



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

JANAYZE SUÉLLEN DE LIMA MENDES SILVA

**AVALIAÇÃO DO PARÊNQUIMA DO FÍGADO E DO RIM DE RATAS
QUE RECEBERAM ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE TOXINA
BOTULÍNICA TIPO A NA GLÂNDULA SALIVAR SUBMANDIBULAR**

Recife

2020

JANAYZE SUÉLLEN DE LIMA MENDES SILVA

**AVALIAÇÃO DO PARÊNQUIMA DO FÍGADO E DO RIM DE RATAS
QUE RECEBERAM ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE TOXINA
BOTULÍNICA TIPO A NA GLÂNDULA SALIVAR SUBMANDIBULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Morfotecnologia do Centro de
Biociências da Universidade Federal de
Área de concentração: Morfologia: Métodos
Clássicos e Avançados

Orientadora: Prof. Dr^a. Juliana Pinto de Medeiros.

Coorientador: Prof. Dr. Jaciel Benedito de Oliveira.

Recife

2020

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz

Silva, Janayze Suéllen de Lima Mendes

Avaliação do parênquima do fígado e do rim de ratas que receberam administração crônica de toxina botulínica tipo A na glândula salivar submandibular / Janayze Suéllen de Lima Mendes Silva - 2020.

74 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Juliana Pinto de Medeiros

Coorientador: Jaciel Benedito de Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia. Recife, 2020.

Inclui referências, apêndice e anexo.

1. Sialorreia 2. Neurotoxina 3. Fígado 4. Rim

I. Medeiros, Juliana Pinto de (Orientadora) II. Oliveira, Jaciel Benedito de (Coorientador) III. Título

615.95 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-153

JANAYZE SUÉLLEN DE LIMA MENDES SILVA

**AVALIAÇÃO DO PARÊNQUIMA DO FÍGADO E DO RIM DE RATAS
QUE RECEBERAM ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE TOXINA
BOTULÍNICA TIPO A NA GLÂNDULA SALIVAR SUBMANDIBULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Aprovada em: 27/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Juliana Pinto de Medeiros (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr^a. Luciana Maria de Seixas Maia (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Francisco de Assis Souza Leite (Examinador Externa)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedico esta dissertação com gratidão e amor ao meu filho Miguel Alves que em meio a todas atribuições deste momento foi a minha maior motivação e é a luz da minha vida.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Jaciel Oliveira e a Prof. Dra. Juliana Pinto de Medeiros, minhas referências profissionais e que durante a realização deste trabalho foram exemplos de paciência e fraternidade no exercício da docência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo longo caminho percorrido até este momento. E por todas as oportunidades a mim concedidas e que se faz presente nas conquistas alcançadas.

Aos meus pais, Gessilene Bernardo e Joselito Enedino, pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos que necessitei.

Ao meu esposo Arionaldo Alves que esteve ao meu lado, sempre incentivando e torcendo por minhas realizações.

Ao meu filho Miguel Alves por ter suportado a minha ausência mesmo tão pequeno.

A minha orientadora prof^a. Dr^a. Juliana Pinto de Medeiros, pela oportunidade, dedicação, confiança depositada, orientações e pelos ensinamentos que vão além da docência, sendo uma referência de profissionalismo, ética e doçura ao mesmo tempo.

Ao meu Co-orientador, o prof. Dr. Jaciel Oliveira, minha maior referência de excelência profissional, dedicação e competência, sem deixar de lado uma humanidade e generosidade ímpar. Agradeço por todos os ensinamentos, dedicação, compromisso, paciência e por sua amizade acima de tudo, que foi de máxima importância para que eu conseguisse atravessar mudanças decisivas em minha vida ao final do curso.

A Luciana Regueira por ter cedido parte do material biológico de sua pesquisa de doutorado, tornando este trabalho viável.

Ao Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto da Universidade Federal de Rural de Pernambuco por disponibilizar o espaço do seu laboratório no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal para a realização de algumas etapas deste trabalho.

A técnica de laboratório Edna Barros, uma amiga que ganhei nesta caminhada, por todo ensinamento e dedicação durante a execução do processamento histológico desta pesquisa e que mesmo gestante não se negou a ficar horas em laboratório para que este trabalho fosse concluído.

Ao Prof. Dr. Francisco Leite da Universidade Federal de Rural de Pernambuco por sua amizade e por despendar tanto tempo e dedicação nas análises histopatológicas deste trabalho e que sem sua ajuda não seria possível um trabalho com excelência.

Ao doutorando Augusto do laboratório de Patologia Oral da UFPE por ter contribuído na digitalização das lâminas com tanta dedicação e paciência dado a grande quantidade de material processado. E ao professor Daniel Perez por disponibilizar o espaço e equipamentos do seu laboratório nesta etapa.

Ao prof. Dr. Jacinto da Costa por disponibilizar o espaço do laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares em algumas etapas desta pesquisa. Bem como a sua orientanda Maxwelline Gonçalves por toda ajuda e incentivo neste trabalho.

As amigas que ganhei no curso e que levarei em meu coração por toda vida, Eduarda Santana e Isabel Michelly, por terem sido meu apoio ao longo desses dois anos, sem as quais eu não chegaria ao final do curso com tanta alegria.

Aos amigos de curso pelo alegre convívio e brincadeiras divertidas durante esses anos e por todo o cuidado, gentileza e preocupação comigo e meu filho durante a minha gestação no primeiro ano de curso.

A prof^a Dr^a Fernanda Villarouco por sua amizade, ensinamentos e apoio desde a minha graduação quando foi minha orientadora, e por sempre acreditar no meu potencial.

A Marilene Costa do departamento de anatomia e Itacira Cunha do departamento de histologia e embriologia por tanta gentileza comigo durante minha jornada na UFPE.

Aos amigos, funcionários e professores deste Centro Universitário, minha perene gratidão pelo apoio e ensinamentos constantes.

A minha terapeuta Michelle Melo pelo apoio e por sempre me encorajar e acreditar na minha evolução pessoal e profissional. Profissional de um coração doce e que nunca desistiu do meu tratamento apesar das minhas dificuldades.

Enfim, agradeço a todos que de uma maneira ou de outra contribuíram para que eu pudesse concluir meu curso.

*“Não queremos perder, nem deveríamos
perder: saúde, pessoas, posição,
dignidade ou confiança. Mas perder e
ganhar faz parte do nosso processo de
humanização”*

*“Apesar das minhas fragilidades,
avanço”.*

(LUFT, 2017)

RESUMO

A sialorreia é o extravasamento do excesso de saliva encontrado comumente em pacientes que possuem doenças neurodegenerativas e a toxina botulínica tipo A (BTX-A) é utilizada como opção de tratamento para controlar a sialorreia, sendo aplicada no complexo submandibular-sublingual. Este trabalho avaliou se o tratamento crônico com injeção intraglandular de BTX-A, no complexo submandibular-sublingual de ratas promove alterações histológicas no tecido hepático e renal cortical. Foram utilizadas 21 ratas Wistar adultas, distribuídas em três grupos: Controle, sem tratamento (n=7); grupos BTX-12 (n=7) e BTX-35 (n=7), que receberam 3 aplicações de 2,5U de toxina botulínica tipo A em glândulas submandibulares direitas. O grupo BTX-12 foi analisado 12 dias após a terceira aplicação, enquanto o grupo BTX-35 foi analisado aos 35 dias após a terceira aplicação, totalizando 105 dias de tratamento. A análise histopatológica e histomorfométrica do parênquima hepático e cortical renal dos rins coletados de todos os grupos experimentais evidenciou alterações histopatológicas hepáticas, como hipertrofia de hepatócitos, picnose, degenerações centrolobulares, infiltrado inflamatório; e no tecido renal promoveu diminuição do espaço capsular, glomerulopatias e degenerações nos néfrons e túbulos contorcidos. A histomorfometria mostrou diminuição do tamanho dos núcleos dos hepatócitos e também do corpúsculo renal. Sendo assim, pode-se sugerir que a toxina botulínica tipo A administrada em ratas para o tratamento crônico da Sialorreia tem potencial hepatotóxico e nefrotóxico.

Palavras-chaves: Fígado. Neurotoxina. Rim. Toxicidade.

ABSTRACT

Sialorrhea is the leakage of excess saliva commonly found in patients who have neurodegenerative diseases and botulinum toxin type A (BTX-A) is used as a treatment option to control sialorrhea, being applied to the submandibular-sublingual complex. This study evaluated whether the chronic treatment with intraglandular injection of BTX-A in the submandibular-sublingual complex of rats promotes histological changes in the hepatic and renal cortical tissue. 21 adult Wistar rats were used, distributed in three groups: Control, without treatment (n = 7); BTX-12 (n = 7) and BTX-35 (n = 7) groups, which received 3 applications of 2.5U of botulinum toxin type A in right submandibular glands. The BTX-12 group was analyzed 12 days after the third application, while the BTX-35 group was analyzed 35 days after the third application, totaling 105 days of treatment. Histopathological and histomorphometric analysis of the hepatic and renal cortical parenchyma of the kidneys collected from all experimental groups showed hepatic histopathological changes, such as hepatocyte hypertrophy, pycnosis, centrilobular degenerations, inflammatory infiltrate; and in the renal tissue it promoted a decrease in the capsular space, glomerulopathies and degenerations in the contorted nephrons and tubules. Histomorphometry showed a decrease in the size of the hepatocyte nuclei and also in the renal corpuscle. Thus, it can be suggested that botulinum toxin type A administered in rats for the chronic treatment of Sialorrhea has hepatotoxic and nephrotoxic potential.

Keywords: Liver. Neurotoxin. Kidney. Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Fotomicrografias de fígados de ratas do grupo tratado com toxina botulínica tipo A analisado com 12 dias (A) e com 35 dias após a 3ª aplicação (B).....	34
Figura 2-	Fotomicrografias do córtex renal de ratas do grupo tratado com toxina botulínica tipo A analisado com 12 dias (A) e com 35 dias após a 3ª aplicação (B).....	35
Figura 3-	Fotomicrografias do córtex renal de ratas do grupo tratado com toxina botulínica tipo A analisado com 12 dias (A) e com 35 dias após a 3ª aplicação (B).....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Mediana e amplitude interquartil do perímetro e da área dos núcleos dos hepatócitos do fígado dos animais avaliados, segundo o grupo de tratamento.....	36
Tabela 2-	Teste de comparação ¹ da distribuição do perímetro e da área dos núcleos dos hepatócitos do fígado entre os grupos de tratamento.....	36
Tabela 3-	Média e desvio padrão do comprimento dos glomérulos renais dos animais avaliados, segundo o grupo de tratamento.....	37
Tabela 4-	Teste de comparação da média dos glomérulos renais entre os grupos de tratamento.....	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACh	- Acetilcolina
AVE	- Acidente vascular encefálico
BoNT / BTX /	- Toxina botulínica
TxB	
BTX-A	- Toxina botulínica tipo A
BTX-12	- Grupo tratado com Toxina botulínica e avaliado após 12 dias
BTX-35	- Grupo tratado com Toxina botulínica e avaliado após 35 dias
°C	- Grau Celsius
CB	- Centro de Biociências
CEUA	- Comissão ética no uso de animais da Universidade Federal de Pernambuco
CN	- Grupo controle negativo
DL50	- Dose Letal
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
g	- Grama
HE	- Coloração por hematoxilina e eosina
Hn	- Metade N-terminal da cadeia pesada
kDa	- kilodalton
mg	- Miligramas
ml	- Mililitros
mm	- Milímetros
ng	- Nanograma
P.A.S.	- Ácido periódico de Schiff
SNA	- Sistema Nervoso Autônomo
SNC	- Sistema Nervoso Central
S-S	- Ligação covalente dissulfídica
µm	- Micrômetro
U	- Unidades internacionais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 OBJETIVOS.....	16
1.1.1 <i>Objetivo Geral</i>	16
1.1.2 <i>Objetivos Específicos</i>	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1 SIALORREIA.....	17
2.1.1 <i>Complicações da Sialorreia</i>	17
2.1.2 <i>Tratamento da Sialorreia</i>	18
2.1.3 <i>Toxina Botulínica no Tratamento da Sialorreia</i>	19
2.1.4 <i>Efeitos Adversos do Tratamento da Sialorreia com Toxina Botulínica</i>	21
2.2 TOXINA BOTULÍNICA	21
2.2.1 <i>Aplicação Clínica</i>	22
2.2.2 <i>Estrutura Química e Mecanismo de Ação da Toxina Botulínica</i>	23
2.2.3 <i>Metabolização e Excreção da Toxina Botulínica</i>	24
2.2.4 <i>Comercialização da Toxina Botulínica</i>	26
2.3 FÍGADO	27
2.4 RINS.....	27
3 METODOLOGIA.....	30
3.1 DESENHO DO ESTUDO	30
3.2 TRATAMENTO DOS ANIMAIS	30
3.3 COLETA DO FÍGADO E DOS RINS	31
3.4 CONFEÇÃO DAS PREPARAÇÕES HISTOLÓGICAS	31
3.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	32
3.6 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	32
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4 RESULTADOS	34
4.1 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	34
4.2 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	35
5 DISCUSSÃO.....	38
6 CONCLUSÕES	43

REFERÊNCIAS	44
APÊNDICE A- ARTIGO : AVALIAÇÃO DO PARÊNQUIMA DO FÍGADO E DO RIM DE RATAS QUE RECEBERAM ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE TOXINA BOTULÍNICA TIPO A NA GLÂNDULA SALIVAR SUBMANDIBULAR.	55
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL	74

1 INTRODUÇÃO

A hipersalivação é a liberação descontrolada de saliva sobre a margem dos lábios, conhecida como sialorreia (JOST, 2016). O grande arsenal farmacológico que existe para o tratamento da sialorreia associado a terapias convencionais como a fonoterapia ainda não são suficientes para corrigir o problema, dado a grande quantidade de efeitos colaterais dos medicamentos que muitas vezes levam a desistência do tratamento e também a ineficiência das terapias convencionais. Uma boa alternativa é o uso de injeções intraglandulares de toxina botulínica tipo A (BTX-A) em glândulas salivares, visto que a toxina diminui a atividade secretora da glândula (ELLIES et al., 1999; ALTER, 2010, et al., 2014; MIRANDA-RIUS et al., 2015).

A toxina botulínica tipo A é uma neurotoxina produzida por bactérias anaeróbias *Clostridium botulinum* e conta sete diferentes sorotipos denominados de A a G, que diferem em sua atividade biológica, portanto, em potência e duração, sendo BTX-A o sorotipo com maior tempo de ação, com menos efeitos indesejáveis, e é o mais estudado e com o qual há maior experiência clínica (CORTÉS-MONROY H. e SOZA B., 2013). (POLI e LEBEDA, 2002). A utilização terapêutica da toxina botulínica foi primeiramente estudada por Scott et al. em 1973, em primatas e tornou-se a primeira toxina biológica a ser licenciada como droga para tratamento de doenças humanas. A partir de 1989 a toxina botulínica foi aprovada para uso clínico nos Estados Unidos pela *Food and Drug Administration* (FDA) (SPOSITO, 2004).

Atualmente é comercializada por vários fabricantes, na forma de pó liofilizável e tendo como estabilizante a albumina humana ou gelatina de origem bovina, este último de utilização mais recente (PROSIGNE®, 2013 [bula]; BOTOX®, 2015 [bula]).

O uso da toxina botulínica tem crescido exponencialmente, mas na literatura ainda não existe dados que esclareçam o processo de metabolização e excreção deixando uma lacuna na compreensão de tais processos e consequentemente nos possíveis efeitos adversos a nível sistêmico após o uso terapêutico da toxina (RAVICHANDRAN et al., 2006; SIMPSON, 2013).

