

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MESTRADO EM CLÍNICA INTEGRADA

ISIS REGINA CYPRIANO DE MELO

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TOXINA BOTULÍNICA TIPO A EM
GLÂNDULA SUBMANDIBULAR DE RATOS: ESTUDO BACTERIOLÓGICO

Recife – PE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MESTRADO EM ODONTOLOGIA - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA

INTEGRADA

ISIS REGINA CYPRIANO DE MELO

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TOXINA BOTULÍNICA TIPO A EM
GLÂNDULA SUBMANDIBULAR DE RATOS: ESTUDO BACTERIOLÓGICO

Dissertação apresentada ao Colegiado da Pós-Graduação
em Clínica Integrada do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para
obtenção do grau de mestre em Clínica Odontológica Integrada.

Orientador (a): Prof. (a) Dr. (a) Liriane Baratella Evêncio

Co-orientador (a): Prof. (a) Dr. (a) Flávia Regina Gonçalves de
Araújo

Recife –PE

2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária Mônica Uchôa, CRB4-1010

M528a

Melo, Isis Regina Cypriano de.

Avaliação da influência da toxina botulínica tipo A em glândula submandibular de ratos: estudo bacteriológico / Isis Regina Cypriano de Melo. – Recife: O autor, 2014.

29 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Liriane Baratella Evêncio.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Pós-graduação em Odontologia, 2014.

Inclui referências e anexos.

1. Glândula submandibular. 2. Toxina Botulínica Tipo A. 3. Microbiota. 4. Rato. I. Evêncio, Liriane Baratella (Orientadora). II. Título.

617.6 CDD (22.ed.)

UFPE (CCS2014-225)

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TOXINA BOTULÍNICA TIPO A EM
GLÂNDULA SUBMANDIBULAR DE RATOS: ESTUDO BACTERIOLÓGICO

ISIS REGINA CYPRIANO DE MELO

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 25 DE FEVEREIRO DE 2014

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA:

Prof. (a) Dr. (a) ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO

Prof. (a) Dr. (a) CÉLIA MARIA MACHADO BARBOSA DE CASTRO

Prof. Dr. DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ

Recife –PE

2014

Dedico este trabalho à minha querida família: Marly, Joás, Isabel, Iris e Thiago.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço primeiramente a Deus por ter permitido todas as minhas conquistas até agora. A Ele toda honra e glória! Agradeço aos meus pais, Joás e Marly por tudo o que fizeram e fazem em prol do meu crescimento pessoal e profissional. Eu amo vocês!

Às minhas irmãs, Iris e Isabel que sempre estavam do meu lado, me apoiando em todos os momentos da minha vida.

Ao meu esposo, Thiago que sempre me ajudou, me apoiou em todos os momentos e sempre se orgulhou da minha luta.

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

Ao CAPES/CNPq pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

À minha orientadora, Liriane Baratella Evêncio, por ser um exemplo de pessoa, pela sua paciência, ensinamento e confiança em mim. À minha co-orientadora, Flávia Regina Gonçalves de Araújo, pela imensa contribuição neste trabalho, pelo conhecimento compartilhado e dedicação em me ajudar.

À Fátima e aos colegas do laboratório do Lika por terem aberto seus espaços, sempre estarem dispostos a me ajudar em tudo e por compartilhar o saber em microbiologia comigo.

A Dra. Célia Castro por ter permitido realizar a minha pesquisa no Lika e por todo apoio.

Ao biotério do centro de cirurgia experimental da UFPE e ao Sr. Paulo que sempre estava disposto a ajudar no tratamento dos animais.

Aos meus companheiros do grupo de pesquisa, Jaciel Oliveira, Luciana Regueira, Priscilla Suelen e José Neto pela grande ajuda na elaboração do projeto e durante a fase experimental.

Aos meus amigos do grupo de discipulado e do coral que muitas vezes sentiram minha falta e continuaram orando em meu favor.

Aos amigos que fiz no mestrado, amo todos vocês e espero sempre nos encontrarmos. Sentirei muitas saudades de vocês e das nossas aulas.

Por fim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram e participaram da elaboração e conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	12
3. OBJETIVO GERAL	14
3.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
6. CONCLUSÕES	25
REFERÊNCIAS	26
ANEXOS	29

RESUMO

Pacientes portadores de distúrbios neurológicos apresentam dificuldade de contenção de saliva, hipersalivação ou sialorréia. Uma nova opção terapêutica para o tratamento destes pacientes surge com a aplicação de toxina botulínica em glândulas salivares com objetivo de reduzir a quantidade de saliva dos mesmos. Por outro lado, sabe-se que, ao diminuir a salivação pode-se favorecer a modificação de algumas espécies bacterianas. Assim sendo este trabalho objetivou estudar a composição bacteriana da saliva de ratas quando submetidas à injeção intraglandular de toxina botulínica tipo A em glândulas submandibulares. Para tal, foram utilizadas 30 ratas albinas (Wistar), divididas em três grupos: grupo I (controle), grupo II (tratado com gelatina bovina a 0,1 ml) e grupo III (tratado com toxina botulínica 2,5U, diluído em 0,1ml de soro fisiológico). Os grupos II e III foram subdivididos de acordo com o tempo de tratamento em grupos com 15 e com 28 dias. Coletas da microbiota oral foram realizadas na saída do ducto da glândula submandibular direita através de “swab” antes, e com 15 e 28 dias após o tratamento. Os resultados mostraram que o percentual de UFCs no grupo I foi de 18%, no grupo II foi de 16% no 15º dia e 17% no 28º. No grupo III foi de 24% no 15º dia e 25% no 28º dia, ocorrendo um aumento significativo das mesmas no grupo III ($p < 0,05$). Na comparação das espécies bacterianas, houve uma maior variedade no grupo III em relação ao grupo controle e ao grupo II ($p < 0,05$). As espécies bacterianas mais frequentes no grupo I foram *E. viridans* (42,86%), seguidas da *S. aureus* (28,57%). No grupo III, ao 15º dia houve a presença da *S. saprophyticus* (33,33%), seguido de *E. bovis* (22,22%) e, no grupo II, ao 28º dia houve uma maior porcentagem das bactérias do grupo *viridans*, com frequência de 75% do total de bactérias ($p < 0,05$). Ocorreu ainda o surgimento de bactérias gram-negativas no grupo III, que não foi observada nos grupos I e II. Concluiu-se que, a toxina botulínica interferiu na microbiota oral das ratas, alterando-a quantitativa e qualitativamente. Ao passo que, quando tratadas com gelatina bovina constatou-se uma alteração qualitativa das espécies bacterianas encontradas.

