biol.* 2011; 56(10): 1137-41.

Miranda-Rius J, Brunet-Llobet L, Lahor-Soler, Farré M. Salivary Secretory Disorders, Inducing Drugs, and Clinical Management. *Int J Med Sci.* 2015; 12(10): 811–824.

Frydrych AM. Dry mouth: Xerostomia and salivary gland hypofunction. *Aust Fam Physician.* 2016; 45(7): 488-92.

Hockstein NG, Samadi DS, Gendron K, Handler SD. Sialorrhea: a management challenge. *Am Fam Physician.* 2004; 69(11): 2628-34.

Freeman JJ, Altieri RH, Baptiste HJ, Kuo T, Crittenden S, Fogarty K, Moultrie M, Coney E, Kanegis K. Evaluation and management of sialorrhea of pregnancy with concomitant hyperemesis. *Ther Adv Psychopharmacol.* 2016; 6(3): 178–184.

Maher S, Cunningham A, O'Callaghan N, Byrne F, Mc Donald C, McInerney S, Hallahan B. Clozapine-induced hypersalivation: an estimate of prevalence, severity and impact on quality of life. *Ther Adv Psychopharmacol.* 2016 Jun;6(3):178-84.

Silvestre-Rangil J, Silvestre FJ, Puente-Sandoval A, Requeni-Bernal J, Simó-Ruiz JM. Clinical-therapeutic management of drooling: Review and update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011; 16 (6): 763-6.

Srivanitchapoom P, Pandey S, Hallett M. Drooling in Parkinson's Disease: a review. *Parkinsonism Relat Disord*. 2014; 20 (11): 1109–1118.

Munhoz RP. Unusual motor and non-motor symptoms and signs in the early stage of Parkinson's disease. *Arq Neuropsiquiatr*. 2016; 74 (10): 781-784.

Dias BL, Fernandes AR, Filho HS. Sialorrhea in children with cerebral palsy. *J Pediatr (Rio J)*. 2016; 92(6):549-558.

Scott K, Shannon R, Roche-Green A. Management os sialorrhea in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Palliat Med*. 2016; 19(1):110-1.

Rahul VK, Mathew C, Jose S, Thomas G, Noushad MC, Feroz TP. Oral manifestation in mentally challenged children. *J Int Oral Health*. 2015 Feb; 7(2): 37-41.

Scully C, Limeres J, Gleeson M, Tomás I, Diz P. Drooling. *J Oral Pathol Med*. 2009; 38 (4): 321-7.

Hornibrook J, Cochrane N. Contemporary surgical management of severe sialorrhea in children. *Pediatr*. 2012; 2012:364875.

Arellano-Saldaña ME. Submandibular gland resection for the management of sialorrhea in paediatric patients with cerebral palsy and unresponsive to type A botulinum toxin. Pilot study. *Cir Cir*. 2016; 16: 30019-6.

Matsuoka MW, da Rocha SMS, Suzuki L, Barnewitz JP, Imamura R, de Oliveira LAM. Ultrasound guided injection of botulinum toxin into the salivary glands of children with neurological disorders. *Radiol Bras*. 2016 Mar-Apr; 49 (2): 131–132.

Mendes MR, Zabeu JS, Caldana ML, Berretin-Félix G, Brasolotto AG. Botox e atuação interdisciplinar. *Pet Informa*. 2010; 23 (3/4): 26-31.

Ko SW, Shin YB, Min JH, Shin MJ, Chang JH, Shin YI, Ko HY. Botulinum Toxin in the Treatment of Drooling in Tetraplegic Patients With Brain Injury. *Ann Rehabil Med*. 2013 Dec; 37(6): 796–803.

Frevert J. Pharmaceutical, biological, and clinical properties of botulinum neurotoxin type A products. *Drugs R D*. 2015; 15 (1):1-9.

Mihir K. Bhayani, MD, Dana L. Suskind, MD. The use of botulinum toxin in patients with sialorrhea. *Operative Techniques in Otolaryngology*. 2008; 19 (4): 243-247.

Ishida H, Zhang X, Erickson K, Ray P. Botulinum toxin type A targets RhoB to inhibit lysophosphatidic acid-stimulated actin reorganization and Acetylcholine release in nerve growth factor-treated PC12 cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004; 310 (3): 881-9.