A carência de trabalhos na literatura sobre os efeitos sistêmicos da BTX-A utilizada no tratamento local da sialorreia, sobretudo nas funções hepáticas e renais, sustentaram a proposta da presente pesquisa em avaliar e descrever as possíveis alterações na arquitetura tecidual do fígado e rins de ratos tratados com injeção intraglandular de BTX-A. O aumento exponencial do uso de BTX-A como tratamento para diversas doenças e também para o uso estético levanta a reflexão em relação as consequências sobre os possíveis efeitos colaterais no organismo a

nível sistêmico. Desta forma é notório que um estudo sobre a toxicidade da BTX-A a nível hepático e renal visa contribuir para a ciência ao esclarecer dúvidas em relação ao comportamento da toxina em órgãos responsáveis pela metabolização e excreção de toxinas ambientais. Assim faz-se necessário estudos que evidenciem os possíveis danos provocados pela BTX-A a nível sistêmico, contribuindo desta forma para o melhor controle em relação as dosagens e quantidade de aplicações em um mesmo paciente, resultando em maior qualidade de vida.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar se o tratamento crônico com injeção intraglandular de toxina botulínica tipo A no complexo submandibular-sublingual de ratas promove lesões no parênquima hepático e renal destes animais.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Analisar a morfometria (macroscópica) do fígado e dos rins de ratas tratadas com BTX-A;
- Observar e descrever as lesões histopatológicas hepáticas e renais em ratas tratadas com BTX-A
- Realizar estudo morfométrico em tecidos hepáticos e renais de ratas tratadas com BTX-A.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Sialorreia

A sialorreia é o acúmulo de saliva na cavidade oral frequentemente encontrada em pacientes com doenças neurodegenerativas e que evoluem com dificuldades no controle motor oral, onde a produção de saliva excede a habilidade dos sujeitos para transportá-la da boca para o estômago, provocando vazamento extraoral (MANRIQUE, 2005a; ZLOTNIK et al., 2015; JOST, 2016). A hipersalivação é considerada patológica a partir dos 4 anos de idade, pois antes dessa idade é comum durante o desenvolvimento do controle neuromuscular oral normal (AUGUSTO e PEREZ, 2006; FAIRHURST e COCKERILL, 2011).

Existem duas formas de sialorreia: a relativa, resultante de distúrbios na fase de deglutição da saliva; e a absoluta, resultante de uma alteração neurogênica na inervação da glândula salivar pela hipersecreção ou disfunção sensorial (ELLIES et al., 2002b; SPOSITO, 2004, WILKEN, ASLAMI, BACKES, 2008). Etiologicamente a sialorreia é classificada em 3 categorias: 1) neuromuscular/disfunção sensorial, ocorre quando há lesão cerebral, doença neurodegenerativas entre outras; 2) hipersecreção de saliva, em casos de inflamações, fármacos e exposição tóxica como ao mercúrio; 3) anatômica, como a macroglossia, incompetência oral e defeitos cirúrgicos da cabeça e pescoço (CHAHUÁN et al., 2012; DRESSLER, 2013; MIRANDA-RIUS et al., 2015).

A sialorreia normalmente é causada pela dificuldade, inabilidade ou deficiência de deglutição da saliva (sialorreia relativa) e não pela produção excessiva de saliva como comumente é interpretado (SILVESTRE-RANGIL et al., 2011; DRESSLER, 2013; MIRANDA-RIUS et al., 2015). Na sialorreia relativa alguns fatores clínicos influenciam para estase salivar (acúmulo de saliva na boca): a posição da cabeça, vedação de lábio, o controle voluntário sobre a língua, tonicidade do pescoço resultando em mau posicionamento cabeça, fase oral da deglutição anormal, reduzida percepção sensorial de saliva e a idade mental do paciente (BENEDICTIS, CARNIELLI, BENEDICTIS, 2009; MENDES et al., 2010; HEFFERNAN e ADIL, 2015).

2.1.1 Complicações da sialorreia

As complicações da hipersalivação podem chegar a ser fatais, como: asfixia (BHATIA, MÜNCHAU, BROWN, 1999); desidratação por perda de fluidos, eletrólitos e proteínas (MENINGAUD et al., 2006; YANG et al., 2006); alterações nutricionais (MARINA et al., 2008); riscos de infecções pulmonares, inclusive pneumonia aspirativa (BHATIA, MÜNCHAU, BROWN, 1999; ELLIES et al., 2002a; WILKEN, ASLAMI, BACKES, 2008; ISAÍAS e DARÍO, 2009; ALTER, 2010); infecção do trato aéreo superior (ALTER, 2010); afogamento por aspirações recorrentes (ISAÍAS e DARÍO, 2009).

Algumas complicações podem ser verificadas diariamente, como por exemplo: dermatite facial e perioral (YANG et al., 2006; WILKEN, ASLAMI, BACKES, 2008; BLOEM et al., 2009); aumento das infecções periorais e orais, maceração da pele, halitose, dificuldade de higiene e riscos de aspiração (ELLIES et al., 2002a; HEINEN, 2008; WILKEN, ASLAMI, BACKES, 2008; HORNIBROOK e COCHRANE, 2012). A maceração da pele pode estar ao redor da boca, queixo e pescoço e podem infectar-se secundariamente por bactérias (MARINA et al., 2008; NEVILLE et al., 2016). A sialorreia ainda pode causar dificuldades para falar (MENINGAUD et al., 2006; ALTER, 2010);

Pacientes portadores de sialorreia ainda sofrem com os transtornos psicossociais da patologia, visto que enfrentam desordens como, imersão por saliva em roupas, brinquedos, livros escolares, e, em indivíduos com menos comprometimento cognitivo, a autoconsciência e a depressão (MANRIQUE, 2005b; MENINGAUD et al., 2006; HORNIBROOK e COCHRANE, 2012); limitações de atividades (MØLLER et al., 2011); perdas na função mastigatória (MENINGAUD et al., 2006); além de estresse aos cuidadores (MØLLER et al., 2011).

Todas as consequências justificam o tratamento da sialorreia, devendo ser alvo de atenção e gestão, visto que a hipersalivação traz impactos negativos sobre funções psicossociais, educacionais e físicas, sendo um importante problema clínico, social e emocional para crianças e adultos, muitas vezes embaraçoso para os pacientes (HASSIN-BAER et al., 2005; CAPACCIO et al., 2008).

2.1.2 Tratamento da sialorreia

Diante do exposto, fica evidente que o tratamento da sialorreia precisa ser multidisciplinar para garantir melhora do estado geral e da qualidade de vida do paciente (WILKEN, ASLAMI, BACKES, 2008; ARELLANO-SALDAÑA et al., 2014), do ponto de vista físico, psicológico e social (OLIVEIRA FILHO, SILVA, ALMEIDA, 2016). Comumente os tratamentos propostos para sialorreia são o uso de medicação anticolinérgica, terapia oromotora e procedimentos cirúrgicos (SAVARESE et al., 2004). A grande problemática sobre o melhor tratamento para sialorreia se dá pelos indesejáveis efeitos colaterais de fármacos e pelo benefício limitado de algumas terapias convencionais (ELLIES et al., 1999; HASSIN-BAER et al., 2005; ALTER, 2010).

As substâncias farmacêuticas anticolinérgicas reduzem o volume de saliva na cavidade oral, inibindo a produção da mesma, sendo as mais utilizadas: atropina, benztropina, escopolamina, cloridrato benzexol e glicopirrolato (AUGUSTO e PEREZ, 2006; ELLIES et al., 2006a; HORNIBROOK e COCHRANE, 2012). Em alguns casos, uma melhoria significativa da função salivar não tem sido observada após a administração de drogas para tratar a sialorreia (MIRANDA-RIUS et al., 2015). Os pacientes frequentemente interrompem estes medicamentos orais, dado a quantidade de efeitos colaterais (ALTER, 2010), e por isso são raramente indicados (HORNIBROOK e COCHRANE, 2012).

Os tratamentos convencionais incluem a fonoterapia (CRYSDALE et al., 1985; CRYSDALE et al., 2006); fisioterapia funcional, fisioterapia motora orofacial e terapia de comportamento (AUGUSTO e PEREZ, 2006; FAIRHURST e COCKERILL, 2011; HEFFERNAN e ADIL, 2015); programa de alimentação e/ou estimulação oral (WONG, SUN, WONG, 2001); sucção da saliva (XEREZ, 2008; YOUNG et al., 2011); tratamento cirúrgico (FAIRHURST e COCKERILL, 2011; MONTGOMERY et al., 2016); e o tratamento farmacológico (FAIRHURST e COCKERILL, 2011; MONTGOMERY et al., 2016). As terapias comportamentais não têm sido demonstradas como tão eficiente (HASSIN-BAER et al., 2005).

De acordo com a literatura outro método terapêutico aceito como eficaz e seguro é o uso da toxina botulínica tipo A (BTX-A) em injeções percutâneas intraglandulares no complexo submandibular visto que leva à diminuição da sialorreia, mantendo, dentre outros parâmetros, a boa saúde oral (ÇİFTÇİ et al., 2013; VASHISHTA et al., 2013; ALVARENGA et al., 2016).

2.1.3 Toxina botulínica no tratamento da sialorreia

A toxina botulínica tipo A (BTX-A) tem sido aplicada em glândulas salivares (submandibular e parótida) na prática clínica, no tratamento da sialorreia (TRUONG e JOST, 2006), pois a utilização da toxina para tratar sialorreia surgiu com a necessidade de uma forma terapêutica mais conservadora, menos invasiva, sem que haja a realização de procedimentos cirúrgicos. Pode ser utilizada em pacientes que apresentam evidências crônicas de sialorreia, sem resposta à terapia comportamental ou médica (BHAYANI e SUSKIND, 2008).

A BTX-A foi descrita como método eficaz de tratamento da sialorreia, sob a forma de injeção intraglandular em 1997 (SAVARESE et al., 2004), e tem sido cada vez mais utilizada e difundida mesmo em quadros de sialorreia excessiva (CORSO et al., 2011; KHAN et al., 2011). A toxina é capaz de deprimir a atividade secretora das glândulas salivares, como uma paralisia neurosecretora (BOTHWELL et al., 2002; ELLIES et al., 2004), porém tem duração do efeito terapêutico limitada, chegando apenas a alguns meses. No entanto, as injeções podem ser repetidas na recorrência da sialorreia (BREHERET et al., 2011).

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

Existem três técnicas para aplicação da BTX-A nas glândulas salivares, são elas: a) método palpatório; que usa os marcos anatômicos com palpação da glândula, b) aplicação orientada por ultrassonografia (USG) e c) aplicação orientada por eletromiografia (EMG) (MONTGOMERY et al., 2014; DANIEL, 2015). Devido ao alto índice de variações anatômicas das glândulas salivares, é preferível o uso de aplicação orientada por USG (JOST, 2016; QUEZADA-GAON et al., 2016). Isto também evita atingir os músculos adjacentes envolvidos na mastigação, deglutição e estruturas vasculares, permitindo identificar o melhor local para a aplicação (ALTER, 2010; MATSUOKA et al., 2016).

Geralmente é utilizado o ultrassom de tireoide e a injeção de ambos os pares de glândulas bilateralmente resulta em melhor sucesso. Uma agulha de insulina de 0,5 cm é recomendada para fazer a aplicação da toxina. Com esta pequena agulha, a glândula pode ser

facilmente injetada, evitando aplicar a BTX-A inadvertidamente em qualquer um dos músculos subjacentes (ALTER, 2010), e evitando todas as áreas vasculares mais profundas da glândula (BANERJEE, GLASSON, O'FLAHERTY, 2006; GERLINGER et al., 2007), eliminando complicações na aplicação.

2.1.4 Efeitos adversos do tratamento da sialorreia com toxina botulínica

De acordo com a literatura os efeitos colaterais, quando existentes, são classificados como locais e/ou sistêmicos, estando alguns deles relacionados com o mecanismo de ação da própria droga (CARVALHO, JANKOVIC, PAPPERT, 2011). Em alguns casos, a BTX-A pode provocar a produção de uma saliva espessada (mudança na viscoelasticidade de saliva), fazendo com que a mastigação e deglutição fiquem prejudicadas. Também são relatados sangramento, hematoma e infecção no local da aplicação, além de inclinação facial temporária, luxação recorrente do osso mandíbula, fraqueza músculo do masseter, lesão do nervo facial e pode se espalhar atingindo os músculos oculares (TAN et al., 2001; TURK-GONZALES e ODDERSON, 2005; CORDIVARI et al., 2004; CH, 2010).

Os efeitos sistêmicos já relatados incluem náusea, fraqueza muscular, fadiga, mal-estar, irritação, erupção cutânea, ptose e sintomas gripais (BAIZABAL-CARVALLO, JANKOVIC, PAPPERT, 2011; CARVALHO, JANKOVIC, PAPPERT, 2011). A toxina tende a ter tropismo por terminações nervosas colinérgicas, podendo causar enfraquecimento muscular longe do local de aplicação (BRODSKY, SWOPE, GRIMES, 2012).

2.2 Toxina botulínica

Por mais de um século a BTX-A esteve associada apenas a intoxicação alimentar causando uma doença conhecida como “botulismo”, caracterizada por uma grave paralisia muscular generalizada e bloqueio autonômico colinérgico (MIDURA, 1996; INTISO, 2012). Cronologicamente a BTX-A vitimado muitos indivíduos após um surto da doença botulismo no final do século XVIII e em 1817 Justinus Kerner iniciou as investigações na Alemanha, descrevendo como causa do botulismo uma toxina atribuída à linguiça. Posteriormente, Muller, em 1870, denomina a doença de botulismo e em 1879 o professor e pesquisador belga Emille

Pierre Van Ermengem, atribuiu a sua produção à esporos de um bacilo anaeróbio, denominando-o de *Bacillus botulinus*, porém a bactéria só foi descrita mais de meio século após (VAN ERMENGEM, 1897; CARRUTHERS, 2002; BACHUR et al., 2009; COLHADO, BOEING, ORTEGA, 2009). E por volta de 1949, foi visto que a toxina agia na junção neuromuscular (DÍA et al., 2014). O uso da toxina botulínica teve seu uso terapêutico consolidado na década de 90, quando se torna uma alternativa de tratamento reconhecido para a espasticidade (CORTÉS-MONROY e SOZA, 2014).

A toxina botulínica tipo A (BTX-A) é uma proteína neurotóxica produzida como produto do metabolismo fermentativo pela bactéria gram-positiva anaeróbia, a *Clostridium botulinum* (descrita por Prevot, 1953), presente na água, na terra, e em alimentos industrializados enlatados (PREVOT, 1953; MELLING, HAMBLETON, SHONE, 1988; POULAIN, POPOFF, MOLGO, 2008; WHO, 2013; MATAK, 2015). A BTX-A é uma exotoxina que causa paralisia muscular transitória através do bloqueio pré-sináptico da liberação de acetilcolina na junção neuromuscular (JIANG et al., 2014; RHÉAUME, 2015).

Por ser considerada a toxina mais potente e letal conhecida, sugere-se inclusive ser um potencial agente de ameaça bioterrorista (CHENG et al., 2009), com sua dose letal mediana (DL50) de aproximadamente 0,4 a 1 ng/kg de peso corporal (dependendo da espécie animal considerada), sendo 10 milhões de vezes mais tóxico do que o cianeto (GILL, 1982; ZHANG e VARNUM, 2012). Purificada, 10 a 100 µg/kg é o suficiente para levar a óbito um camundongo (GILL, 1982). Um único grama da toxina cristalina, uniformemente dispersa e inalada, pode matar mais de um milhão de pessoas (DHAKED et al., 2010). Porém ao mesmo tempo torna-se segura quando utilizada dentro das doses recomendadas para as indicações clínicas e está entre as proteínas terapêuticas mais utilizadas anualmente por milhões de pessoas, especialmente para fins cosméticos (BACHUR et al., 2009; MATAK, 2014).

2.2.1 Aplicação clínica

A BTX-A foi introduzida na prática clínica inicialmente para o tratamento de estrabismo, e logo depois em uma variedade de condições como na neurologia adulta e pediátrica, urologia, odontologia, dermatologia, gastroenterologia e cirurgia plástica (SHAMEL et al., 2016). Foi a primeira toxina biológica licenciada para o tratamento de doenças humanas sendo liberada para administração em paciente pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 1989, classificando-

a como droga segura e eficaz para o tratamento dos distúrbios do movimento. A BTX-A entrou para lista dos medicamentos seguros e eficientes nos anos 1990 pelo consenso do *National Institutes of Health* (NIH) (SPOSITO, 2004; DHAKED et al., 2010; INTISO, 2012). Segundo Matak e Lackovic (2015), a atividade pró-apoptótica e antitumoral pode ser a mais nova e importante ação BTX-A.

O uso da BTX-A é considerado seguro, visto que não existem casos relatados de morte pelo uso terapêutico da toxina botulínica, e os efeitos adversos notificados são leves ou moderados, e transitórios (CARRUTHERS e CARRUTHERS, 2005b; BAIZABAL-CARVALLO, JANKOVIC, PAPPERT, 2011).