Palavras-chave: Glândula Submandibular. Toxina Botulínica Tipo A. Microbiota. Rato.

ABSTRACT

Patients with neurological disorders have difficulty containing saliva, hypersalivation or drooling. A new therapeutic option for the treatment of these patients arises with the application of botulinum toxin in the salivary glands in order to reduce the amount of saliva thereof. On the other hand, it is known that decreasing salivation can favor the modification of the bacterial species. Therefore this study aimed to investigate the bacterial composition of the saliva of rats when subjected to intraglandular injection of botulinum toxin type A in submandibular glands. To this end, 30 albino rats (Wistar) were divided into three groups were used: group I (control), group II (treated with bovine gelatin 0.1 ml) and group III (treated with 2.5U botulinum toxin, diluted in 0.1 ml saline). Groups II and III were subdivided according to the duration of the treatment groups at 15 and 28 days. Collecting the oral microflora was performed at the output of the right submandibular gland duct through "swab" before, and 15 and 28 days after treatment. The results showed that the percentage of UFC in group I was 18% in group II was 16% in 15th and 17% in 28th. In group III was 24% at day 15 and 25% at day 28, a significant increase occurring in the same group III ($p < 0.05$). In the comparison of bacterial species, there was a greater variety in group III compared to the control group and group II ($p < 0.05$). The most common bacterial species in group I was *E. viridans* (42.86 %), followed by *S. aureus* (28.57%). In group III, the 15th day there was the presence of *S. saprophyticus* (33.33%) , followed by *Streptococcus bovis* (22.22%) and in group II, the 28th day there was a higher percentage of strains of *viridans* group, often 75% of the total bacteria ($p < 0.05$). The emergence of gram-negative bacteria also occurred in group III, which was not observed in groups I and II. It was concluded that botulinum toxin interfered in the oral microbiota of rats, altering it qualitatively and quantitatively. Whereas when treated with bovine gelatin found a qualitative change of the bacterial species found.

Keywords: Submandibular gland. Botulinum Toxins, Type A. Microbiota. Rats.

1. INTRODUÇÃO

Xerostomia é um sintoma comum em pacientes que possuem redução da produção de saliva (hipossalivação) e está relacionada a inúmeros fatores de origem sistêmica ou induzida por medicações. Dentre os fatores primários que podem levar o indivíduo à hipossalivação está o uso de drogas que reduzem o fluxo salivar, como é o caso dos psicotrópicos, algumas doenças auto-imunes (Síndrome de Sjögren) e a radioterapia de cabeça e pescoço (Lopes *et al.*, 2008). Além destes fatores primários, podem coexistir outros, secundários, que associados aos primários podem levar o paciente a piorar o seu quadro de xerostomia, como: ansiedade crônica, a depressão, hemodiálises, desidratação e *diabetes mellitus* (Berti-Couto *et al.*, 2012).

Por outro lado, alguns pacientes, principalmente aqueles que possuem paralisia cerebral ou que apresentam a doença de Parkinson, possuem um sinal clínico de dificuldade de deglutição, a qual acaba por gerar um acúmulo de saliva na cavidade oral, podendo ocorrer também seu escape extraoral (Menezes *et al.*, 2012). Estes pacientes, muitas vezes, necessitam de uma intervenção terapêutica para o tratamento desta condição e para a melhoria de sua qualidade de vida.

Estudos recentes mostraram que para sialorréia, novos tratamentos, como injeção de toxina botulínica do tipo A (BTX-A), têm sido aplicados em glândulas salivares de alguns animais e de seres humanos. Em ratos, os estudos se ativeram a verificação de alterações tissulares na glândula (Teymoortash *et al.*, 2007). Em humanos, o tratamento foi utilizado para sialorréia extensa em pacientes que possuíam paralisia cerebral e que apresentavam dificuldade na deglutição de saliva (Corso *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2011; Torres, *et al.*, 2007).

A toxina botulínica do tipo A (BTX-A) é uma droga que age na inibição da liberação de acetilcolina na junção neuroglandular (parassimpatectomia química) e produz uma redução do fluxo salivar, já que a toxina botulínica inibe seletivamente os componentes colinérgicos (Ellies *et al.*, 2002; Teymoortash *et al.*, 2007). Este tratamento com a toxina botulínica, portanto, consiste em uma desnervação farmacológica das glândulas salivares.