Marxen P, Bigalke H. Tetanus and botulinum A toxins inhibit stimulated F-actin rearrangement in chromaffin cells. *Neuroreport*. 1991; 2(1):33-6.

Xu H, Shan XF, Cong X, Yang NY, Wu LL, Yu GY, Zhang Y, Cai ZG. Pre- and post-synaptic effects of botulinum toxin A on submandibular glands. *J Dent Res*. 2015; 94(10):1454-62.

Xie S, Xu H, Lin B, Wang K, Shan XF, Cai ZG. An Experimental Study on Botulinum Toxin Type A for the Treatment of Excessive Secretion after Submandibular Gland Transplantation in Rabbits. *J Ophthalmol*. 2016; 7058537; 1-8.

Humeau Y, Doussau F, Grant NJ, Poulain B. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. *Biochimie*. 2000; 82 (5): 427-46.

Takai N, Uchihashi K, Higuchi K, Yoshida Y, Yamaguchi M. Localization of neuronal-constitutive nitric oxide synthase and secretory regulation by nitric oxide in the rat submandibular and sublingual glands. *Arch Oral. Biol*. 1999; 44(9):745-50.

Chiba T, Tanaka, K. A target specific pathway from nitric oxide synthase immunoreactive preganglionic sympathetic to superior cervical ganglion neurons innervating the submandibular salivary gland. *J Autonomic Nerve Syst*. 1998; 71 (2-3): 139-47.

Ellies M, Schütz S, Quondamatteo F, Laskawi R. The effect of local injection of botulinum toxin A on the immunoreactivity of nNOS in the rat submandibular gland: An immunohistochemical study. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2006; 70 (1): 59-63.

Hirokawa N, Heuser Je, Evans L. Structural evidence that botulinum toxin blocks neuromuscular transmission by impairing the calcium influx that normally accompanies nerve depolarization. *J Cell Biol*. 1981 Jan 1; 88 (1): 160–171.

Dressler D, Saberi FA , Barbosa ER. Botulinum Toxin: Mechanisms of action. *Arq Neuropsiquiatr*. 2005; 63(1):180-185.

Al-Saleem FH, Ancharski DM, Ravichandran E, Joshi SG, Singh AK, Gong Y, Simpson LL. The role of systemic handling in the pathophysiologic actions of botulinum toxin. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008; 326 (3): 856-63.

Ravichandran E, Gong Y, Al Saleem FH, Ancharski DM, Joshi SG, Simpson LL. An initial assessment of the systemic pharmacokinetics of botulinum toxin. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 318 (3): 1343-51.

Blitzer A, Sulica L. Botulinum toxin: basic science and clinical uses in otolaryngology. *Laryngoscope*. 2001; 111(2): 218-26.

Thanongsaksrikul J, Chaicumpa W. Botulinum Neurotoxins and Botulism: A Novel Therapeutic Approach. *Toxins (Basel)*. 2011; 3 (5): 469–488.

Poulain B, Popoff MR, Molgo J. How do the botulinum neurotoxins block neurotransmitter release: from botulism to the molecular mechanism of action. *Botulinum J*. 2008; (1): 14-87.

Barbero P, Busso M, Tinivella M, Artusi CA, De Mercanti S, Cucci A, Veltri A, Avagnina P, Calvo A, Chio' A, Durelli L, Clerico M. Long-term follow-up of ultrasound-guided botulinum toxin-A injections for sialorrhea in neurological dysphagia. *J Neurol*. 2015; 262 (12): 2662-7.

Gómez-Caravaca MT, Cáceres-Redondo MT, Huertas-Fernández I, Vargas-González L, Carrillo F, Carballo M, Mir P. The use of botulinum toxin in the treatment of sialorrhea in parkinsonian disorders. *Neurol Sci*. 2015; 36 (2):275-9.

Jeung IS, Lee S, Kim HS, Yeo CK. Effect of botulinum toxin a injection into the salivary glands for sialorrhea in children with neurologic disorders. *Ann Rehabil Med*. 2012; 36(3):340-6.

Scheffer AR, Erasmus C, van Hulst K, van Limbeek J, Jongerius PH, van den Hoogen FJ. Efficacy and duration of botulinum toxin treatment for drooling in 131 children. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010; 136(9):873-7.