A toxina é sintetizada como uma mistura complexa de polipeptídicos neurotóxicos e componentes não tóxicos de proteínas e contam com diversos sorotipos classificados de A a G, sendo as do tipo A e B que estão disponíveis para uso médico e são comercializadas (SPOSITO, 2009; DÍA et al., 2014). O tipo A é o sorotipo com efeito de maior tempo de duração, e o mais estudado e com o qual há maior experiência clínica (CORTÉS-MONROY E SOZA, 2013). Tem como vantagens seus efeitos serem transitórios, não destrutivos, dependente da dose e aplicação local, com o mínimo de efeitos secundários (MARCHESE et al., 2008).

2.2.2 Estrutura química e mecanismo de ação da toxina botulínica

A BTX-A é uma exotoxina que pode atuar seletivamente sobre a membrana pré-sináptica de neurônios motores colinérgicos periféricos (JIANG, et al., 2014). É uma mistura de proteínas contendo a toxina botulínica e várias proteínas não-tóxicas (proteínas hemaglutinina e não-hemaglutinina), formando um verdadeiro complexo proteico (SPOSITO, 2004; ZHANG e VARNUM, 2012). É composta por um polipeptídeo de cadeia dupla, com uma cadeia pesada e uma cadeia leve unidas por uma ligação covalente dissulfídica (S-S), protease-sensível, e por ligações não covalentes, com massa molecular de aproximadamente 150kDa. A parte ativa da molécula da BTX-A pesa 150kDa e é formada de duas porções: cadeia leve com atividade catalítica (50kDa), e cadeia pesada (100kDa). A cadeia pesada apresenta dois domínios: o de ligação (metade C-terminal da cadeia pesada) e o de translocação representado por Hn (metade N-terminal da cadeia pesada) (SPOSITO, 2009).

O peso molecular é um fator importante para determinar a difusão da toxina no tecido alvo, assim como vai ajudar na intensidade de sua toxicidade. As proteínas não-tóxicas, têm a função de proteger a neurotoxina do efeito do meio ácido e proteases através do trato gastrointestinal, pois são estáveis em pH ligeiramente ácido e dissociam em soluções alcalinas (CALLAWAY, AREZZO, GRETHLEIN, 2002; VOLLAND et al., 2008; DÍA et al., 2014). A diluição da toxina liofilizada pode influenciar na sua difusão dentro do tecido alvo, aumentando o raio de difusão a medida que a diluição em solução salina 0,9% (soro fisiológico) também aumenta (AOKI, 2001).

O mecanismo de ação da toxina botulínica inclui quatro etapas após a difusão no espaço intersticial (TURTON, CHADDOCK, ACHARYA, 2002; COLHADO, BOEING, ORTEGA, 2009):

1– Neurotropismo, ligação específica pela cadeia pesada à receptores na membrana pré-sináptica dos nervos colinérgicos (nas terminações nervosas motoras).

2 – Endocitose: internalização dependente de energia;

3– Translocação: a cadeia leve é translocada do endossomo ácido para o citosol;

4 – Clivagem enzimática: a cadeia leve cliva proteínas específicas para a fusão entre a vesícula pré-sináptica da acetilcolina A (ACh) com a membrana pré-sináptica (toxicidade intracelular).

A ação da BTX-A pode ser bloqueada pela formação de anticorpos antitoxina (resposta imune), que bloqueiam os efeitos terapêuticos da droga (anticorpos neutralizantes), sendo esta considerado um obstáculo ao tratamento com esta droga (CARRUTHERS, 2002; COLHADO, BOEING, ORTEGA, 2009; DHAKED et al., 2010; INTISO, 2012; CAVALLINI, 2014).

2.2.3 Comercialização da Toxina Botulínica

Atualmente são comercializadas no mercado internacional, diferentes preparações comerciais de toxina botulínica do tipo A, sendo as mais conhecidas: *Botox*[®], *Dysport*[®], *Prosigne*[®], *Xeomin*[®]. Todas são produtos biológicos, com diferentes formulações, potências e dosagens. A formulação americana *Botox*[®] é a mais antiga, servindo de base de comparação para as novas formulações que surgem no mercado farmacêutico, devido a seu perfil de segurança e sua eficácia.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) liberou a BTX-A da marca *Prosigne*[®] em 2003 para uso clínico (ANVISA, 2003). É uma formulação de origem chinesa, produzida pela empresa farmacêutica estatal *Lanzhou Institute of Biological Products* – LIBP que extrai a toxina a partir da toxina bruta da cultura de cepas Hall de *Clostridium botulinum*, cultivada em um meio contendo tripsina, caseína e extrato de levedura (*PROSIGNE*[®], 2013 [Bula]).

A *Prosigne*[®] consiste em um complexo cristalino de toxina ativa de alto peso molecular e uma hemaglutinina associada. Como seu estabilizante é utilizado a gelatina de origem bovina, ao invés da albumina humana como as outras marcas, prometendo alta pureza e baixa toxicidade. Uma U da *Prosigne*[®], equivale, aproximadamente, cerca de 3 a 4 U da *Dysport*[®], e também, à 1U do *Botox*[®] (SHAN et al., 2013). É a única com a certificação *prions free* (SPOSITO, 2004; CRISTÁLIA, 2006; SPOSITO, 2010; *PROSIGNE*[®], 2013 [Bula]). Em cada frasco de *Prosigne*[®] de 50 ou 100 U (UI) temos 5 mg de gelatina, 25 mg de sacarose e 25 mg de dextrana. No processo de purificação da BTX-A, uma quantidade estéril filtrada de 0,2 microns de toxina obtida é e liofilizada para comercialização (CRISTÁLIA, 2006; SPOSITO, 2010;).

A gelatina de origem bovina utilizada como estabilizante para a toxina botulínica tipo A promove a droga um menor poder de difusão, conferindo maior segurança, visto que a albumina humana possui um grande poder de difusão tecidual. A gelatina também não é capaz de transmitir doenças infectocontagiosas, como doenças sexualmente transmissíveis, HIV, HTVL, Hepatite B e C, ou seja, não tem capacidade de transmitir doenças priônicas, pois a gelatina é certificada como “*prion free*” (CRISTÁLIA, 2006).

A gelatina de origem animal é um produto obtido da hidrólise parcial da proteína colágeno, a principal proteína estrutural no tecido conjuntivo da pele e dos ossos. Farmacologicamente a gelatina possui a vantagem de baixíssimo potencial alergênico, alto grau de biodisponibilidade e afinidade com o tecido das células (GELITA DO BRASIL, 2013). É produzida a partir da pele suína (gelatina tipo A) ou da pele e osso bovino (gelatina tipo B) (MORAES et al., 2008).

Em relação ao poder alergênico da gelatina, não existe na literatura estudos que comprove que a associação gelatina-toxina botulínica produz maior efeito adverso, logo não se pode afirmar que há maior grau de alergia à gelatina. Entretanto a marca *Prosigne*[®] contraindica o uso no tratamento de indivíduos com histórico de reações anafiláticas, o que não acontece

com outras marcas, como *Botox*[®], que utiliza a albumina humana (PROSIGNE[®], 2013 [bula]; BOTOX[®], 2015 [bula]).

2.2.4 Metabolização e excreção da toxina botulínica

Existe pouca informação disponível sobre os mecanismos naturais ou farmacologicamente induzidos para metabolização e eliminação da toxina botulínica (RAVICHANDRAN et al., 2006). De acordo com a literatura pequenas quantidades de toxinas que são administradas com fins terapêuticos, e principalmente por sua aplicação local, não permite avaliar fisiologicamente *in vivo* as taxas de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (SAMPAIO, COSTA, FERREIRA, 2004; LEBEDA et al., 2010).

Estudos anteriores comprovaram que após a aplicação da toxina botulínica e difusão no tecido ou órgão alvo a BTX-A excedente é absorvida para a circulação sanguínea e pode provocar efeitos sistêmicos, mesmo que mínimos (SPOSITO, 2004). Outro estudo apontou que o sangue não é capaz de produzir alterações estruturais importantes na BTX-A e não interfere na sua atividade enzimática catalítica, mantendo a sua capacidade para bloquear a transmissão neuromuscular. Neste estudo também foi observado que apenas 27% da droga presente na corrente sanguínea estava ligada à albumina plasmática, restando mais de 70% livre para ser redistribuída pelo organismo. E enquanto a toxina atinge seu tempo de meia-vida, não há evidência de metabolismo significativo sobre a mesma. (RAVICHANDRAN et al., 2006).

Alguns estudos já demonstraram que mesmo após a aplicação da droga em musculatura de ratos ocorre difusão pelo músculo, sugerindo a metabolização sistêmica e excreção urinária e esta metabolização sistêmica ocorreria através de proteases (SPOSITO, 2004). Quando a toxina é inativada por anticorpo, a depuração da mesma ocorre no fígado e no baço, tornando-se indisponível para promover efeitos nas terminações nervosas (RAVICHANDRAN et al., 2006).

O fígado e os rins compõem parte importante na metabolização, depuração e excreção de substâncias desconhecidas para o organismo. O fígado é capaz de destoxificar, excretar e metabolizar substâncias como, álcool, fármacos, hormônios e produtos tóxicos também. Os rins ajudam o organismo a se livrar das toxinas ambientais, por meio da urina e participam

ativamente no controle dos líquidos corporais para manter a homeostasia (TORTORA e DERRICKSON, 2013).

2.3 Fígado

O fígado é uma glândula e depois da pele o maior órgão, situa-se nas partes cranial e direita da cavidade abdominal, abaixo da cúpula diafragmática direita e apresenta uma coloração vermelho-escuro (FRITSCH e KÜHNEL, 2008; GOOS, 2012). Macroscopicamente o fígado apresenta as faces diafragmática, que se relaciona com o diafragma; e a visceral que está em contato com o estômago, o duodeno o rim e o colo. Na face visceral identifica-se 4 lobos: direito, esquerdo, caudado e quadrado e na face diafragmática os lobos direito e esquerdo apenas que são separados pelo ligamento falciforme. O fígado recebe a maior parte de sangue pela veia porta hepática, que conduz o sangue venoso do trato gastrintestinal, do pâncreas e do baço (DANGELO e FATTINI, 2011; GOOS, 2012).

O componente estrutural básico do fígado é a célula hepática, ou hepatócito. São células epiteliais que estão agrupadas em placas interconectadas. Em cortes histológicos, observa-se que o fígado é formado por uma massa poligonal de tecido, os lóbulos hepáticos (JUNQUEIRA, 2017). Nos locais em que três lóbulos clássicos entram em contato uns com os outros, os elementos de tecido conjuntivo são mais abundantes e estas regiões são denominadas espaços porta (triades). Os espaços porta contêm ramos pequenos da artéria hepática, tributários relativamente grandes da veia porta, dutos biliares interlobulares e vasos linfáticos (GARTNER E HIATT, 2014).

É o primeiro órgão a ser exposto a substratos metabólicos e nutrientes e tem função de oxidar ou conjugar substâncias tóxicas para torna-las inofensivas. Ele pode, entretanto, ser seriamente lesionado por um excesso de tais substâncias (ROSS, PAWLINA e BARNASH, 2012). A desintoxicação pode ser realizada por oxidação ou conjugação com ácido glicurônico no tecido hepático, ou pela acetilação, como ocorre com as sulfonamidas, que assim são transformadas em compostos menos solúveis (DOUGLAS, 2006).

2.4 Rins

O rim é um órgão par, abdominal e retroperitoneal e estão situados a direita e esquerda da coluna vertebral. Apresenta uma forma de feijão com duas faces (anterior e posterior), duas

margens (medial e lateral) e duas exterminadas denominadas polos e sobre o polo superior situa-se a glândula supra-renal. Os rins são envolvidos por uma cápsula fibrosa que é comumente envolvida por gordura que constitui a capsula adiposa, esta por sua vez encontra-se envolvida pela fáscia renal. Apresenta uma borda convexa e outra côncava, na qual se situa o hilo, onde entram e saem vasos sanguíneos, entram nervos e saem os ureteres (Figura 19.1). O hilo contém também tecido adiposo e os dois ou três cálices, que se reúnem para formar a pélvis renal, parte superior, dilatada, do ureter (FRITSCH e KÜHNEL, 2008; DANGELO E FATTINI, 2011; GOOS, 2012).

Internamente o rim apresenta duas regiões distintas: uma região mais externa castanho-avermelhada, o córtex, e uma região interna, a medula. No limite entre córtex e medula, existe um sistema de vasos sanguíneos, as artérias e veias arqueadas, que percorrem paralelamente à superfície do rim e se ramificam para cima e para baixo para suprir o córtex e a medula (ROSS, PAWLINA e BARNASH, 2012). A zona medular é formada por 10 a 18 pirâmides medulares (de Malpighi), cujos vértices provocam saliência nos cálices renais. Essas saliências são as papilas, sendo cada uma delas perfurada por 10 a 25 orifícios (área crivosa) (JUNQUEIRA, 2017). O córtex com cerca de 1 cm é denso e localiza-se sob a capsula fibrosa. Recobre a base das pirâmides da medula renal como uma cápsula e projeta-se para entre as superfícies laterais das pirâmides renal formando as colunas renais. Cada pirâmide renal junto com seu córtex cortical forma um lobo renal que é limitado pelas colunas renais (FRITSCH e KÜHNEL, 2008).

Histologicamente, o rim exibe um arranjo complexo de túbulos, um sistema vascular extenso e ductos que coletam, modificam e conduzem a urina para o ureter para ser eliminada do organismo (ROSS, PAWLINA e BARNASH, 2012). Os túbulos renais formam a maior parte do rim e começam na substância cortical, depois de várias circunvoluções no córtex e na medula terminam no ápice das pirâmides renais por meio de aberturas nos cálices renais (GOOS, 2012). Cada túbulo urinífero é envolvido por uma lâmina basal, que se continua com o escasso conjuntivo do rim e é composto por duas porções funcionais e embriologicamente distintas, o néfron e o túbulo coletor. Em cada rim há cerca de 600 a 800 mil néfrons (JUNQUEIRA, 2017).

O néfron é conjunto de componentes funcionais formado pelo corpúsculo renal e pelo túbulo renal a ele agregado. O corpúsculo renal consiste num novelo de vasos capilares, o glomérulo, encerrado num cálice de parede dupla, a capsula glomerular que é o começo do túbulo renal invaginado em forma de bolsa (FRITSCH e KÜHNEL, 2008, GOSS, 2012). O túbulo renal inicia-se pelo túbulo proximal com uma parte sinuosa (túbulo contorcido proximal)

e uma parte reta túbulo reto proximal), seguido pelo túbulo intermediário (Alça de Henle), com uma parte descendente e uma ascendente que se continua no túbulo distal que termina no túbulo coletor (FRITSCH e KÜHNEL, 2008).

O rim é um órgão complexo quanto à sua função, já que tem papel no mecanismo homeostático regulador do meio interno. O rim tem função de: regulação de equilíbrios hídricos, acidobásico e eletrolítico; Eliminação de substâncias urofânicas; regulação da pressão sanguínea; influencia hormonal sobre a formação de eritrócitos e influencia sobre o equilíbrio do cálcio pela intervenção no metabolismo da vitamina D (DOUGLAS, 2006 e SCHÜNKE et. al, 2019).

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

A pesquisa foi realizada 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 Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Biociências 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 que avaliou a toxicidade da BTX-A em fígados e rins de 35 ratas através de estudo histopatológico e morfométrico. Todo o trabalho obedeceu às normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e do *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*.

3.2 Tratamento dos animais

Foram utilizadas 21 ratas (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*), 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. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (49x34x16 cm) com 4 animais cada, em temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Os animais tiveram livre acesso a dieta padrão para roedores. Todas as intervenções nos animais foram realizadas em horário fixo às 7hrs no mesmo biotério onde eles estavam alojados.

Os animais foram aleatoriamente agrupados em três grupos com 7 animais cada: grupo controle (CN) sem quaisquer tratamentos; grupo BTX-12, cujas glândulas submandibulares direitas receberam injeção de 2,5 U toxina botulínica tipo A (Prosigne[®], Cristália, Itapira, SP, Brasil), reconstituída em 0,1 mL de solução de cloreto de sódio 0,9%, foram analisadas 12 dias após a 3ª aplicação; grupo BTX-35, cujas glândulas salivares receberam o mesmo tratamento do grupo BTX-12 dias, porém foram analisadas 35 dias após a 3ª aplicação (WEN, YUAN e

HOU, 2009) A dose de toxina botulínica utilizada no presente estudo foi escolhida após 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.