Todos os estudos científicos das glândulas salivares utilizaram a formulação da toxina botulínica americana (Ellies *et al.*, 2002; Jangerius *et al.*, 2004; Savarese *et al.*, 2004). Mas, recentemente, foi lançada no Brasil outra formulação da toxina botulínica do tipo A, de origem chinesa e liberada pela Anvisa. Essa toxina é conhecida como *PROSIGNE*®,

produzida pela empresa farmacêutica estatal chinesa *LANZHOU INSTITUTE OF BIOLOGICAL PRODUCTS (LIBP)* e comercializada no Brasil pela empresa farmacêutica Cristália, com o diferencial de utilizar a gelatina bovina como veículo.

A cavidade oral de ratos apresenta uma variada população microbiana. Estas bactérias são consideradas endógenas. Entretanto, quando existe um desequilíbrio entre os microrganismos e o hospedeiro, um processo inflamatório, ou mesmo, quando ocorre uma mudança na estrutura da cavidade oral, essas bactérias tornam-se patógenas ao organismo (Araújo *et al.*, 2009).

Alguns quadros de infecções bucais podem se instalar devido à redução de saliva, principalmente pela diminuição do efeito-tampão que a saliva realiza quando em quantidades normais. Isso leva a um pH ótimo para a proliferação de microrganismos causadores de doenças oportunistas na cavidade oral, principalmente as bactérias que causam cárie e fungos, do gênero *Candida*, levando à candidíase.

Assim sendo, o presente estudo teve como objetivo estudar a composição bacteriana da saliva de ratas após o tratamento com injeção intraglandular de toxina botulínica do tipo A em glândulas submandibulares, a fim de verificar se houve modificação na quantidade e nos tipos bacterianos encontrados na cavidade oral destes animais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O acúmulo de saliva é um achado frequente em pacientes portadores de distúrbios neurológicos, principalmente aqueles com algum tipo de paralisia cerebral e entre os pacientes com doença de Parkinson. Devido às alterações sensório-motoras que acompanham estas doenças, podem ocorrer aspirações silenciosas conduzindo o paciente a riscos maiores de infecções pulmonares e maior desconforto, sendo necessário o seu tratamento (Manrique, 2005).

Neste contexto, certas doenças neurológicas, como paralisia cerebral, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, acidente vascular encefálico, encefalopatias crônicas progressivas ou não progressivas e miastenia gravis podem causar um preocupante quadro clínico de escape salivar (Jangerius *et al.*, 2004; Ellies *et al.*, 2006; Teymoortash *et al.*, 2007).

Nesses casos, a diminuição da secreção salivar por tratamento farmacológico pode ser uma grande ajuda (Ellies *et al.*, 2006) mas, se não for realizada de uma maneira eficaz e com um conhecimento da administração destas drogas, pode acabar ocorrendo um quadro de xerostomia, onde alguns microrganismos podem proliferar e causar doenças oportunistas.

Existem dois tipos de sialorréia: a sialorréia reativa que é resultante de alguns distúrbios na face de deglutição da saliva, comum nas sequelas neurológicas, particularmente naquelas associadas a distúrbios do movimento e a sialorréia absoluta, que é resultante de uma alteração neurogênica na inervação da glândula salivar (Sposito, 2004).

Uma nova opção terapêutica surge, portanto, para ajudar no tratamento de pacientes que possuem sialorréia. Este tratamento é realizado com a aplicação intraglandular da toxina botulínica do tipo A (BTX-A) em glândulas salivares parótidas e submandibulares e administrados diluídos em solução salina (Savarese *et al.*, 2004).

Estudos realizados por Ellies (2002) e Teymoortash (2007) mostraram que o tratamento com a toxina botulínica consiste em uma desnervação farmacológica das glândulas salivares, ocorrendo uma inibição da liberação de acetilcolina na junção neuroglandular (parassimpatectomia química) e produz uma redução no fluxo salivar através de uma inibição seletiva dos componentes colinérgicos.

Atualmente, os estudos científicos das glândulas salivares utilizam a formulação da toxina botulínica americana (Ellies *et al.*, 2002; Jangerius *et al.*, 2004; Savarese *et al.*, 2004). Mas, recentemente, foi lançada no Brasil outra formulação da toxina botulínica do tipo A, de origem chinesa e liberada pela Anvisa. Essa toxina é conhecida como *PROSIGNE*[®], produzida pela empresa farmacêutica estatal chinesa *LANZHOU INSTITUTE OF BIOLOGICAL PRODUCTS (LIBP)* e comercializada no Brasil pela empresa farmacêutica Cristália, cujo diferencial é a utilização de gelatina bovina como veículo.

Um estudo realizado por Savarese *et al.* (2004) confirmou que os resultados do uso da toxina botulínica tipo A em injeções intraglandulares nas parótidas e submandibulares em humanos, guiadas ou não pelo método de ultrassonografia, levaram a melhora dos sintomas de sialorréia na maioria dos pacientes tratados.

Além disso, a necessidade de usar uma forma terapêutica mais conservadora sem que haja a extração de glândulas salivares, proporcionou a utilização de uma formulação de mais

fácil acesso pelos pacientes, com baixo custo e conforto na aplicação do tratamento (Corso *et al.*, 2011).

A escassez de estudos sobre a influência microbiológica do uso da toxina botulínica na saliva dos indivíduos traz questionamentos a sua aplicabilidade terapêutica, tornando-se desta forma necessária uma análise mais acentuada das possíveis mudanças na microbiota oral dos indivíduos tratados.