Khan WU, Campisi P, Nadarajah S, Shakur YA, Khan N, Semenuk D, McCann C, Roske L, McConney-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. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011; 137 (4): 339-44.

Ko EJ, Mun SK, Oh IY, Kwon TR, Kim BJ, Kim MN. Comparison of efficacy and diffusion

of three formulations of botulinum toxin type A in two patients with forehead hyperhidrosis. *Clin Exp Dermatol*. 2014 Jul; 39 (5): 673-5.

Tang X., Wan X. Comparison of Botox with a Chinese type A botulinum toxin. *Chin Med J*. 2000; 113(9): 794-798.

Schlereth T, Mouka I, Eisenbarth G, Winterholler M, Birklein F. Botulinum toxin A (Botox) and sweating-dose efficacy and comparison to other BoNT preparations. *Auton Neurosci*. 2005; 117 (2): 120-6.

Quagliato EM, Carelli EF, Viana MA. A prospective, randomized, double-blind study comparing the efficacy and safety of type a botulinum toxins botox and prosigne in the treatment of cervical dystonia. *Clin Neuropharmacol*. 2010; 33 (1): 22-6.

Rieder M, Schestatsky P, Socal M, Monte T, Fricke D, Costa J, Picon D. Estudo duplo-cego, randomizado e cruzado comparando prosigne e botox em pacientes com blefaroespasma e espasmo hemifacial. *Clinical Neuropharmacology*. 2007; 30 (1): 39-42.

Reddihough D, Erasmus CE, Johnson H, McKellar GM, Jongerius PH. Botulinum toxin assessment, intervention and aftercare for paediatric and adult drooling: international consensus statement. *Eur J Neurol*. 2010; 17 (2): 109-21.

Lee ZI, Cho DH, Choi WD, Park DH, Byun SD. Effect of botulinum toxin type a on morphology of salivary glands in patients with cerebral palsy. *Ann Rehabil Med*. 2011; 35(5): 636-40.

Bae GY, Yune YM, Seo K, Hwang SI. Botulinum toxin injection for salivary gland enlargement evaluated using computed tomographic volumetry. *Dermatol Surg*. 2013; 39(9): 1404-7.

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*. 1999; 256 (3): 148-152.

Ellies M, Laskawi R, Tormählen G, Götz W. The Effect of Local Injection of Botulinum Toxin A on the Parotid Gland of the Rat: An Immunohistochemical and Morphometric Study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000; 58 (11): 1251-1256.

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. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*. 2004; 18 (9):558-60.

Coskum S, Lendlein A, Rickert D, Scheithauer MO. Polymeric biomaterials in head and neck surgery: first results of biocompatibility testing of a degradable polymer in an animal model. *Laryngorhinootologie*. 2007; 86 (7): 507-14.

Teymoortash A, Sommer F, Mandic R, Schulz S, Bette M, Aumüller G, Werner JA. Intraglandular application of botulinum toxin leads to structural and functional changes in rat acinar cells. *Br J Pharmacol*. 2007; 152(1):161-7.

Younis RE, Abou Elkhier MT, Mourad MI, Elnahas W. The ultrastructural changes of the parotid gland of rats after intraglandular injection of botulinum toxin A. *Annals of Oral & Maxillofacial Surgery*. 2013; 1(4):38.

Wen WD, Yuan F, Hou YP. The mechanism of inhibitory effect on parotid gland secretion with local injection of botulinum toxin type A in the rat. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2009; 44(1): 38-40.

Shan XF, Xu H, Cai ZG, Wu LL, Yu, GY. Botulinum A inhibits submandibular gland secretion. *International J Oral Sci*. 2013; 5: 217–223.

Cardona I, Saint-Martin C, Daniel SJ. Effect of recurrent onabotulinum toxin A injection into the salivary glands: An ultrasound measurement. *Laryngoscope*. 2015; 125(10).