Para o estudo, cada animal do grupo BTX-12, BTX-35, receberam um total de três aplicações com intervalo de 35 dias cada totalizando 105 de tratamento, sendo o tempo de análise de cada subgrupo contado a partir do dia seguinte à última aplicação. Para a realização da aplicação da BTX-A foram realizados treinamentos do método de injeção intraglandular por palpação utilizando-se tinta tipo nanquim em animais do biotério destinados à eutanásia. 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), na proporção de 1:1 associados na mesma seringa, de acordo com o peso dos animais e administrados por via intramuscular. Foi realizada tricotomia e antissepsia da região cervical dos animais com clorexidina 2% e, através do método de palpação, procedeu-se com a injeção apenas da glândula submandibular do complexo submandibular-sublingual do lado direito.

3.3 Coleta do fígado e dos rins

Os órgãos foram coletados aos 12 dias (CN e BTX-12) e 35 dias (BTX-35) após a 3ª aplicação datas equivalentes ao pico de ação da droga e término desse efeito na estrutura glandular de ratos, respectivamente. Nas respectivas datas de análises, após anestesia dos animais foi realizada uma incisão na cavidade abdominal dos animais, para que o fígado e os rins fossem removidos (MOLLER e VAZQUEZ, 2011). Após a coleta dos órgãos, os mesmos foram seccionados transversalmente e imediatamente 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.

3.4 Confecção das preparações histológicas

Após a fixação, o material foi encaminhado para processamento, através da técnica histológica convencional na seguinte sequência: desidratação em concentrações crescentes de etanol (70% a 100%, por 40 min), banho de álcool e xilol (proporção de 1:1), diafanização com xilol (dois banhos de 40 min), embebição (3 banhos de 1 h) e inclusão em parafina histológica.

Cortes histológicos semisseriados (1:5) foram obtidos com aproximadamente 5µm, através de um micrótomo LEICA RM 2125 RT (*Leica Biosystems Nussloch GmbH, Alemanha*), utilizando-se navalha LEICA 818 (*Leica Biosystems*). Os cortes foram estirados em banho-maria histológico (Luptec, São Carlos, SP, Brasil), dispostos em lâminas de vidro e foram colocados em estufa J PROLAB 102 por aproximadamente 30 minutos a 37°C para secagem do material. Os espécimes foram corados pela hematoxilina e eosina (HE) e por Ácido Periódico de Schiff (PAS - *Schiff's Periodic Acid*) seguindo o protocolo de coloração do laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia da UFRPE, em seguida realizou-se a montagem em *Entellan®* (*Merck KGaA, Darmstadt, Germany*) (TIMM, 2005) para posteriormente proceder as análises histopatológica e histomorfométrica (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017).

3.5 Análise histopatológica

As preparações histológicas coradas em hematoxilina e eosina (HE) e também por Ácido Periódico de Schiff (PAS - *Schiff's Periodic Acid*) foram observadas, analisadas qualitativamente e fotografadas em fotomicroscópio binocular de luz LEICA ICC50 HD® (*Leica Microsystems, São Paulo, Brasil*) acoplado a uma câmera digital, conectado a um computador com placa de captura de imagem (ATI) através do software de captura *Leica LAS EZ®* (*Leica Microsystems, Buffalo Grove, EUA*). O software de captura *Leica LAS EZ®* (*Leica Microsystems*) converteu as unidades de medida (pixels) em unidades de micrometros (µ). Dois examinadores calibrados, através do uso de mascaramento (estudo duplo-cego), fizeram a descrição das estruturas hepáticas e renais.

3.6 Análise Histomorfométrica

A análise histomorfométrica foi realizada no *software Caseviewer* através de medições realizadas em imagens digitais obtidas em scanner *Pannoramic MIDI II* (*3DHISTECH, Budapest, Hungary*). Nos rins foram aferidos o diâmetro de 30 glomérulos renais por animal, traçando uma linha horizontal no plano equatorial do tufo glomerular e nos fígados foram aferidos área e perímetro dos núcleos de 90 hepatócitos por animal.

3.7 Análise Estatística

Para análise dos dados foi construído um banco na planilha eletrônica Microsoft Excel a qual foi exportada para o *software SPSS*, versão 18, onde foi realizada a análise. Para avaliar a normalidade do perímetro e da área dos núcleos dos hepatócitos, assim como comprimento dos corpúsculos renais, foi aplicado o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. No caso em que a normalidade foi indicada aplicou-se o teste da ANOVA e o teste de Tukey para comparação geral e múltipla da média entre os grupos avaliados. No caso em que a normalidade não foi indicada foram aplicados o teste de *Kruskal-Wallis* e o teste de *Mann-Whitney* para comparação geral e múltipla da distribuição da média entre os grupos avaliados, considerando o nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Análise Histopatológica

A análise histopatológica dos fígados do grupo controle evidenciou um padrão tecidual sem alterações evidentes, com lóbulos preservados, sistema porta sem alterações e ausência de infiltrados inflamatórios. Nos grupos tratados com BTX-A (BTX-12 e BTX-35) foi observado a presença hepatite aguda e crônica multifocal discreta (Fig1.a); ambos os grupos apresentaram mecanismo de adaptação como hipertrofia de hepatócitos multifocal moderada no grupo BTX-12 e difusa moderada no grupo BTX-35 e hipertrofia e hiperplasia de células de Kupffer focal moderada apenas no grupo BTX-12. Ambos os grupos apresentaram degeneração hidrópica centrolobular multifocal moderada em BTX-12 e difusa moderada em BTX-35 (Fig1.B). Também foi verificado congestão de sinusóides e veias centrolobulares difusa discreta no grupo BTX-35 e necrose de coagulação focal de leve a moderada em ambos os grupos.

Em relação aos rins o grupo controle (CN) apresentou um padrão tecidual sem alteração com corpúsculos renais sem alterações, a cápsula de Bowman preservada e o espaço capsular de tamanho normal. Também foi possível observar que os túbulos contorcidos proximais e distais não apresentaram quaisquer tipos de degeneração. Não foi observado presença de infiltrados. Todos grupos que receberam tratamento crônico com BTX-A evidenciou alterações histopatológicas; como glomerulopatia membranosa multifocal moderada no grupo BTX-12 (Fig.2.A) e difusa acentuada em BTX-35 e glomerulopatia membrano-proliferativa multifocal moderada em ambos os grupos (Fig.2.B). Também foi possível verificar a presença de cilindros hialinos intratubular multifocal discreto em BTX-12 e BTX-35. Os dois grupos tratados com BTX-A apresentou degeneração hidrópica nos nefrôn difusa discreta em BTX-12 e moderada em BTX-35 e nos túbulos contorcidos difusa moderada.

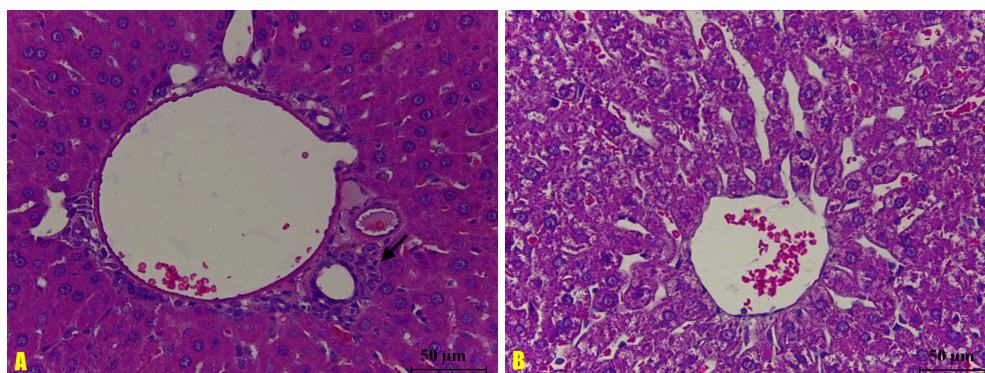


Figura 1: Fotomicrografias de fígados de ratas do grupo tratado com toxina botulínica tipo A analisado com 12 dias (A) e com 35 dias após a 3ª aplicação (B); A: Presença de infiltrado periportal neutrofílico histiocitário

discreto (seta). **B:** Degeneração centrolobular difusa moderada. **Coloração:** Hematoxilina e Eosina. **Aumento:** 400x.

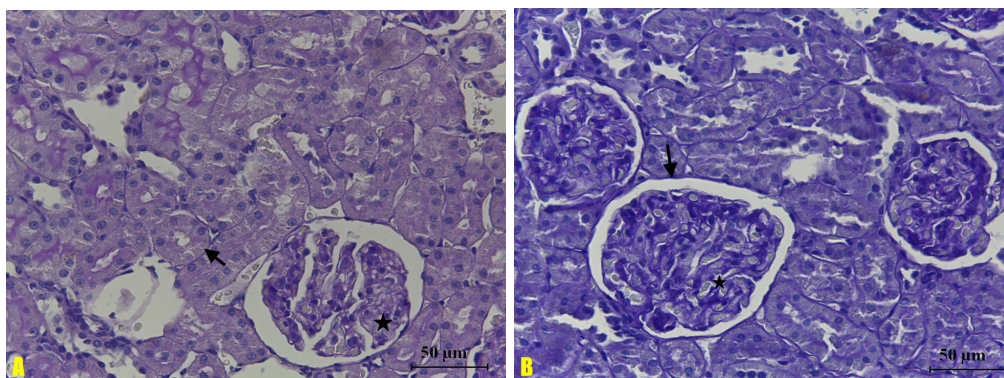


Figura 2: Fotomicrografias do córtex renal de ratas tratadas com toxina botulínica tipo A analisado com 12 dias (A) e com 35 dias após a 3ª aplicação (B). **A-** Glomerulopatia membranosa (asterisco) e espessamentos das membranas(seta). **B-** Glomerulopatia membrano-proliferativa – espessamento da cápsula de Bowman (seta) e proliferação de células mesangiais (asterisco). **Coloração:** Ácido Periódico de Schiff. **Aumento:** 400x.

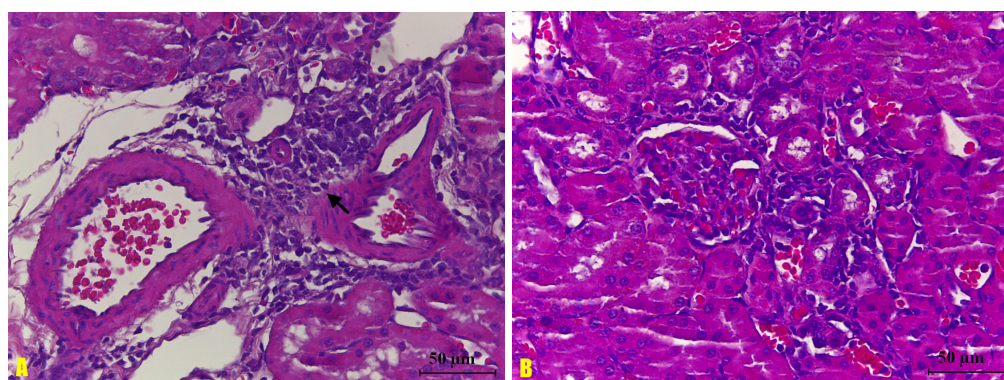


Figura 3: Fotomicrografias do córtex renal de ratas tratadas com toxina botulínica tipo A analisado com 12 dias (A) e com 35 dias após a 3ª aplicação (B). **A:** Infiltrado linfo-histiocitário perivascular (seta). **B:** Glomerulonefrite aguda. **Coloração:** Hematoxilina e Eosina. **Aumento:** 400x.

4.2 Análise Histomorfométrica

Na tabela 1 temos a mediana e amplitude interquartil do perímetro e da área dos núcleos dos hepatócitos, segundo o grupo de tratamento. Verifica-se maior mediana do perímetro e da área no grupo CN (mediana = 24,96 e 48,96 respectivamente) seguido do grupo BTX-12 (mediana = 24,66 e 47,07) e o grupo BTX-35 (mediana = 23,98 e 45,33) apresentou a menor mediana tanto para o perímetro como para a área. O teste de comparação da distribuição do perímetro e da área entre os grupos de tratamentos foi significativo (p -valor $< 0,001$), indicando

que existe diferença relevante entre os grupos. Ainda, verificou-se que o CN apresenta um perímetro e área significativamente maior (p -valor $< 0,001$) que todos os demais grupos avaliados (Tabela 2).

Na tabela 3 temos a média e desvio padrão do comprimento dos corpúsculos renais dos animais avaliados, segundo o grupo de tratamento. Verificou-se maior média do comprimento dos corpúsculos renais no grupo CN (média = 87,34) seguido do grupo BTX-12 (média = 83,21) e BTX-35 (média = 81,34). O teste de comparação de média do comprimento entre os grupos de tratamentos foi significativo, indicando que o grupo CN apresenta um comprimento significativamente maior (p -valor $< 0,001$), que todos os demais grupos avaliados (Tabela 4).

Tabela 1: Mediana e amplitude interquartil do perímetro e da área dos núcleos dos hepatócitos do fígado dos animais avaliados, segundo o grupo de tratamento.

Grupo avaliado	Medida avaliada	
	Perímetro	Área
BTX-12	24,66 (2,38)	47,07 (9,88)
BTX-35	23,98 (2,73)	45,33 (10,23)
CN	24,96 (2,70)	48,96 (10,53)
p-valor ¹	<0,001	<0,001
¹ p-valor do teste de Kruskal-Wallis		

Tabela 2: Teste de comparação¹ da distribuição do perímetro e da área dos núcleos dos hepatócitos do fígado entre os grupos de tratamento.

Comparação realizada	Medida avaliada	
	Perímetro	Área
BTX-12 x BTX-35	0,165	0,249
BTX-12 x CN	<0,001	<0,001
BTX-35 x CN	<0,001	<0,001
¹ p-valor do teste de Mann-Whitney		

Tabela 3: Média e desvio padrão do comprimento dos glomérulos renais dos animais avaliados, segundo o grupo de tratamento.

Grupo avaliado	Medida avaliada	
	Média	Desvio padrão
BTX-12	83,21	15,47
BTX-35	81,34	14,04
CN	87,34	15,17
p-valor ¹	<0,001	
¹ p-valor do teste da ANOVA.		

Tabela 4: Teste de comparação da média dos glomérulos renais entre os grupos de tratamento.

Comparação realizada	p-valor¹ da comparação
BTX-12 x BTX-35	0,641
BTX-12 x CN	0,020
BTX-35 x CN	<0,001
¹p-valor do teste de Tukey	

5. DISCUSSÃO

Na literatura não existe dados que corroborem com os resultados encontrados no presente estudo, em consequência de se desconhecer o processo de metabolização e excreção da BTX-A, contudo este trabalho norteia para uma possível compreensão de tais processos. Os resultados desta pesquisa em consonância com Simpson (2013), preenche parte da lacuna que há na necessidade de conhecer o destino da toxina desde o momento em que ela entra no corpo até que ela seja eliminada. Segundo o autor, processos como absorção de toxina, distribuição da molécula por todo o corpo, metabolismo sistêmico da toxina e eliminação da molécula do corpo são áreas inexploradas propiciado pelo intenso desejo de obter uma explicação completa para a ação de toxinas em células individuais, como por exemplo hepatócitos e corpúsculos renais.

No presente estudo as análises histopatológicas do fígado indicam que os grupos tratados com BTX-A sofreu alterações na sua arquitetura tecidual, apontando também que o grupo BTX-35 mostrou-se levemente mais alterado que o grupo BTX-12, o que pode indicar uma possível dificuldade do fígado a longo prazo em realizar a biotransformação da toxina em metabólitos inativos para que a mesma seja eliminada.

Simpson (2013) hipotetizou que a BTX-A permanece por longos períodos no organismo por que seu título circulante é muito baixo para ser detectado com eficiência e facilidade pelo fígado. Al-Saleem et al. (2008; 2017) demonstraram em estudos anteriores que em animais imunizados a depuração da toxina da circulação geral é rápida e há um acúmulo substancial de complexos anticorpo-antígeno no fígado, e que isto facilita o processo de detecção da toxina pelo fígado. Entretanto o processo de metabolização da toxina ainda não foi esclarecido e logo surge a hipótese se este acúmulo provocado pela associação ao anticorpo poderia aumentar as lesões a nível hepático, visto que já no presente estudo ficou comprovado que a toxina provoca lesão hepática em animais não imunizados, ou seja, a toxina é capturada pelo fígado sem a necessidade de anticorpos.