A cavidade oral de ratos apresenta uma variada população microbiana. Estas bactérias são consideradas endógenas. Entretanto, quando existe um desequilíbrio entre os microrganismos e o hospedeiro, um processo inflamatório, ou mesmo, quando ocorre uma mudança na estrutura da cavidade oral, essas bactérias tornam-se patógenas ao organismo (Araújo *et al.*, 2009).

Vários estudos foram realizados para se verificar quais eram os tipos bacterianos mais comuns da cavidade oral em ratos. Araújo *et al.* (2007) observaram que a espécie *Bacillus sp.*(31,2%) era a mais comum na cavidade oral dos ratos estudados seguidos da espécie *S. aureus* (17,3%). A maioria das bactérias presentes nesta pesquisa eram gram-positivas (91,2%) e as gram-negativas perfaziam um total de 8,8%. Porto *et al.* (2007) realizaram um estudo semelhante e verificaram que a espécie mais prevalente foi a *Bacillus sp.*, sendo que o *S. aureus* encontrava-se na quarta posição. Em relação à quantidade de bactérias gram-positivas e gram-negativas foi visto que, na cavidade oral de ratos os percentuais eram de 70% e 30% respectivamente.

Dado ao exposto, este trabalho visa estudar se houve alguma mudança na população microbiana da saliva de ratos antes e após o tratamento com a toxina botulínica.

3. OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve por objetivo estudar a composição bacteriana da saliva de ratas quando submetidas à injeção intraglandular de toxina botulínica tipo A em glândulas submandibulares.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar as modificações qualitativas e quantitativas das UFC's que cresceram nas placas de Petri antes e após a aplicação da gelatina bovina;
- Estudar as modificações qualitativas e quantitativas das UFC's que cresceram nas placas de Petri antes e após a aplicação da toxina botulínica do tipo A;
- Observar o crescimento e os tipos de bactérias encontradas na microbiota oral normal das ratas estudadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Considerações Éticas

Esta pesquisa foi submetida e aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEa-UFPE), sob o processo nº 23076.045320/2012-52.

Tipo de Estudo e Animais

Foi realizado um estudo do tipo experimental, descritivo e analítico quantitativo. Para tal utilizou-se 30 ratas fêmeas, adultas e saudáveis da linhagem Wistar, com peso entre 300-360g, provenientes do Biotério do Departamento de Nutrição da UFPE. Estes animais foram alimentados com a dieta padrão do biotério (Labina[®] – Purina do Brasil S/A, São Paulo, Brasil), onde obtiveram livre acesso à ração e água, mantidos em gaiolas de polipropileno com tampa de arame zincado, com temperatura de 23 +/- 2° C, respeitando o ciclo dia/noite de 12 h 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 divididos em três grupos: o grupo I (controle, n=6), que não receberam tratamento; o grupo II (grupo gelatina bovina, n=12), submetidos a injeção intraglandular do veículo – gelatina bovina e; o grupo III (grupo BTX-A, n=12), tratados com

injeção intraglandular de toxina botulínica do tipo A. Em seguida, o grupo II e o grupo III foram divididos em 2 sub-grupos de 6 animais, de acordo com tempo de tratamento: subgrupo com 15 dias e de 28 dias após a administração da droga.

Coleta da Microbiota Oral

Inicialmente, os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (10 mg/kg de peso) + cloridrato de xilazina (0,5 mg/kg de peso), associados na mesma seringa e administrados por via intraperitoneal. Após a obtenção do efeito anestésico, a mesa operatória foi previamente coberta com um campo cirúrgico esterilizado e o animal posicionado sobre a mesma em decúbito dorsal (Araújo *et al.*, 2007). Este posicionamento facilitou a abertura bucal e o afastamento da língua, permitindo assim, a realização da coleta da microbiota oral correspondente à saída do ducto da glândula submandibular direita através de um “swab” embebido em 40µL de solução de NaCl 0,9% estéril (Fig. 1).



Figura 1. Coleta por meio de “swab” embebido em NaCl 0,9%.

A coleta na saída do ducto foi necessária para avaliar a modificação de microbiota específica na região submandibular e se houve alguma alteração na glândula com a presença de bactérias responsáveis por algum tipo de infecção. Em seguida, este “swab” foi colocado em um tubo estéril contendo 460µL de Brain Heart Infusion (BHI). Estes 500µL foram homogeneizados e 100µL destes foram transferidos para outro tubo estéril contendo 900µL de BHI (Fig. 2).



Figura. 2. Tubo de ensaio estéril contendo o meio de BHI.

Estes 1000 μ L foram homogeneizados e com o auxílio de uma alça calibrada estéril de 1 μ L, foram semeadas placas de Petri contendo Ágar Sangue e Ágar Levine para isolamento das bactérias gram-positivas e gram-negativas, respectivamente. Após, estas placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas o que permitiu a obtenção do crescimento bacteriano (Fig. 3).



Figura. 3. Placas de Petri semeadas e armazenadas em estufa bacteriológica contendo os meios Ágar Sangue e Ágar Levine.

A seguir, 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 (Fig. 4 a, b).



Figura. 4. Em a, componentes do Kit para coloração de Gram. Em b, preparações fixadas e coradas pelo método de Gram.

Este procedimento foi realizado antes do tratamento da glândula submandibular direita para (Grupo I), no 15^o e 28^o dias após o tratamento para os grupos II e III.