ANEXO A - CARTA DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8640 | 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

CCB: Integrar para desenvolver

ANEXO B - NORMAS DA REVISTA ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY

GUIDE FOR AUTHORS

Editors-in-Chief:

Dr G R Holland, Ann Arbor, MI, USA

Professor G B Proctor, London, UK

Archives of Oral Biology is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific

quality reporting new knowledge from the orofacial region including:

- developmental biology
- cell and molecular biology
- molecular genetics
- immunology
- pathogenesis
- microbiology
- biology of dental caries and periodontal disease
- forensic dentistry
- neuroscience
- comparative anatomy
- paeleodontology

Archives of Oral Biology will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will only consider clinical papers where they make a significant contribution to the understanding of a disease process. These guidelines generally follow the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals

Types of Contribution

Original papers and review articles are welcomed. There will be no differentiation on the basis of length into full or short communications. All submissions will be refereed.

Page charges

This journal has no page charges.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details. Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'

- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
 - Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
 - Relevant declarations of interest have been made
 - Journal policies detailed in this guide have been reviewed
 - Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements
- For further information, visit our Support Center.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed. All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Declaration of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work.

More information.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck.

Contributors

If there are four or more authors, then each is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that "All authors have read and approved the final article" should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final

approval of the version to be submitted.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals. Role of the funding source You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online. After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses: Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND) For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. The open access publication fee for this journal is USD 2500, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>. Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open

access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more. This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail. **PREPARATION**

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Manuscript Structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion for an original paper), Acknowledgments, Appendix, References, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

Introduction

This should be a succinct statement of the problem investigated within the context of a brief review of the relevant literature. Literature directly relevant to any inferences or argument presented in the Discussion should in general be reserved for that section. The introduction may conclude with the reason for doing the work but should not state what was done nor the findings.

Materials and Methods

Enough detail must be given here so that another worker can repeat the procedures exactly. Where the materials and methods were exactly as in a previous paper, it is not necessary to repeat all the details but sufficient information must be given for the reader to comprehend what was done without having to consult the earlier work. Authors are requested to make plain that the conditions of animal and human experimentation are as outlined in the "Ethics" and "Studies on Animals" sections above.

Results or Findings

These should be given clearly and concisely. Care should be taken to avoid drawing inferences that belong to the Discussion. Data may be presented in various forms such as histograms or tables but, in view of pressure on space, presentation of the same data in more than one form is unacceptable.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address.

Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.

- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes. As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible. Thus the animal species to which the observations refer should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic, histochemical, etc. A "running title" of not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

Structured abstract

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the

guidelines published in the Journal of the American Medical Association (JAMA 1995; 273: 27-34). In brief, the abstract should be divided into the following sections: (1) Objective; (2) Design - if clinical, to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome measures, etc.; if laboratory research, to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

As Archives of Oral Biology is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below, should be avoided if possible. Examples of abbreviations which may be used without definition: ADP, AMP, ATP, DEAEcellulose, DNA, RNA, EDTA, EMG, tris. Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page. Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements: Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa]. It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Bacterial nomenclature

Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and in italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not 'Staph. aureus'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear, the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the Int J Syst Bacteriol since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text

(for an example see *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case Roman not italic, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to use italics e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. 'salmonellae'; plurals may be anglicized e.g. 'salmonellas'. For trivial names, use lower case Roman e.g. 'meningococcus' **Artwork**

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts. TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi. Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Illustration services

Elsevier's WebShop offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more. Tables Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the

end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/archives-of-oral-biology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered online or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication. Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

AUTHOR INFORMATION PACK 16 Oct 2016 www.elsevier.com/locate/archoralbio 11

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Reference to a website:

Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003). <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> Accessed 13.03.03.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Offprints The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Statistical analysis

Authors should ensure that the presentation and statistical testing of data are appropriate and should seek the advice of a statistician if necessary. A number of common errors should be avoided, e.g.: -

- Use of parametric tests when non-parametric tests are required
- Inconsistencies between summary statistics and statistical tests such as giving means and standard deviations for data which were analysed with non-parametric tests.
- Multiple comparisons undertaken with multiple t tests or non-parametric equivalents rather than with analysis of variance (ANOVA) or non-parametric equivalents.
- Post hoc tests being used following an ANOVA which has yielded a non-significant result.
- Incomplete names for tests (e.g. stating "Student's t test" without qualifying it by stating "single sample", "paired" or "independent sample")
- N values being given in a way which obscures how many independent samples there were (e.g. stating simply $n=50$ when 10 samples/measurements were obtained from each of 5 animals/human subjects).
- Stating that $P=0.000$ (a figure which is generated by some computer packages). The correct statement (in this case) is $P<0.0005$.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.