Existe uma preocupação global significativa com relação lesão hepática induzida por drogas (DILI) no que se refere ao desenvolvimento de drogas e a revisão regulatória, devido ao sucesso limitado dos modelos pré-clínicos existentes. (THAKKAR et al., 2020). Mundialmente o DILI é uma das principais causas de insuficiência hepática e a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) e a Agência de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos (FDA)

alertam que os métodos existentes para avaliar o DILI são insuficientes e que alguns dos biomarcadores translacionais de hepatotoxicidade devem ser recolocados (GRUDZINSKI et al., 2019). A BTX-A ainda não se encontra na lista de drogas capazes de induzir lesão hepática por falta de estudos que evidenciem características comum de DILI, contudo, os achados histopatológicos e morfométricos encontrados neste trabalho pode sugerir que a BTX-A provoca DILI e deve constar nas listas internacionais de medicamentos que promovem lesão hepática.

Investigações anteriores demonstraram que a biópsia hepática revelou necrose centrolobular com infiltrados lobulares de células inflamatórias, sugerindo hepatite aguda induzida por medicamento após administração de metilprednisolona na pulsoterapia (KIMURA et al, 2020). O mesmo ocorreu após tratamento com malatião que mostrou danos graves no tecido hepático, incluindo aumento proeminente de sinusóides, infiltração de células mononucleares, dilatação, hemorragia e necrose (SELMÍ et al., 2018). Também já foi demonstrado que a cisplatina causa muitas estruturas anormais, como infiltração inflamatória e necrose no fígado (UN et al., 2020). A necrose induzida por acetaminofeno também tem sido extensivamente estudada (IORGA e DARA, 2019; ZHENG et al., 2019). É cada vez mais reconhecido que a doença hepática gordurosa não alcoólica subjacente pode estar associada à doença hepática crônica em pacientes em uso de metotrexato para psoríase (WOLVERTON e VUPPALANCHI, 2020). O tratamento crônico com BTX-A apresentou padrão tecidual semelhante, dado que foi verificado no grupo BTX-12 presença de hepatite aguda e crônica, degeneração centrolobular multifocal e necrose de coagulação. O grupo BTX-35 além dos mesmos achados que o grupo analisado com 12 dias também apresentou congestão de sinusóides e veias centrolobulares difusa.

Durante a patogênese da DILI, os macrófagos hepáticos desempenham um papel central e no grupo BTX-12 foi observado moderada presença de células de kupfer (KCs). De acordo com Shan e Ju (2019) a DILI induz a ativação de KCs, o que resulta na liberação de citocinas inflamatórias e quimiocinas. Esse modo de ação inicia a infiltração de monócitos no fígado, que se diferenciam em macrófagos. Bhaijee e Anders (2017) diz que histologicamente, a DILI se manifesta em quatro principais padrões de lesão: inicia-se com hepatite aguda predominante por inflamação, em seguida hepatite aguda predominante por necrose, depois há a tentativa de reparo da hepatite aguda e por última hepatite sincicial de células gigantes. O tratamento crônico com BTX-A revelou a presença de hepatite aguda por infiltrado neutrófilo e linfocitário e necrose de coagulação, porém não foi observado características de reparo como

figuras de mitose e hepatócitos binucleados, o que pode indicar que a toxina pode progredir para uma hepatite crônica.

Segundo Wolverton e Vuppalandhi, (2020), os principais aspectos para o diagnóstico da DILI são: (a) associação temporal com o medicamento implicado, (b) desaprovação, ou seja, melhora com a descontinuação, (c) exclusão de etiologia competitiva e (d) reexposição, se ocorreu inadvertidamente. Na presente pesquisa verificou-se que o grupo BTX-35 apresentou intensidade maior das lesões hepáticas em relação ao grupo BTX-12, o que está em consonância com o primeiro aspecto, ou seja, quanto maior a duração do tratamento com BTX-A maior o aumento das lesões. Não foi possível avaliar se a descontinuação do tratamento com BTX-A ocasionaria em melhora, visto que os animais sofreram eutanásia logo após a 3ª aplicação. Estes mesmos animais não tinham outra etiologia que comprometesse o fígado e também não sofreram reexposição. Isto posto, fica evidente que a BTX-A induz a DILI e que deve ser considerada como medicamento hepatotóxico, embora este trabalho não tenha realizado testes de função hepática, visto que em muitos casos os testes de função estão sem alterações, mas com histopatológico positivo.

Em relação a morfometria não houve diferença significativa entre BTX-12 e BTX-35, mas ambos os grupos que receberam tratamento crônico apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle negativo. Os resultados identificaram que no fígado os núcleos dos hepatócitos de todos os grupos tratados diminuíram em relação ao grupo controle. A picnose, encolhimento do núcleo de uma célula (BOGLIOLO, 2013) pode ser um indicio de apoptose nos grupos tratados com toxina botulínica. A apoptose envolve encolhimento, desmontagem nuclear e fragmentação da célula em corpos acidofílicos discretos com membranas plasmáticas intactas, que são rapidamente fagocitadas pelas células de Kupfer vizinhas (SURIWINATAME E THUNG, 2011). As KCs foram encontradas com intensidade moderada na histopatologia dos grupos tratados com BTX-A, sendo mais um indicativo de apoptose. A atividade antiproliferativa da BTX-A já foi relatada em estudos que avaliaram o potencial pró-apoptótico em neoplasias de mama e próstata (KARSTENSY, 2009; BANDALA, 2013). A morte celular no IDILI é provável apoptose mediada por receptor de morte e o resultado de um sistema imunológico inato e adaptativo ativado, composto por outros fatores do hospedeiro, como genética, sexo, idade e capacidade de tolerância imunológica (IORGA e DARA, 2019).

Notoriamente este trabalho conseguiu comprovar que a BTX-A tem ação tóxica sobre o fígado podendo causar lesões que causam insuficiência hepática através de análises histopatológica e morformétrica, porém ainda são necessários testes bioquímicos de função hepática para asseverar os dados obtidos até o momento. Sugere-se ainda uso da técnica de imunohistoquímica para avaliação de morte celular por apoptose. Contudo, o presente estudo serve como precursor para investigações que ainda são necessárias em relação a possível hepatotóxicidade da BTX-A.

Em relação aos rins a análise histopatológica evidenciou que os grupos tratados com BTX-A apresentou sinais de nefrotoxicidade, em razão da intensa degeneração hidrópica nos néfrons e nos túbulos contorcidos, e também pela grande presença de lesões inflamatórias glomerulares em todos os grupos tratados como, as glomerulopatias membranosa e membranoproliferativa, sugerindo que a BTX-A compromete o funcionamento do rins, visto que um vasto dano crônico na biópsia renal prediz uma perda mais rápida da função renal.

Estudos anteriores identificaram que as toxinas presentes no veneno do escoripião *H. gentili* no rim mostrou degeneração no espaço de Bowman, com inchaço glomerular e no veneno da serpente tigre australiana em dois animais domésticos promoveu alterações hidrópicas no tecido renal e espaços expandidos de Bowman contendo um eosinofílico amorfo pálido foi sugestivo de proteinúria. (JACOBY-ALNER et al., 2011; EL-HIDAN et al., 2015). No presente estudo a BTX-A promoveu lesões semelhantes, como ocorreu no grupo avaliado aos 12 dias que apresentou degeneração hidrópica nos nefrôn difusa discreta em BTX-12 e moderada em BTX-35 e nos túbulos contorcidos difusa moderada. Também houve aumento da cápsula de Bowman como ocorreu com o veneno da serpente em felinos, contudo neste trabalho foi verificado que tal aumento foi provocado por uma diminuição do tufo glomerular, o que sugere uma perda de função renal (EADON, et al., 2020).

Substâncias como chumbo, glutamato monossádico e cloreto de mercúrio já são conhecidos na literatura científica por sua ação nefrotóxica ao causar lesões leves a moderadas nos níveis glomerular e tubular, como início de necrose, fibrose intersticial com acúmulo de células mononucleares, glomérulos degenerados e formação de células cariomegálicas contendo inclusões intranucleares no epitélio tubular proximal. Os resultados destes estudos em comparação com os danos causados ao tecido renal tanto glomerular quanto tubular durante o tratamento com BTX-A reforça ainda mais o potencial nefrotóxico da toxina mesmo que ainda sejam necessários testes de função renal (EL-NEWESHY et al., 2011; CONTINI et al., 2017; SCHYMAN et al., 2020) .

O tratamento com BTX-A também promoveu o desenvolvimento de glomerulopatias, como glomerulonefrite membranosa (GNM) e glomerulonefrite membranoproliferativa (GNMP) visto que o aumento de neutrófilos dentro do tufo glomerular é designado por glomerulonefrite proliferativa e a inflamação grave do tufo pode levar à proliferação de células mesangiais e epiteliais, com formação de locais de adesão entre as camadas visceral e parietal da cápsula de Bowman, denominada de glomerulonefrite membranosa (WALLIG et al., 2018).

A glomerulonefrite membranoproliferativa denota uma combinação de proliferação de células mesangiais e espessamento da membrana basal e é responsável por aproximadamente 7-10% de todos os casos confirmados por biópsia de glomerulonefrite e sua incidência vem diminuindo devido a uma menor ocorrência de infecções virais e bacterianas que podem causar a doença devido a antigenemia crônica (WALLIG et al., 2018; KAARTINEN et al, 2019). Não existe dados na literatura sobre nefrotoxicidade da BTX-A, logo seria interessante testes de função renal para afirmar com veemência que a substância testada nesse trabalho é nefrotóxica. Entretanto um modelo que incorpora características histopatológicas de amostras de biópsia renal melhorou a previsão de insuficiência renal e pode ser clinicamente valioso sobre a trajetória futura da taxa estimada de filtração glomerular e de acordo com este modelo podemos considerar que a BTX-A pode causar insuficiência renal (EADON, et al., 2020.).

Outro ponto a ser considerado em relação as glomerulonefrites presentes durante o tratamento com BTX-A é que as infecções também podem ter efeitos diretos nas células glomerulares, isso principalmente associado a suscetibilidade genética (COUSER & JOHNSON, 2014). Obviamente que as doses utilizadas neste estudo são consideradas terapêuticas para algumas doenças e neste estudo em específico para controle da sialorreia, contudo a BTX-A é uma toxina que provoca infecção e talvez estas doses reaplicadas diversas vezes possam promover algum nível de infecção. Ainda se faz necessário estudos complementares para elucidar estas hipóteses.

A análise histomorfométrica dos rins, indicou que todos os grupos apresentaram um leve grau de atrofia em relação ao controle, o que pode ser um indicativo de morte celular, embora ainda seja necessário a realização da técnica de imunohistoquímica para asseverar os resultados deste trabalho. Existem muitas dúvidas a cerca dos danos causados ao metabolismo e a excreção da BTX-A no tratamento de inúmeras patologias, mas com os resultados aqui apresentados pode-se considerar que a BTX-A tem ação hepatotóxica e nefrotóxica.

6. CONCLUSÃO

A escassez da literatura em relação a toxicidade da BTX-A dificulta a corroboração dos achados histopatológicos e histomorfométricos encontrados neste estudo, logo pode-se sugerir que: de acordo com os resultados histopatológicos obtidos, a Toxina Botulínica Tipo A tem potencial hepatotóxico e nefrotóxico, devido ao alto grau de lesões encontradas no parênquima hepático e renal cortical. A análise histomorfométrica indicou que houve diminuição do perímetro e área dos núcleos dos hepatócitos e do comprimento dos glomérulos renais avaliados, revelando que a BTX-A pode promover atrofia em tecido hepático e renal. Diante do exposto acima fica evidente a necessidade de estudos complementares para avaliar os níveis de toxicidade da BTX-A, entretanto este estudo norteia para a compreensão da disposição da BTX-A no organismo longe do sítio de aplicação.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Prosigne*[®]. Distrito Federal, 2003. Disponível em <http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto/consulta_medicamento.asp>. [Acesso em 13 jul. 2016].
- AL-SALEEM, F. H.; ANCHARSKI, D. M.; RAVICHANDRAN, E.; JOSHI, S. G.; SINGH, A. K.; GONG, Y.; SIMPSON, L. L. The Role of Systemic Handling in the Pathophysiologic Actions of Botulinum Toxin. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Vol. 326, No. 3, 2008.
- AL-SALEEM, F. H. ; SHARMA, R.; PULIGEDDA, R. D.; ELIAS, M.; KATTALA, C. D.; SIMON, P. M.; SIMPSON, L. L.; DESSAIN, S. K. RBC Adherence of Immune Complexes Containing Botulinum Toxin Improves Neutralization and Macrophage Uptake. **Toxins**, 9, 173, 2017.
- ALTER, K.E. High-Frequency Ultrasound Guidance for Neurotoxin Injections. **Phys Med Rehabil Clin N Am.**, v. 21, p. 607-630, 2010.
- ALVARENGA, A.; CAMPOS, M.; DIAS, M.; MELÃO, L.; ESTEVÃO-COSTA, J. BOTOX-A injection of salivary glands for drooling. **J Pediatr Surg.**, p. 1-4, 2016.
- AOKI, K.R. Pharmacology and immunology of botulinum toxin serotypes. **J Neurol**, v. 248, suppl. 1, p. I/3-I/10, 2001.
- ARANGO, H. G. Bioestatística: teórica e computacional: com banco de dados reais em disco. 3ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2009.
- ARELLANO-SALDAÑA, M.; RODRÍGUEZ-SILVERIO, J.; MORALES-OSORIO, M.G.; ARENAS-SORDO, M.L. Eficacia clínica de la aplicación de toxina botulínica tipo A en las glándulas submaxilares para el tratamiento de la sialorrea profusa en pacientes pediátricos con parálisis cerebral. **Investigación en Discapacidad**, v. 3, n. 3, p. 101-105, 2014.
- AUGUSTO, A.G.; PEREZ, A.C. Babação. Investigação quanto aos melhores métodos terapêuticos. **Acta ORL**, v. 24, n. 1, p. 1-6, 2006.
- BACHUR, T.; VEÍSSIMO, D.; SOUZA, M.; VASCONCELOS, S.; SOUSA, F. Toxina Botulínica: de Veneno a Tratamento. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica**, v. 3, n. 1, p. 9-19, 2009.
- BAIZABAL-CARVALLO, J.F.; JANKOVIC, J.; PAPPERT, E. Flu-like symptoms following botulinum toxin therapy. **Toxicon**, v. 58, p. 1-7, 2011.
- BANDALA, C.; SANTOS, J. L. M. P.; PADILLA, E. L.; LOPEZ, M. G. D.; RUIZ, M. A. Effect of Botulinum Toxin A on Proliferation and Apoptosis in T47D Breast Cancer Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Vol 14, 2013.

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

BARBOSA, C. M. R.; BARBOSA, J. R. A. Toxina Botulínica em Odontologia. 1 ed, Rio de Janeiro, Elsevier, 2017.

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

BHAIJEE F.; ANDERS R.A. Drug-induced hepatitis: histologic clues to a difficult diagnosis. **Diagnostic Histopathology**. 2017.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CHENG, L.W.; STANKER, L.H.; HENDERSON II, T.D.; LOU, J.; MARKS, J.D. Antibody Protection against Botulinum Neurotoxin Intoxication in Mice. *Infection and Immunity*, p. 4305-4313, 2009.

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

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

CONTINI, M. D. C.; FABRO, A.; MILLEN, N.; BENMELEJ, A.; MAHIEU, S. Adverse effects in kidney function, antioxidant systems and histopathology in rats receiving monosodium glutamate diet. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v 69, p 547-556, 2017.

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

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

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

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

COUSER, W. G.; JOHNSON, R. J. The etiology of glomerulonephritis: roles of infection and autoimmunity. *Kidney International*, V 86, p 905-914, 2014.

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

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

DÂNGELO, J.G.; FATTINI, C.A. Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar. 3a edição revisada. São Paulo: Editora Atheneu, 2011. 757 p.

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

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

DOUGLAS, C. R. Tratado De Fisiologia Aplicada As Ciencias Da Saude. 5 Ed. Sp. Robe Ed Belman Ed. Imp. Exp. 2002.