Tratamento dos Animais

Foi realizada antissepsia na região cervical dos animais com clorexidina 2%. A seguir, aplicou-se injeção intraglandular de 0,1 ml de gelatina bovina na região mediana da glândula submandibular direita dos animais do grupo II. Nos animais do grupo III, a glândula submandibular direita recebeu injeção de toxina botulínica do tipo A - 2,5U (Prosigne[®], São Paulo, São Paulo, Brasil) na região mediana, reconstituída em 0,1 ml de solução salina (Manrique, 2005). O frasco de BTX-A utilizado para o procedimento foi o frasco ampola com 100U da toxina diluída em 2,0 ml de solução salina.

Análise dos Aspectos Bacteriológicos

As unidades formadoras de colônias (UFC) que cresceram nas placas de Petri foram enumeradas por um contador manual de colônias sob lupa e os seus percentuais calculados (Fig. 5). Para identificação das bactérias gram-negativas foi utilizado o Kit enterobactéria (Laborclin[®], Pinhais, Paraná, Brasil). Para as bactérias gram-positivas empregaram-se os testes: Staphclin, Novobiocina e Optoquina (Laborclin[®], Pinhais, Paraná, Brasil); Ágar Bile Esculina (Newprov[®], Pinhais, Paraná, Brasil) e NaCl 6,5%. As preparações obtidas através dos esfregaços foram coradas pelo método de Gram, o qual permitiu identificar os arranjos e as formas bacterianas.

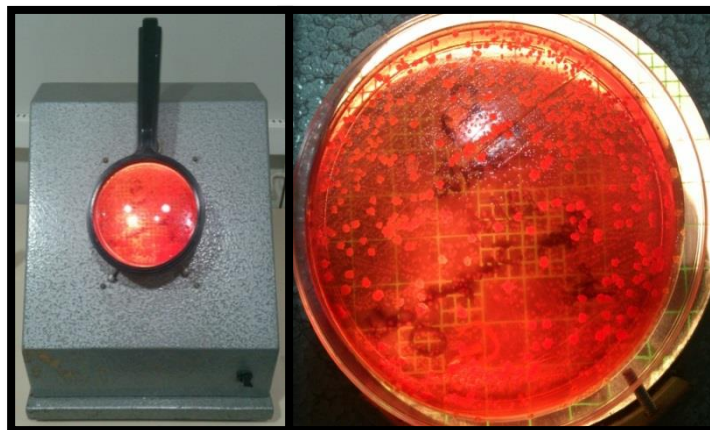


Figura 5. Contador manual de colônias sob lupa.

Análise Estatística

A análise estatística de dados foi realizada através de um estudo descritivo, analítico quantitativo, permitindo verificar o número de UFC em cada grupo e quais eram as espécies bacterianas presentes nos mesmos. Inicialmente, utilizou-se o Teste de Normalidade Shapiro-Wilk, que permitiu verificar a normalidade da variável UFC (Field, 2009). Após, foram empregados os Testes de Mann-Whitney na comparação dos dados não paramétricos e o Teste T de amostras independentes para os dados paramétricos. Além disso, utilizou-se o teste de Independência Qui-quadrado para avaliar o surgimento das diferentes espécies bacterianas em cada grupo. Em todos os testes estatísticos foi considerado um nível de significância de 5% (Field, 2009).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, a região de escolha da aplicação da toxina botulínica e da gelatina bovina foi a glândula submandibular do lado direito. Um estudo realizado em humanos, que avaliaram o local de aplicação da toxina botulínica A, observaram que são mais comuns as aplicações realizadas em glândulas submandibulares, pois esta glândula é responsável por uma maior produção salivar quando o paciente está em repouso (Moura *et al.*, 2007). Manrique (2005) constatou que a aplicação em apenas uma glândula submandibular era necessária para a obtenção do resultado favorável de diminuição salivar. A coleta

microbiológica realizada no estudo ocorreu na região da saída do ducto da glândula submandibular, por acreditar que a coleta em uma região específica da cavidade oral apresentaria um resultado mais fiel. Além disso, a diminuição do fluxo salivar permite a migração retrógrada de bactérias.

A gelatina bovina foi utilizada isoladamente no grupo II, por ser um dos componentes utilizados como veículo na administração da droga. O fabricante refere que a gelatina bovina foi eleita como veículo por diminuir o poder da difusão da toxina botulínica, aumentando o efeito local por mais tempo. Entretanto, não há estudos avaliando os efeitos deste veículo no parênquima glandular.

Em relação à quantidade de UFCs que cresceram nas placas de Petri, os dados obtidos nesta pesquisa demonstraram que o percentual de UFCs no grupo I (controle) foi de 18%. No grupo II (gelatina bovina) o percentual de UFCs foi de 16% no 15º dia e de 17% no 28º dia. No grupo III (BTX-A), o percentual foi de 24% no 15º e de 24% no 28º dia. A partir destes resultados pode-se constatar que o percentual de UFC no grupo III aumentou significativamente ($p < 0,05$) como é observada na Figura 1.

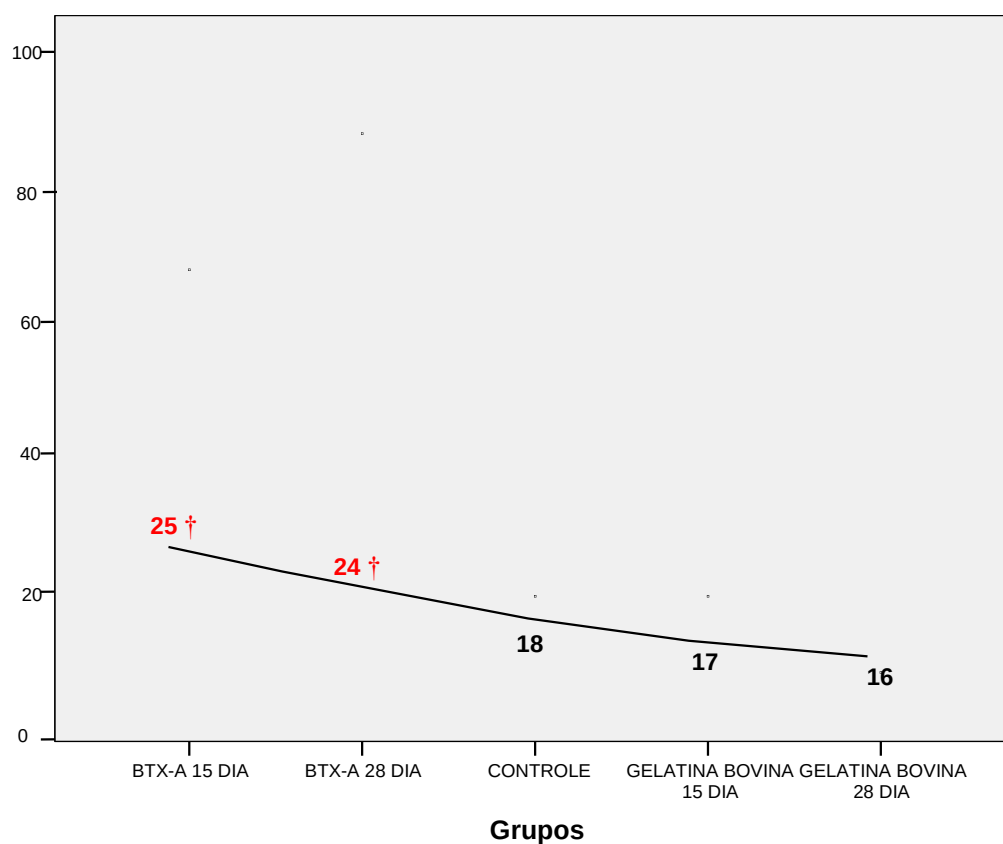


Figura 1. Percentual de espécies bacterianas presentes nos grupos controle, gelatina bovina e BTX-A. † = $p < 0,05$.

O critério utilizado para a divisão dos subgrupos em 15 e 28 dias após o tratamento, baseia-se em estudos referidos por Carvalho *et al.* (2011), no qual ao 15º dia a droga apresentou seu pico máximo de ação, e de acordo com Alter (2010), o qual relatou que a glândula retornou ao seu estado original aos 28/30 dias após a administração da droga.

Alter (2010), Blitzer e Sulica (2001) afirmaram que a toxina botulínica tipo A aplicada em glândulas submandibulares e em glândulas parótidas de humanos foi capaz de desencadear aumento de volume nas mesmas e xerostomia, principalmente quando aplicadas nas glândulas esquerda e direita, simultaneamente. Entretanto, nada foi relatado a respeito de alterações na microbiota oral endógena. Baseado nestes estudos elegeu-se a aplicação da droga apenas na glândula submandibular direita. Este achado pode estar relacionado a uma menor quantidade de saliva apresentada após a aplicação da BTX-A e, consequente aumento da viscosidade salivar, gerando uma maior concentração de placa bacteriana e, consequentemente um maior percentual de bactérias no meio oral (Sousa *et al.*, 2003).

Em relação às espécies bacterianas mais frequentes na cavidade oral das ratas, pôde-se constatar nesta pesquisa (Tab. 1), que no grupo controle aquelas de maior frequência foi a do

grupo *E. viridans* (42,86%), seguidas da *S. aureus* (28,57%). O que não condiz com os estudos de Araújo *et al.* (2007) e Porto *et al.* (2007), os quais fizeram um estudo em ratos da mesma linhagem e observaram que no grupo controle o maior crescimento foi de *Bacillus sp.* (31,2%). Araújo *et al.* (2007) observou a presença do *S. aureus* (17,3%) como a segunda espécie mais frequente na cavidade oral de ratos a qual também foi encontrada neste estudo. Esta diferença em relação à espécie mais frequente, provavelmente, deveu-se ao fato da coleta da microbiota oral incluir a superfície dentária. Esta certamente apresenta espécies bacterianas diferentes daquelas coletadas na altura da saída do ducto da glândula submandibular, como foi realizado nesta pesquisa.

Por outro lado, no grupo da toxina botulínica ao 15º dia foram evidenciados a *S. saprophyticus* (33,33%), seguido de *E. bovis* (22,22%) (Tab. 1). No que diz respeito ao *S. saprophyticus*, espécie bacteriana não comum na cavidade oral de ratos e envolvida em processos de infecção foi evidenciada em pequena quantidade por Araújo *et al.* (2007). Desta maneira, seu surgimento deve ter ocorrido devido ao aumento da concentração da toxina botulínica, que atinge seu maior nível no 15º dia após sua aplicação ($p < 0,05$). O aumento da concentração da toxina botulínica pode ter ocasionado em diminuição da secreção salivar, com consequente influência na população bacteriana da cavidade oral destes animais. Com relação ao *Streptococcus bovis*, esta é considerada uma bactéria oportunista segundo (Marino *et al.*, 2009), visto que foi encontrada na microbiota dos animais do grupo controle. No entanto, sabe-se que diante de qualquer desequilíbrio existente na cavidade oral, estas espécies são capazes de se multiplicar e apresentar atividade patogênica (Araújo *et al.*, 2009).