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

EADON, M. T.; SCHWANTES-AN, TH.; PHILLIPS, C. L.; ROBERTS, A. R.; GREENE, C. V.; HALLAB, A.; HART, K. J.; LIPP, S. N.; PEREZ-LEDEZMA, C.; OMAR, K. O.; KELLY, K. J.; MOE, S. M.; DAGHER, P. C.; EL-ACHKAR, T. M.; MOORTHY, R. N. Kidney Histopathology and Prediction of Kidney Failure: A Retrospective Cohort Study. *American Journal of Kidney Diseases*, 2020.

EL HIDAN, M. A.; TOULOUN, O.; EL HIBA, O.; CHAIT, A.; HAFID, J. E.; BOUMEZZOUGH, A. Behavioral, histopathological and biochemical impairments observed in mice envenomed by the scorpion: *Hottentota gentili* (Pallary, 1924). *Toxicon*, v 103, p 19-29, 2015.

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

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

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

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

ELLIES, M.; SCHÜTZ, S.; QUONDAMATTEO, F.; LASKAWI, R. Immunohistochemical Investigations of the Influence of Botulinum Toxin A on the Immunoreactivity of nNOS in the Parotid Gland of the Rat. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 64, n. 3, p. 397-401, 2006b.

EL-NEWESHY, M. S.; EL-SAYED, Y. D. Influence of vitamin C supplementation on lead-induced histopathological alterations in male rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v 63, p 221-227, 2011.

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

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

FRITSH, H.; KÜHNEL, W. Anatomia 2, Texto e Atlas – Esplancnologia. 9a edição revisada e ampliada. Porto Alegre: Artmed editora, 2008. 464 p.

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

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. Tratado de Histologia em Cores. 3. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

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

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

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

GOSS, C. M. Gray Anatomia. 29ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. pp 1176p.

GRUDZINSKI, I.P.; RUZYCKA, M.; CIESZANOWSKI, A.; SZESZKOWSKI, W.; BADUREK, I.; MALKOWSKA, A.; BAMBUROWICZ-KLIMKOWSKAA, M. MRI-based preclinical discovery of DILI: A lesson from paracetamol-induced hepatotoxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v 108, 2019.

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

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

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

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

IORGA, A.; DARA, L. Cell death in drug-induced liver injury. *Advances in Pharmacology*, v 85, p 31-74, 2019.

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

ISAÍAS, P.A.N.; DARÍO, R.M. Transtornos autonómicos. *Rev Mex Neuroci*, v. 10, n. 2, p. 128-132, 2009.

JACOBY-ALNER, T. E.; STEPHENS, N.; DAVERN, K. M.; BALMER, L.; BROWN, S. G. A.; SWINDELLSG, K. Histopathological analysis and in situ localisation of Australian tiger snake venom in two clinically envenomed domestic animals. *Toxicon*, v 58, p 304-314, 2011.

JIANG, H.; XIANG, Y.; HU, X.; CAI, H. Acrylamide inhibits nerve sprouting induced by botulinum toxin type A. *Neural Regeneration Research*, V. 9, p. 1525-1531, 2014.

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

JUNQUEIRA, L.C.U. & CARNEIRO, J. Histologia Básica, 12ªed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2013.

KHAN, W.U.; CAMPISI, P.; NADARAJAH, S.; SHAKUR, Y.A.; 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. *Otolaryngol Head Neck Surg.*, v. 137, n. 4, p. 339-344, 2011.

KARSENTY, G.; ROCHA, J.; CHEVALIER. S.; SCARLATA, E.; ANDRIEU, C.; ZOUANAT, F. Z.; ROCCHI, P.; GIUSIANO, S.; ELZAYAT, E. A.; CORCOS, J. Botulinum Toxin Type A Inhibits the Growth of LNCaP Human Prostate Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *The Prostate*. 69:1143-1150, 2009.

KAARTINEN, K.; SAFA, A.; KOTHA, S.; RATTI, G.; MERI, S. Complement dysregulation in glomerulonephritis. *Seminars in Immunology*, V 45, 2019.

KIMURA, H.; TAKEDA, A.; KIKUKAWA, T.; HASEGAWA, I.; MINO, T.; UCHIDA-KOBAYASHI, S.; OHSAWA, M.; ITOH, Y. Liver injury after methylprednisolone pulse therapy in multiple sclerosis is usually due to idiosyncratic drug-induced toxicity rather than autoimmune hepatitis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, v 42, 2020.

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

LI, L.; QIN, S.; PENG, J.; CHEN, A.; NIE, Y.; LIU, T.; SONG, K. Engineering gelatin-based alginate/carbon nanotubes blend bioink for direct 3D printing of vessel constructs. *International Journal of Biological Macromolecules*. V. 145, p. 262 -271, 2019.

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

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

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

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

MATAK, I.; LACKVIĆ, Z. Botulinum toxin A, brain and pain. *Progress in Neurobiology*, v. 119-120, p.39-59, 2014.

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

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

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

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

MENINGAUD, J.P.; PITAK-ARNNOP, P.; CHIKHANI, L.; BERTRAND, J.C. Drooling of saliva: A review of the etiology and management options. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 101, n. 1, p. 48-57, 2006.

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

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

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

MONDAL, A.; GEBEYEHU, A.; MIRANDA, M.; BAHADUR, D.; PATEL, N.; RAMAKRISHNAN, S.; RISHI, A. K.; SINGH, M. Characterization and printability of Sodium alginate - Gelatin hydrogel for bioprinting NSCLC co-culture. *Nature*, 2019.

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

MOORE, KEITH L., PERSAUD, T.V.N., TORCHIA, M. G. Embriologia Clínica. 9ª edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 540p.

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

MOORE, K.L.; DARLLEY, A.F.; AGUR, A.M.R. Anatomia Orientada para a Clínica. 8a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019. 1128 p.

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

NIKPASAND, A.; PARVIZI, M. R. Evaluation of the Effect of Titatnium Dioxide Nanoparticles/Gelatin Composite on Infected Skin Wound Healing; An Animal Model Study. *Bull Emerg Trauma*;7(4):366-372, 2019.

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

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

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

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

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

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

RHÉAUME, C.; CAI, B. B.; WANG, J.; FERNÁNDEZ-SALAS, E.; AOKI, E.R.; FRANCIS, J.; BROIDE, R. S. A Highly Specific Monoclonal Antibody for Botulinum Neurotoxin Type A-Cleaved SNAP25. *Toxins*, v. 7, p. 2354-2370, 2015.

ROCHA, P. M. C. Avaliação dos efeitos da virulência das cepas vacinais contra as doenças de newcastle e bronquite infecciosa em frangos de corte. Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária -UFRPE - 2018.

ROSS, M.H.; PAWLINA, W.; BARNASH, T.A. Atlas de Histologia Descritiva. 1. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

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

SAVARESE, R.; DIAMOND, M.; ELOVIC, E.; MILLIS, R.S. Intraparotid injection of botulinum toxin A as a treatment to control sialorrhea in children with cerebral palsy. *Am J Phys Med Rehabil*, v. 83, n. 4, p. 304-311, 2004.

SADLER, THOMAS W. Langman embriologia médica. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

SCHÜNKE, M.; SCHULTE, E.; SCHUMACHER, U.; VOLL, M.; WESKER, K. PROMETHEUS, Atlas de Anatomia – Pescoço e Órgãos Internos. 4a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019. 1758p.

SCHYMAN, P.; PRINTZ, R. L.; ABDULHAMEED, M. D. M.; ESTES, S. K.; SHIOTA, C.; SHIOTA, M.; WALLQVIST, A. A toxicogenomic approach to assess kidney injury induced by mercuric chloride in rats. *Toxicology*, v 442, 2020.

SELMİ, S.; RTİBİ, K.; GRAMİ, D.; SEBAİ, H. MARZOUKI, L. Malathion, an organophosphate insecticide, provokes metabolic, histopathologic and molecular disorders in liver and kidney in prepubertal male mice. *Relatórios de toxicologia*, v 5, p 189-195, 2018.

SHAMEL, M.; ANKILY, M. M. AL.; BAKR, M. M. Epidermal growth factor and botulinum toxin; Paralysis a bless? *Journal of Research in Medical and Dental Science*. Vol. 4. January – March, 2016.

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

SHAN, Z.; JU, C. Macrófagos hepáticos na lesão hepática induzida por drogas. *Pesquisa do fígado*, v 3, p 170-175, 2019.

SIMPSON, L. The life history of a botulinum toxin molecule. *Toxicon*, v.68, 40-59, 2013.

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

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

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

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

SURIAWINATA, A. A.; THUNG, S. N. Liver Pathology: na atlas and concise guide. *Demos Medical*, 2011.

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

THAKKAR, S.; LI, T.; LIU, Z.; WU, L.; ROBERTS, R.; TONG, W. Drug-induced liver injury severity and toxicity (DIList): binary classification of 1279 drugs by human hepatotoxicity. *Drug Discovery Today*, v 25, p 201-208, 2020.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. Princípios de anatomia e fisiologia– Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2013. pp1009-1050.

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

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

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

UN, H.; UGAN, R. A.; KOSE, D.; BAYIR, Y.; CADIRCI, E.; SELLI, J.; HALICI, Z. A novel effect of Aprepitant: Protection for cisplatin-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity. *European Journal of Pharmacology*, v 880, 2020.

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

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

VIEIRA, S. Bioestatística: Tópicos Avançados. Rio de Janeiro. 2004, 212p.

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

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

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

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). *Governments to agree increased focus on people with disabilities in development strategies*. Geneva: WHO, 2013. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2013/disability_and_development_20130920/en/>. [Acesso em 21 de jun 2014].

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

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

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

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

ZHENG, N.; GU, Y.; HONG, Y.; SHENG, L.; CHEN, L.; ZHANG, F.; HOU, J.; ZHANG, W.; ZHANG, Z.; JIA, W.; LI, H. Vancomycin pretreatment attenuates acetaminophen-induced liver injury through 2-hydroxybutyric acid. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2019.

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

WALLIG, M. A.; BOLON, B.; HASCHEK, W. M.; COLI ROUSSEAU, C. G. *Fundamentals of Toxicologic Pathology*. 3 Ed. United States, Elsevier, 2018.

WEN, W.D.; YUAN, F.; HOU, Y.P. The mechanism of inhibitory effect on parotid gland secretion with local injection of botulinum toxin type A in the rat. *Zhonghua Kou Qiang Yi XueZaZhi*. 44(1):38-40, 2009.

WOLVERTON, S. E.; VUPPALANCHI, R. Hepatotoxicity of Dermatologic Drug Therapy. *Comprehensive Dermatologic Drug Therapy*, p 677-688, 2020.

APÊNDICE A – ARTIGO

AVALIAÇÃO DO PARÊNQUIMA DO FÍGADO E DO RIM DE RATAS QUE RECEBERAM ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE TOXINA BOTULÍNICA TIPO A NA GLÂNDULA SALIVAR SUBMANDIBULAR

Janayze Suéllen de Lima Mendes Silva¹; Jaciel Benedito de Oliveira²; Juliana Pinto de Medeiros³.

¹ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia. Departamento de Histologia e Embriologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco - Av. da Engenharia, s/nº, Cidade Universitária, CEP: 50.760-420, Recife, PE, Brasil.

² Professor Adjunto do Departamento de Anatomia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco - Av. da Engenharia, s/nº, Cidade Universitária, Recife - PE, 50740-600.

³ Professora Adjunto do Departamento de Histologia e Embriologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Av. da Engenharia, s/nº, Cidade Universitária, CEP: 50.760-420, Recife, PE, Brasil.

Efeitos sistêmicos da Toxina Botulínica Tipo A no tratamento crônico da Sialorreia.

Autor Correspondente: Janayze Suéllen de Lima Mendes Silva.

Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia.

Departamento de Histologia e Embriologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco - Av. da Engenharia, s/nº, Cidade Universitária, CEP: 50.760-420, Recife, PE, Brasil.

E-mail de contato: janayzesuellen@hotmail.com

RESUMO

A toxina botulínica tipo A (BTX-A) tem sido utilizada como uma das opções de tratamento para controlar a sialorreia, entretanto ainda não se conhece seus efeitos sistêmicos após tratamento crônico. Este trabalho avaliou se o tratamento crônico com injeção intraglandular de toxina botulínica tipo A e o estabilizante utilizado, a gelatina de origem bovina, no complexo

submandibular-sublingual de ratas promove alterações histopatológicas no metabolismo hepático e renal. Foram utilizadas 21 ratas Wistar adultas, distribuídas em cinco grupos com 7 animais cada: controle, sem tratamento; grupos BTX-12 e BTX-35, que receberam 3 aplicações intercaladas de BTX-A. O grupo BTX-12 foi analisado 12 dias após o tratamento, enquanto o grupo BTX-35 foi analisado 35 dias após aplicação. Foram realizadas as análises histopatológicas e histomorfométricas do parênquima hepático e cortical renal coletados de todos os grupos. Foram encontradas alterações histopatológicas hepáticas e renais, como hipertrofia de hepatócitos, picnose, degenerações centrolobulares, infiltrado inflamatório, diminuição do espaço capsular, glomerulopatias e degenerações nos néfrons e túbulos contorcidos. A histomorfometria mostrou diminuição do tamanho dos núcleos dos hepatócitos e também do corpúsculo renal. Sendo assim, pode-se sugerir que a toxina botulínica tipo A administrada em ratas para o tratamento da sialorreia tem potencial hepatotóxico e nefrotóxico.

Palavras-chaves: Neurotoxina, Fígado, Rim, Toxicidade

ABSTRACT

A botulinum toxin type A (BTX-A) has been used as one of the treatment options to control a sialorrhea, but it still does not meet its systemic effects after chronic treatment. This work analyzed the chronic treatment with intraglandular injection of botulinum toxin type A and the stabilizer used, a gelatin of bovine origin, without complex submandibular-sublingual ration that promotes histopathological changes in hepatic and renal metabolism. 21 adult Wistar rats were used, distributed in five groups with 7 animals each: control, without treatment; BTX-12 and BTX-35 groups, which received 3 interleaved BTX-A applications. The BTX-12 group was analyzed 12 days after treatment, while the BTX-35 group was analyzed 35 days after application. They were performed as histopathological and histomorphometric analyzes of the hepatic and renal cortical parenchyma collected from all groups. Hepatic and renal histopathological alterations were found, such as hepatocyte hypertrophy, pycnosis, centrilobular degenerations, inflammatory infiltrate, decreased capsular space, glomerulopathies and degenerations in neon and twisted tubules. Histomorphometry showed a decrease in the size of the hepatocyte nuclei and also in the renal corpuscle. Therefore, you can suggest what type of botanical toxin is administered in doses for the treatment of sialorrhea with hepatotoxic and nephrotoxic potential.

Keyword: Neurotoxin, Liver, Aro, Toxicity

INTRODUÇÃO

A neurotoxina botulínica tipo A (BTX-A) é uma exotoxina que pode causar paralisia muscular transitória (Jiang et al., 2014; Rhéaume, 2015), e tem sido amplamente utilizada em diversas situações clínicas, dentre elas a sialorreia que é vazamento extraoral da saliva quando o paciente não consegue transportá-la da boca para o estômago. Em tal caso, na tentativa de propiciar melhor qualidade de vida a pacientes com doenças neurodegenerativas, as injeções percutâneas de BTX-A nas glândulas parótidas e/ou submandibulares podem representar uma opção útil para diminuir a salivação nestes pacientes (Manrique, 2005; Moller et al, 2011). Estudos anteriores confirmam que a aplicação da toxina botulínica é uma alternativa terapêutica com mínima invasão para o manejo da sialorreia, o que repercute positivamente nas dificuldades com a higiene bucal, risco de aspiração resultante de salivação retrógrada, pneumonia por aspiração potencialmente fatal, mas frequentemente, pode causar irritação da pele ou infecção perioral (Arellano-Saldaña, 2014; Jost et al., 2016).

O aumento exponencial do uso de BTX-A como tratamento para diversas doenças levanta a reflexão em relação as consequências sobre os possíveis efeitos colaterais no organismo a nível sistêmico, visto que, a BTX-A consegue persistir por longos períodos no corpo humano por ser muito estável na circulação sanguínea devido ao seu baixo peso molecular. Assim como por não haver evidências sobre sua disposição no corpo intacto e processos como a absorção, a distribuição da molécula em todo o corpo, o metabolismo sistêmico e a eliminação da molécula do corpo (Simpson, 2013).