O teste Qui-Quadrado mostrou que o *Streptococcus grupo viridans* sofreu uma grande influência pelo tratamento da gelatina bovina, tanto no 15º dia, quanto no 28º dia ($p < 0,05$). Este achado pode estar relacionado à composição dos componentes deste veículo, pois a gelatina bovina está associada a outras substâncias (sacarose e dextrana) que podem servir de substrato para o crescimento significativo das espécies que compõem o grupo *viridans*, visto que este grupo é frequentemente encontrado em placas bacterianas e pode provocar a cárie (Reis e Melo, 2003).

Tabela 1. Percentual bacteriano na saliva dos animais pertencentes aos grupos I, II e III.

ESPÉCIES	GRUPOS					
	BTX-A 15º dia	BTX-A 28º dia	CONTROLE	GELATINA BOVINA 15º dia	GELATINA BOVINA 28º dia	TOTAL POR GRUPO
<i>Bacillus sp.</i>		28,57		18,18		8,70
<i>Corynebacterium sp.</i>	16,67		7,14			5,80
<i>E. aerogenes</i> **		14,29				2,90
<i>Enterococcus sp.</i>	5,56		7,14			2,90
<i>Streptococcus bovis</i>	22,22	14,29	14,29	9,09		13,04
<i>Streptococcus grupo viridans</i> *	11,11	14,29	42,86	45,45 [†]	75,00 [†]	34,78
<i>Pseudomonas sp.</i> **		7,14				1,45
<i>S. aureus</i>	11,11	21,43	28,57	9,09	16,67	17,39
<i>S. epidermis</i>				9,09		1,45
<i>S. saprophyticus</i>	33,33 [†]				8,33	10,14
<i>S. coagulase negative</i>				9,09		1,45
Total	100	100	100	100	100	100

* Grupo viridans: *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. salivarius* e *S. anginosus*. ** Bactérias Gram-negativas. [†] = $p < 0,05$.

Do ponto de vista experimental, a maioria dos estudos foi em ratos, pois sabe-se que as fêmeas são mais resistentes a processos inflamatórios/infecciosos (Acampora *et al.*, 2004). Entretanto, nesta pesquisa, optou-se por utilizar ratas com o intuito de verificar se a aplicação de toxina botulínica seria capaz de promover alterações na microbiota oral das mesmas. Estas foram visivelmente demonstradas nos resultados microbiológicos obtidos neste estudo, tanto do ponto de vista quantitativo, quanto qualitativo.

Na observação de espécies gram-positivas e gram-negativas, foi observada a existência de 100% de bactérias gram-positivas no grupo controle, 82% no grupo III e 100%

no grupo II. Estes dados podem ser observados na Figura 2 e demonstram um aparecimento de bactérias gram-negativas após a administração da toxina botulínica e coleta do material nos 15º e 28º dias. No grupo controle foi observado que todas as espécies encontradas foram gram-positivas o que não foi visto no trabalho de Porto *et al.* (2007), onde a população de bactérias gram-positivas e gram-negativas foram de 70% e 30% respectivamente. Percentuais mais semelhantes aos desta pesquisa foi observado no trabalho de Araújo *et al.* (2007), onde bactérias gram-positivas perfaziam um total de 91,2% e o percentual de bactérias gram-negativas foi de 8,8%.

Nos dois sub-grupos do grupo III, pode-se verificar um surgimento de bactérias gram-negativas e uma diminuição da quantidade de gram-positivas. As bactérias gram-negativas, pela sua própria composição, apresentam uma atividade patogênica maior que as gram-positivas, sendo menos sensíveis à medicação anti-bacteriana e apresentando uma maior capacidade de se adequarem ao meio em que se encontram (Vargas *et al.*, 2004).

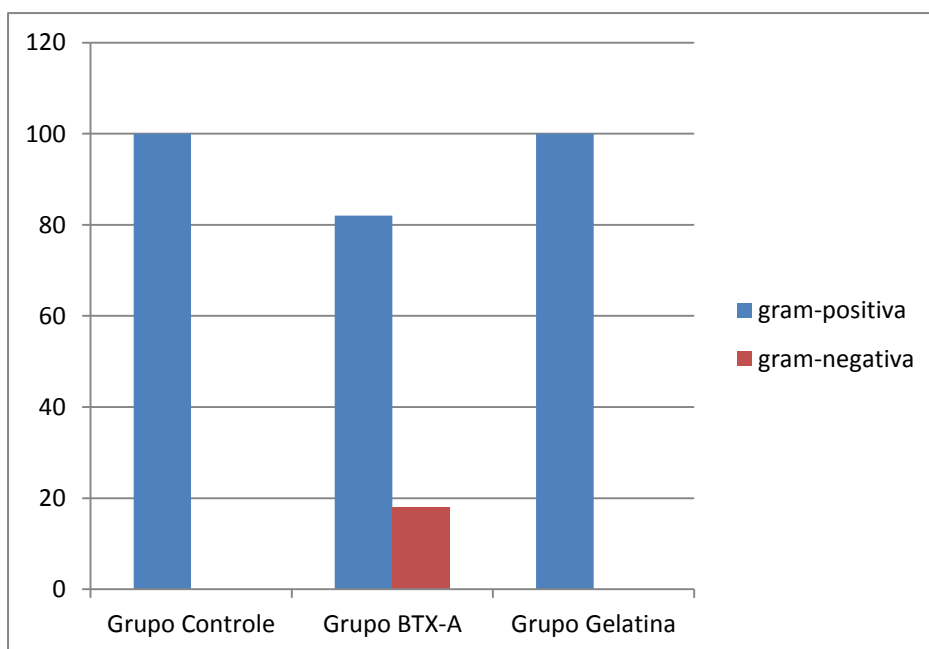


Figura 2. Percentual de bactérias gram-positivas e gram-negativas.

6. CONCLUSÕES

Concluiu-se que a toxina botulínica interferiu na microbiota oral das ratas estudadas, modificando quantitativamente o percentual de UFCs e alterando qualitativamente sua microbiota oral endógena. No que diz respeito à gelatina bovina, constatou-se que houve uma alteração qualitativa das espécies bacterianas encontradas.

Não houve conflito de interesse na presente pesquisa.

REFERÊNCIAS

ARAUJO, F.R.G.; CASTRO, C. M. M. B.; SEVERO, M. S. *et al.* Normal microbiota of the perialveolar region of incisors of rats. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. [online]*, v.59, p. 1586-1588, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v59n6/37.pdf>> Acessado em: 22 set 2012.

ARAUJO, F.R.G.; CASTRO, C. M. M. B.; SEVERO, M. S. *et al.* Effect of *Mercurius solubilis* on the bacteriological response in the alveolitis process in rats. *Homeopathy*, v.98, p. 160-164, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v59n6/37.pdf>> Acessado em: 22 set 2012.

BERTI-COUTO, S. A.; COUTO-SOUZA, P. H.; JACOBS, R. *et al.* Clinical diagnosis of hyposalivation in hospitalized patients. *J. Appl. Oral Sci. [online]*, v.20, p.157-161, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jaos/v20n2/a06v20n2.pdf>> Acessado em 21 set 2012.

CORSO, B. L.; SILVEIRA, V. C.; BINHA, A. M. B. *et al.* Abordagem terapêutica na sialorréia em paralisia cerebral: revisão sistemática. *Med. Reabil.*, v. 30, p. 9-13, 2011.

ELLIES, M.; LASKAWI, R.; ROHRBACH-VOLLAND, S.; ARGLEBE, C.; BEUCHE, W. Botulinum toxin to reduce saliva flow: selected indications for ultrasound-guided toxin application into salivary glands. *Laryngoscope*, v. 11, p. 82-86, 2002.

ELLIES, M.; SCHÜTZ, S.; QUONDAMATTEO, F. *et al.* The effect of local injection of botulinum toxin A on the immunoreactivity of nNOS in the rat submandibular gland: An immunohistochemical study. *Intern. J. of Pediat. Otorhinol.*, v.70, p.59-63, 2006.

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

JANGERIUS, H.; VAN DEN HOOGEN, F.J.A.; VAN LIN BEEK, J. *et al.* Effects of botulinum toxin in the treatment of drooling: controlled clinical trial. *Pediatrics*, v. 114, p.620-627, 2004.

KHAN, W. U.; CAMPISI, P.; NADARAJAH, S. *et al.* Botulinium Toxin A for Treatment of Sialorrhea in Children: An effective, Minimally Invasive Approach. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2011.

LOPES, F. F.; SILVA, L. F. G.; CARVALHO, F. L.; OLIVEIRA, A. E. F. Estudo sobre xerostomia, fluxo salivar e enfermidades sistêmicas em mulheres na pós-menopausa. *RGO*, v. 56, p. 127-130, 2008.

MANRIQUE, D. Aplicação de toxina botulínica tipo A para reduzir a saliva em pacientes com esclerose lateral amiotrófica. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.*, v.71, p. 566-569, 2005.

MENEZES, F. T.; RODRIGUES, K. A.; NETO, I. C. O. *et al.* Benefícios da aplicação de toxina botulínica associada à fonoterapia em pacientes disfágicos graves. *Rev. soc. bras. fonoaudiol. [online]*., v.17, p. 230-233, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbf/v17n2/21.pdf>> Acessado em: 25 jan 2014.

PORTO, S. M. M.S.; VIANA, M. T. SILVA, K. M. F. *et al.* Desnutrição neonatal e microbiota normal da cavidade oral em ratos. *Rev. Nutr. [online]*., v.20, p. 625-632, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rn/v20n6/a05v20n6.pdf>> Acesso em: 20 set 2012.

SAVARESE, R.; DIAMOND, M.; ELOVIC, E. *et al.* Intraparotid injection of botulinum toxin A as a treatment to control sialorrhea in children with cerebral palsy. *Amer. J. of Phi. Med. Reh.*, v. 83, p. 304-314, 2004.

SPOSITO, M. M. M. Toxina botulínica tipo A – propriedades farmacológicas e uso clínico. *Act. Fis.*, suplemento 01, 2004.

TEYMOORTASH, A.; SOMMER, F.; MANDIC, R. *et al.* Intraglandular application of botulinum toxin leads to structural and functional changes in rat acinar cells. *Brit. J. of Pharm.*, v.152, p.161-167, 2007.

TORRES, M. A. F.; AYTÉS, L. B.; ESCODA, C. G. Salivary gland application of botulinumtoxin for the treatment of sialorrhea. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Buc.*, v. 12, p. 511-517, 2007.

ANEXOS

APROVAÇÃO 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 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 30 de novembro de 2012.

Ofício nº 518/12

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

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

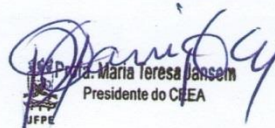
Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals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

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

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

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

Atenciosamente,


Profª. Maria Teresa Jansen
Presidente do CEUA