A BTX-A é comercialmente vendida na forma liofilizada estéril, utilizando-se como estabilizante a albumina humana ou gelatina de origem bovina, este último utilizado mais recentemente e com a pretensão de menor poder de difusão tecidual local (Prosigne®, 2013; Botox®, 2015). Por conseguinte, o presente estudo foi motivado a fim de avaliar toxicidade e descrever as possíveis alterações na arquitetura tecidual do parênquima hepático e renal de ratas tratadas com injeção intraglandular de BTX-A e gelatina de origem bovina no complexo submandibular-sublingual de ratas wistar. E assim sendo suprir a carência de trabalhos na literatura sobre os efeitos sistêmicos da BTX-A utilizada na administração crônica para tratamento local da sialorreia, sobretudo nas funções hepáticas e renais.

MATERIAS E MÉTODOS

Desenho do Estudo

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 21 ratas (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*), adultas e saudáveis da linhagem Wistar, com peso entre 200-340g e com livre acesso a dieta padrão para roedores, mantidos em gaiolas com 4 animais, com temperatura de 23 +/- 2° C, respeitando o ciclo dia/noite de 12h cada. Todo o trabalho obedeceu às normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Tratamento dos Animais

Os animais foram divididos em três grupos com 7 animais cada: grupo controle (CN) sem quaisquer tratamentos; grupo BTX-12, cujas glândulas submandibulares direitas receberam injeção de 2,5 U toxina botulínica tipo A (Prosigne®, Cristália, Itapira, SP, Brasil), reconstituída em 0,1 mL de solução de cloreto de sódio 0,9%, foram analisadas 12 dias após a 3ª aplicação; grupo BTX-35, cujas glândulas salivares receberam o mesmo tratamento do grupo BTX-12 dias, porém foram analisadas 35 dias após a 3ª aplicação (Wen, Yuan e Hou, 2009). A dose de toxina botulínica utilizada no presente estudo foi escolhida após 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.

Para o estudo, cada animal do grupo BTX-12, BTX-35 receberam 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, totalizando 105 dias de tratamento. 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), na proporção de 1:1 associados na mesma seringa, de acordo com o peso dos animais e administrados por via intramuscular. Foi realizada tricotomia e antissepsia da região cervical dos animais com clorexidina 2% e, através do método de palpação, procedeu-se com a injeção apenas da glândula submandibular do complexo submandibular-sublingual do lado direito.

Os órgãos foram coletados aos 12 dias (BTX-12) e 35 dias (BTX-35) após a 3ª aplicação datas equivalentes ao pico de ação da droga e término desse efeito na estrutura glandular de

ratos, respectivamente. Nas respectivas datas de análises, após anestesia dos animais foi realizada uma incisão na cavidade abdominal dos animais, para que o fígado e os rins fossem removidos (Moller e Vazquez, 2011). Após a coleta dos órgãos, os mesmos foram seccionados transversalmente e imediatamente 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.

Avaliação Histológica e Histomorfométrica

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) e por Ácido Periódico de Schiff (PAS - *Schiff's Periodic Acid*) para proceder as análises histopatológica e histomorfométrica (Junqueira e Carneiro, 2017).

O diagnóstico histopatológico foi realizado pela observação em microscópio binocular de luz sob foco fixo e clareza de luz. A análise descritiva e qualitativa foi realizada por dois examinadores calibrados, e através do uso de mascaramento (estudo duplo-cego). A análise histomorfométrica foi realizada no *software Caseviewer* através de medições realizadas em imagens digitais obtidas em scanner *Pannoramic MIDI II* (3DHISTECH, Budapest, Hungary). Nos rins foram aferidos o comprimento de 30 glomérulos renais por animal, traçando uma linha horizontal no plano equatorial do tufo glomerular e nos fígados foram aferidos área e perímetro dos núcleos de 90 hepatócitos por animal.

Análise Estatística

Para análise dos dados foi construído um banco na planilha eletrônica Microsoft Excel a qual foi exportada para o *software SPSS*, versão 18, onde foi realizada a análise. Para avaliar a normalidade do perímetro e da área dos núcleos dos hepatócitos, assim como comprimento dos corpúsculos renais, foi aplicado o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. No caso em que a normalidade foi indicada aplicou-se o teste da ANOVA e o teste de *Tukey* para comparação geral e múltipla da média da medida entre os grupos avaliados. No caso em que a normalidade não foi indicada foram aplicados o teste de *Kruskal-Wallis* e o teste de *Mann-Whitney* para

comparação geral e múltipla da distribuição da medida entre os grupos avaliados. Todas as conclusões foram tiradas considerando o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Análise Histopatológica

A análise histopatológica dos fígados do grupo controle evidenciou um padrão tecidual sem alterações evidentes, com lóbulos preservados, sistema porta sem alterações e ausência de infiltrados inflamatórios. Nos grupos tratados com BTX-A (BTX-12 e BTX-35) foi observado a presença hepatite aguda e crônica multifocal discreta (Fig.1.A); ambos os grupos apresentaram mecanismo de adaptação como hipertrofia de hepatócitos multifocal moderada no grupo BTX-12 e difusa moderada no grupo BTX-35 e hipertrofia e hiperplasia de células de Kupffer focal moderada apenas no grupo BTX-12. Ambos os grupos apresentaram degeneração hidrópica centrolobular multifocal moderada em BTX-12 e difusa moderada em BTX-35 (Fig.1.B). Também foi verificado congestão de sinusóides e veias centrolobulares difusa discreta no grupo BTX-35 e necrose de coagulação focal de leve a moderada em ambos os grupos.

Em relação aos rins o grupo controle (CN) apresentou um padrão tecidual sem alteração com corpúsculos renais sem alterações, a cápsula de Bowman preservada e o espaço capsular de tamanho normal. Também foi possível observar que os túbulos contorcidos proximais e distais não apresentaram quaisquer tipos de degeneração. Não foi observado presença de infiltrados. Todos grupos que receberam tratamento crônico com BTX-A evidenciou alterações histopatológicas; como glomerulopatia membranosa multifocal moderada no grupo BTX-12 (Fig.2.A) e difusa acentuada em BTX-35 e glomerulopatia membrano-proliferativa multifocal moderada em ambos os grupos (Fig.2.B). Também foi possível verificar a presença de cilindros hialinos intratubular multifocal discreto em BTX-12 e BTX-35. Os dois grupos tratados com BTX-A apresentou degeneração hidrópica nos nefróns difusa discreta em BTX-12 e moderada em BTX-35 e nos túbulos contorcidos difusa moderada.

Análise Histomorfométrica

Na tabela 1 temos a mediana e amplitude interquartil do perímetro e da área dos núcleos dos hepatócitos, segundo o grupo de tratamento. Verifica-se maior mediana do perímetro e da área no grupo CN (mediana = 24,96 e 48,96 respectivamente) seguido do grupo

BTX-12 (mediana = 24,66 e 47,07) e o grupo BTX-35 (mediana = 23,98 e 45,33) apresentou a menor mediana tanto para o perímetro como para a área. O teste de comparação da distribuição do perímetro e da área entre os grupos de tratamentos foi significativo (p -valor $< 0,001$), indicando que existe diferença relevante entre os grupos. Ainda, verificou-se que o CN apresenta um perímetro e área significativamente maior (p -valor $< 0,001$) que todos os demais grupos avaliados (Tabela 2).

Na tabela 3 temos a média e desvio padrão do comprimento dos corpúsculos renais dos animais avaliados, segundo o grupo de tratamento. Verificou-se maior média do comprimento dos corpúsculos renais no grupo CN (média = 87,34) seguido do grupo BTX-12 (média = 83,21) e BTX-35 (média = 81,34). O teste de comparação de média do comprimento entre os grupos de tratamentos foi significativo, indicando que o grupo CN apresenta um comprimento significativamente maior (p -valor $< 0,001$), que todos os demais grupos avaliados (Tabela 4).

DISCUSSÃO

Na literatura não existe dados que corroborem com os resultados encontrados no presente estudo, em consequência de se desconhecer o processo de metabolização e excreção da BTX-A, contudo este trabalho norteia para uma possível compreensão de tais processos. Os resultados desta pesquisa em consonância com Simpson (2013), preenche parte da lacuna que há na necessidade de conhecer o destino da toxina desde o momento em que ela entra no corpo até que ela seja eliminada. Segundo o autor, processos como absorção de toxina, distribuição da molécula por todo o corpo, metabolismo sistêmico da toxina e eliminação da molécula do corpo são áreas inexploradas propiciado pelo intenso desejo de obter uma explicação completa para a ação de toxinas em células individuais, como por exemplo hepatócitos e corpúsculos renais.

No presente estudo as análises histopatológicas do fígado indicam que os grupos tratados com BTX-A sofreu alterações na sua arquitetura tecidual, apontando também que o grupo BTX-35 mostrou-se levemente mais alterado que o grupo BTX-12, o que pode indicar uma possível dificuldade do fígado a longo prazo em realizar a biotransformação da toxina em metabólitos inativos para que a mesma seja eliminada.

Simpson (2013) hipotetizou que a BTX-A permanece por longos períodos no organismo por que seu título circulante é muito baixo para ser detectado com eficiência e facilidade pelo fígado. Al-Saleem et al. (2008; 2017) demonstraram em estudos anteriores que em animais

imunizados a depuração da toxina da circulação geral é rápida e há um acúmulo substancial de complexos anticorpo-antígeno no fígado, e que isto facilita o processo de detecção da toxina pelo fígado. Entretanto o processo de metabolização da toxina ainda não foi esclarecido e logo surge a hipótese se este acúmulo provocado pela associação ao anticorpo poderia aumentar as lesões a nível hepático, visto que já no presente estudo ficou comprovado que a toxina provoca lesão hepática em animais não imunizados, ou seja, a toxina é capturada pelo fígado sem a necessidade de anticorpos.

Existe uma preocupação global significativa com relação lesão hepática induzida por drogas (DILI) no que se refere ao desenvolvimento de drogas e a revisão regulatória, devido ao sucesso limitado dos modelos pré-clínicos existentes. (THAKKAR et al., 2020). Mundialmente o DILI é uma das principais causas de insuficiência hepática e a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) e a Agência de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos (FDA) alertam que os métodos existentes para avaliar o DILI são insuficientes e que alguns dos biomarcadores translacionais de hepatotoxicidade devem ser recolocados (GRUDZINSKI et al., 2019). A BTX-A ainda não se encontra na lista de drogas capazes de induzir lesão hepática por falta de estudos que evidenciem características comum de DILI, contudo, os achados histopatológicos e morfométricos encontrados neste trabalho pode sugerir que a BTX-A provoca DILI e deve constar nas listas internacionais de medicamentos que promovem lesão hepática.

Investigações anteriores demonstraram que a biópsia hepática revelou necrose centrolobular com infiltrados lobulares de células inflamatórias, sugerindo hepatite aguda induzida por medicamento após administração de metilprednisolona na pulsoterapia (KIMURA et al, 2020). O mesmo ocorreu após tratamento com malatião que mostrou danos graves no tecido hepático, incluindo aumento proeminente de sinusóides, infiltração de células mononucleares, dilatação, hemorragia e necrose (SELMÍ et al., 2018). Também já foi demonstrado que a cisplatina causa muitas estruturas anormais, como infiltração inflamatória e necrose no fígado (UN et al., 2020). A necrose induzida por acetaminofeno também tem sido extensivamente estudada (IORGA e DARA, 2019; ZHENG et al., 2019). É cada vez mais reconhecido que a doença hepática gordurosa não alcoólica subjacente pode estar associada à doença hepática crônica em pacientes em uso de metotrexato para psoríase (WOLVERTON e VUPPALANCHI, 2020). O tratamento crônico com BTX-A apresentou padrão tecidual semelhante, dado que foi verificado no grupo BTX-12 presença de hepatite aguda e crônica, degeneração centrolobular multifocal e necrose de coagulação. O grupo BTX-35 além dos

mesmos achados que o grupo analisado com 12 dias também apresentou congestão de sinusóides e veias centrolobulares difusa.

Durante a patogênese da DILI, os macrófagos hepáticos desempenham um papel central e no grupo BTX-12 foi observado moderada presença de células de kupfer (KCs). De acordo com Shan e Ju (2019) a DILI induz a ativação de KCs, o que resulta na liberação de citocinas inflamatórias e quimiocinas. Esse modo de ação inicia a infiltração de monócitos no fígado, que se diferenciam em macrófagos. Bhajee e Anders (2017) diz que histologicamente, a DILI se manifesta em quatro principais padrões de lesão: inicia-se com hepatite aguda predominante por inflamação, em seguida hepatite aguda predominante por necrose, depois há a tentativa de reparo da hepatite aguda e por última hepatite sincicial de células gigantes. O tratamento crônico com BTX-A revelou a presença de hepatite aguda por infiltrado neutrófilo e linfocitário e necrose de coagulação, porém não foi observado características de reparo como figuras de mitose e hepatócitos binucleados, o que pode indicar que a toxina pode progredir para uma hepatite crônica.

Segundo Wolverton e Vuppalachchi, (2020), os principais aspectos para o diagnóstico da DILI são: (a) associação temporal com o medicamento implicado, (b) desaprovação, ou seja, melhora com a descontinuação, (c) exclusão de etiologia competitiva e (d) reexposição, se ocorreu inadvertidamente. Na presente pesquisa verificou-se que o grupo BTX-35 apresentou intensidade maior das lesões hepáticas em relação ao grupo BTX-12, o que está em consonância com o primeiro aspecto, ou seja, quanto maior a duração do tratamento com BTX-A maior o aumento das lesões. Não foi possível avaliar se a descontinuação do tratamento com BTX-A ocasionaria em melhora, visto que os animais sofreram eutanásia logo após a 3ª aplicação. Estes mesmos animais não tinham outra etiologia que comprometesse o fígado e também não sofreram reexposição. Isto posto, fica evidente que a BTX-A induz a DILI e que deve ser considerada como medicamento hepatotóxico, embora este trabalho não tenha realizado testes de função hepática, visto que em muitos casos os testes de função estão sem alterações, mas com histopatológico positivo.

Em relação a morfometria não houve diferença significativa entre BTX-12 e BTX-35, mas ambos os grupos que receberam tratamento crônico apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle negativo. Os resultados identificaram que no fígado os núcleos dos hepatócitos de todos os grupos tratados diminuíram em relação ao grupo controle. A picnose, encolhimento do núcleo de uma célula (BOGLIOLO, 2013) pode ser um indicio de

apoptose nos grupos tratados com toxina botulínica. A apoptose envolve encolhimento, desmontagem nuclear e fragmentação da célula em corpos acidofílicos discretos com membranas plasmáticas intactas, que são rapidamente fagocitadas pelas células de Kupfer vizinhas (SURIWINATAME E THUNG, 2011). As KCs foram encontradas com intensidade moderada na histopatologia dos grupos tratados com BTX-A, sendo mais um indicativo de apoptose. A atividade antiproliferativa da BTX-A já foi relatada em estudos que avaliaram o potencial pró-apoptótico em neoplasias de mama e próstata (KARSTENSY, 2009; BANDALA, 2013). A morte celular no IDILI é provável apoptose mediada por receptor de morte e o resultado de um sistema imunológico inato e adaptativo ativado, composto por outros fatores do hospedeiro, como genética, sexo, idade e capacidade de tolerância imunológica (IORGA e DARA, 2019).

Notoriamente este trabalho conseguiu comprovar que a BTX-A tem ação tóxica sobre o fígado podendo causar lesões que causam insuficiência hepática através de análises histopatológica e morformétrica, porém ainda são necessários testes bioquímicos de função hepática para asseverar os dados obtidos até o momento. Sugere-se ainda uso da técnica de imunohistoquímica para avaliação de morte celular por apoptose. Contudo, o presente estudo serve como precursor para investigações que ainda são necessárias em relação a possível hepatotoxicidade da BTX-A.

Em relação aos rins a análise histopatológica evidenciou que os grupos tratados com BTX-A apresentou sinais de nefrotoxicidade, em razão da intensa degeneração hidrópica nos néfrons e nos túbulos contorcidos, e também pela grande presença de lesões inflamatórias glomerulares em todos os grupos tratados como, as glomerulopatias membranosa e membranoproliferativa, sugerindo que a BTX-A compromete o funcionamento do rins, visto que um vasto dano crônico na biópsia renal prediz uma perda mais rápida da função renal.

Estudos anteriores identificaram que as toxinas presentes no veneno do escorpião *H. gentili* no rim mostrou degeneração no espaço de Bowman, com inchaço glomerular e no veneno da serpente tigre australiana em dois animais domésticos promoveu alterações hidrópicas no tecido renal e espaços expandidos de Bowman contendo um eosinofílico amorfo pálido foi sugestivo de proteinúria. (JACOBY-ALNER et al., 2011; EL-HIDAN et al., 2015). No presente estudo a BTX-A promoveu lesões semelhantes, como ocorreu no grupo avaliado aos 12 dias que apresentou degeneração hidrópica nos nefróns difusa discreta em BTX-12 e moderada em BTX-35 e nos túbulos contorcidos difusa moderada. Também houve aumento da

cápsula de Bowman como ocorreu com o veneno da serpente em felinos, contudo neste trabalho foi verificado que tal aumento foi provocado por uma diminuição do tufo glomerular, o que sugere uma perda de função renal (EADON, et al., 2020).

Substâncias como chumbo, glutamato monossádico e cloreto de mercúrio já são conhecidos na literatura científica por sua ação nefrotóxica ao causar lesões leves a moderadas nos níveis glomerular e tubular, como início de necrose, fibrose intersticial com acúmulo de células mononucleares, glomérulos degenerados e formação de células cariomegálicas contendo inclusões intranucleares no epitélio tubular proximal. Os resultados destes estudos em comparação com os danos causados ao tecido renal tanto glomerular quanto tubular durante o tratamento com BTX-A reforça ainda mais o potencial nefrotóxico da toxina mesmo que ainda sejam necessários testes de função renal (EL-NEWESHY et al., 2011; CONTINI et al., 2017; SCHYMAN et al., 2020) .

O tratamento com BTX-A também promoveu o desenvolvimento de glomerulopatias, como glomerulonefrite membranosa (GNM) e glomerulonefrite membranoproliferativa (GNMP) visto que o aumento de neutrófilos dentro do tufo glomerular é designado por glomerulonefrite proliferativa e a inflamação grave do tufo pode levar à proliferação de células mesangiais e epiteliais, com formação de locais de adesão entre as camadas visceral e parietal da cápsula de Bowman, denominada de glomerulonefrite membranosa (WALLIG et al., 2018).

A glomerulonefrite membranoproliferativa denota uma combinação de proliferação de células mesangiais e espessamento da membrana basal e é responsável por aproximadamente 7-10% de todos os casos confirmados por biópsia de glomerulonefrite e sua incidência vem diminuindo devido a uma menor ocorrência de infecções virais e bacterianas que podem causar a doença devido a antigenemia crônica (WALLIG et al., 2018; KAARTINEN et al, 2019). Não existe dados na literatura sobre nefrotoxicidade da BTX-A, logo seria interessante testes de função renal para afirmar com veemência que a substância testada nesse trabalho é nefrotóxica. Entretanto um modelo que incorpora características histopatológicas de amostras de biópsia renal melhorou a previsão de insuficiência renal e pode ser clinicamente valioso sobre a trajetória futura da taxa estimada de filtração glomerular e de acordo com este modelo podemos considerar que a BTX-A pode causar insuficiência renal (EADON, et al., 2020.).

Outro ponto a ser considerado em relação as glomerulonefrites presentes durante o tratamento com BTX-A é que as infecções também podem ter efeitos diretos nas células glomerulares, isso principalmente associado a suscetibilidade genética (COUSER & JOHNSON, 2014). Obviamente que as doses utilizadas neste estudo são consideradas

terapêuticas para algumas doenças e neste estudo em específico para controle da sialorreia, contudo a BTX-A é uma toxina que provoca infecção e talvez estas doses reaplicadas diversas vezes possam promover algum nível de infecção. Ainda se faz necessário estudos complementares para elucidar estas hipóteses.

A análise histomorfométrica dos rins, indicou que todos os grupos apresentaram um leve grau de atrofia em relação ao controle, o que pode ser um indicativo de morte celular, embora ainda seja necessário a realização da técnica de imunohistoquímica para asseverar os resultados deste trabalho. Existem muitas dúvidas a cerca dos danos causados ao metabolismo e a excreção da BTX-A no tratamento de inúmeras patologias, mas com os resultados aqui apresentados pode-se considerar que a BTX-A tem ação hepatotóxica e nefrotóxica.

CONCLUSÃO

A escassez da literatura é evidente com relação a hepatotoxicidade e nefrotoxicidade da toxina botulínica tipo A tornando difícil a possível corroboração com nossos achados histopatológicos e histomorfométrico. Desta forma, sugere-se que a BTX-A apresenta potencial hepatotóxico e nefrotóxico, porém ainda será necessário estudos complementares para confirmar os resultados deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a estagiária de Iniciação Científica por ajudar a realizar o processamento histológico. Também à Maxwelline Gonçalves por contribuir com a captura de algumas imagens e ao Dr. Jacinto Costa por ceder o espaço e equipamentos do laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares. Ao professor Joaquim Evêncio também por ceder o espaço do seu laboratório para a realização do processamento histológico e ao professor Dr. Daniel Perez por disponibilizar seu laboratório e equipamentos para o escaneamento das lâminas histológicas.

REFERÊNCIAS

Al-Saleem, F. H.; Ancharski, D. M.; Ravichandran, E.; Joshi, S. G.; Singh, A. K.; Gong, Y.; Simpson, L. L. (2008). The Role of Systemic Handling in the Pathophysiologic Actions of Botulinum Toxin. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Vol. 326, No. 3.

Al-Saleem, F. H. ; Sharma, R.; Puligedda, R. D.; Elias, M.; Kattala, C. D.; Simon, P. M.; Simpson, L. L.; Dessain, S. K. (2017). RBC Adherence of Immune Complexes Containing Botulinum Toxin Improves Neutralization and Macrophage Uptake. *Toxins*, 9, 173.

Arellano-Saldaña, M.; Rodríguez-Silverio, J.; Morales-Osorio, M.G.; Arenas-Sordo, M.L. (2014). Eficacia clínica de la aplicación de toxina botulínica tipo A en las glándulas submaxilares para el tratamiento de la sialorrea profusa en pacientes pediátricos con parálisis cerebral. *Investigación en Discapacidad*, v. 3, n. 3, p. 101-105.

Bandala, C.; Santos, J. L. M. P.; Padilla, E. L.; Lopez, M. G. D.; Ruiz, M. A. (2013). Effect of Botulinum Toxin A on Proliferation and Apoptosis in T47D Breast Cancer Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 14.

Bhaijee F.; Anders R.A. (2017). Drug-induced hepatitis: histologic clues to a difficult diagnosis. *Diagnostic Histopathology*.

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

Bogliolo, L. (2013). Patologia geral. 5. ed. Brasileiro Filho, G. (eds) Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. pp 233-284.

Cheng, L.W.; Stanker, L.H.; Henderson Ii,T.D.; Lou, J.; Marks, J.D.(2009). Antibody Protection against Botulinum Neurotoxin Intoxication in Mice. *Infection and Immunity*, p. 4305–4313.

Contini, M. d. C.; Fabro, A.; Millen, N.; Benmelej, A.; Mahieu, S. (2017). Adverse effects in kidney function, antioxidant systems and histopathology in rats receiving monosodium glutamate diet. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v 69, p 547-556.

Cortés-Monroy, C.; Soza, S. (2014). Usos prácticos de la toxina botulínica en adultos en medicina física y rehabilitación. *Rev. Med. Clin. Condes*, v. 25, n. 2, p. 225-236.

Couser, W. G.; Johnson, R. J. (2014). The etiology of glomerulonephritis: roles of infection and autoimmunity. *Kidney International*, V 86, p 905-914.

Cristália. (2006). Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA. Prosigne® - Mitos e Verdades. 12f. Disponível em <http://www.2cristalia.com.br/prosigne/mitos_e_verdades.pdf>. [Acesso em 28 de dezembro. 2019].

Eadon, M. T.; Schwantes-An, TH.; Phillips, C. L.; Roberts, A. R.; Greene, C. V.; Hallab, A.; Hart, K. J.; Lipp, S. N.; Perez-Ledezma, C.; Omar, K. O.; Kelly, K. J.; Moe, S. M.; Dagher, P. C.; El-Achkar, T. M.; Moorthi, R. N. (2020). Kidney Histopathology and Prediction of Kidney Failure: A Retrospective Cohort Study. *American Journal of Kidney Diseases*.

El Hidan, M. A.; Touloun, O.; El Hiba, O.; Chait, A.; Hafid, J. E.; Boumezzough, A. (2015). Behavioral, histopathological and biochemical impairments observed in mice envenomed by the scorpion: *Hottentota gentili* (Pallary, 1924). *Toxicon*, v 103, p 19-29.

El-Neweshy, M. S.; El-Sayed, Y. D. (2011). Influence of vitamin C supplementation on lead-induced histopathological alterations in male rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v 63, p 221-227.

Iorga, A.; Dara, L. (2019). Cell death in drug-induced liver injury. *Advances in Pharmacology*, v 85, p 31-74.

Jacoby-Alner, T. E.; Stephens, N.; Davern, K. M.; Balmer, L.; Brown, S. G. A.; Swindellsg, K. (2011). Histopathological analysis and in situ localisation of Australian tiger snake venom in two clinically envenomed domestic animals. *Toxicon*, v 58, p 304-314.

Jiang, H.; Xiang, Y.; Hu, X.; Cai, H. (2014). Acrylamide inhibits nerve sprouting induced by botulinum toxin type A. *Neural Regeneration Research*, V. 9, p. 1525-1531.

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

Junqueira, L.C.U. & Carneiro, J. (2013). *Histologia Básica*, 12ªed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. pp 367-384.

Kaartinen, K.; Safa, A.; Kotha, S.; Ratti, G.; Meri, S. (2019). Complement dysregulation in glomerulonephritis. *Seminars in Immunology*, V 45.

Karsenty, G.; Rocha, J.; Chevalier, S.; Scarlata, E.; Andrieu, C.; Zouanat, F. Z.; ROCCHI, P.; Giusiano, S.; Elzayat, E. A.; Corcos, J. (2009). Botulinum Toxin Type A Inhibits the Growth of LNCaP Human Prostate Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *The Prostate*. 69:1143-1150.

- Kimura, H.; Takeda, A.; Kikukawa, T.; Hasegawa, I.; Mino, T.; Uchida-Kobayashi, S.; Ohsawa, M.; Itoh, Y. (2020). Liver injury after methylprednisolone pulse therapy in multiple sclerosis is usually due to idiosyncratic drug-induced toxicity rather than autoimmune hepatitis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, v 42.
- Grudzinski, I.P.; Ruzycka, M.; Cieszanowski, A.; Szeszkowski, W.; Badurek, I.; Malkowska, A.; Bamburowicz-Klimkowskaa, M. (2019). MRI-based preclinical discovery of DILI: A lesson from paracetamol-induced hepatotoxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v 108.
- Manrique, D. (2005). Application of type A botulinum toxin to reduce saliva in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Rev. Bras. Otorrinolaringol*, v. 71, n. 5, p. 566-569.
- Matak, I.; Lackvić, Z. (2014). Botulinum toxin A, brain and pain. *Progress in Neurobiology*, v. 119–120, p.39-59.
- Matak, I.; Lackvić, Z. (2015). Botulinum neurotoxin type A: Actions beyond SNAP-25? *Toxicology*, v. 335, n. 1, p. 79-84.
- Moller, E.; Karlsborg, M.; Bardow, A.; Lykkeaa, J.; Nissen, F.H.; Bakke, M. (2011). Treatment of severe drooling with botulinum toxin in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease: Efficacy and possible mechanisms. *Acta Neurol Scand*, v. 69, n. 3, p. 151-157.
- Prosigne®. [Bula]. (2013). Bula para o profissional de Saúde. 13 f. Farmacêutico Responsável: Dr. José Carlos Módolo – CRF/SP nº 10.446. Lanzhou, Gansu, República Popular da China: Lanzhou Institute of Biological Products.
- Rhéaume, C.; Cai, B. B.; Wang, J.; Fernández-Salas, E.; Aoki, E.R.; Francis, J.; Broide, R. S. (2015). A Highly Specific Monoclonal Antibody for Botulinum Neurotoxin Type A-Cleaved SNAP25. *Toxins*, v. 7, p. 2354-2370.
- Schyman, P.; Printz, R. L.; Abdulhameed, M. D. M.; Estes, S. K.; Shiota, C.; Shiota, M.; Wallqvist, A. (2020). A toxicogenomic approach to assess kidney injury induced by mercuric chloride in rats. *Toxicology*, v 442.
- Shamel, M.; Ankily, M. M. Al.; Bakr, M. M. (2016). Epidermal growth factor and botulinum toxin; Paralysis a bless? *Journal of Research in Medical and Dental Science*. Vol. 4. January – March.

- Shan, Z.; Ju, C. (2019). Macrófagos hepáticos na lesão hepática induzida por drogas. *Pesquisa do fígado*, v 3, p 170-175.
- Selmi, S.; Rtibi, K.; Grami, D.; Sebai, H. Marzouki, L. (2018). Malathion, an organophosphate insecticide, provokes metabolic, histopathologic and molecular disorders in liver and kidney in prepubertal male mice. *Relatórios de toxicologia*, v 5, p 189-195.
- Simpson, L. (2013). The life history of a botulinum toxin molecule. *Toxicon*, v.68, 40-59.
- Suriawinata, A. A.; Thung, S. N. (2011). Liver Pathology: na atlas and concise guide. *Demos Medical*.
- Thakkar, S.; Li, T.; Liu, Z.; Wu, L.; Roberts, R.; Tong, W. (2020). Drug-induced liver injury severity and toxicity (DILIST): binary classification of 1279 drugs by human hepatotoxicity. *Drug Discovery Today*, v 25, p 201-208.
- Un, H.; Ugan, R. A.; Kose, D.; Bayir, Y.; Cadirci, E.; Selli, J.; Halici, Z. (2020). A novel effect of Aprepitant: Protection for cisplatin-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity. *European Journal of Pharmacology*, v 880.
- 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. *Zhonghua Kou Qiang Yi XueZaZhi*. 44(1):38-40.
- Zheng, N.; Gu, Y.; Hong, Y.; Sheng, L.; Chen, L.; Zhang, F.; Hou, J.; Zhang, W.; Zhang, Z.; Jia, W.; Li, H. (2019). Vancomycin pretreatment attenuates acetaminophen-induced liver injury through 2-hydroxybutyric acid. *Journal of Pharmaceutical Analysis*.

ANEXOS

TABELAS

Tabela 1: Mediana e amplitude interquartil do perímetro e da área dos núcleos dos hepatócitos do fígado dos animais avaliados, segundo o grupo de tratamento.

Grupo avaliado	Medida avaliada	
	Perímetro	Área
BTX-12	24,66 (2,38)	47,07 (9,88)
BTX-35	23,98 (2,73)	45,33 (10,23)
CN	24,96 (2,70)	48,96 (10,53)
p-valor ¹	<0,001	<0,001
¹ p-valor do teste de Kruskal-Wallis		

Tabela 2: Teste de comparação¹ da distribuição do perímetro e da área dos núcleos dos hepatócitos do fígado entre os grupos de tratamento.

Comparação realizada	Medida avaliada	
	Perímetro	Área
BTX-12 x BTX-35	0,165	0,249
BTX-12 x CN	<0,001	<0,001
BTX-35 x CN	<0,001	<0,001
¹ p-valor do teste de Mann-Whitney		

Tabela 3: Média e desvio padrão do comprimento dos glomérulos renais dos animais avaliados, segundo o grupo de tratamento.

Grupo avaliado	Medida avaliada	
	Média	Desvio padrão
BTX-12	83,21	15,47
BTX-35	81,34	14,04
CN	87,34	15,17
p-valor ¹	<0,001	
¹ p-valor do teste da ANOVA.		

Tabela 4: Teste de comparação da média dos glomérulos renais entre os grupos de tratamento.

Comparação realizada	p-valor¹ da comparação
BTX-12 x BTX-35	0,641
BTX-12 x CN	0,020
BTX-35 x CN	<0,001
¹p-valor do teste de <i>Tukey</i>	

FIGURAS

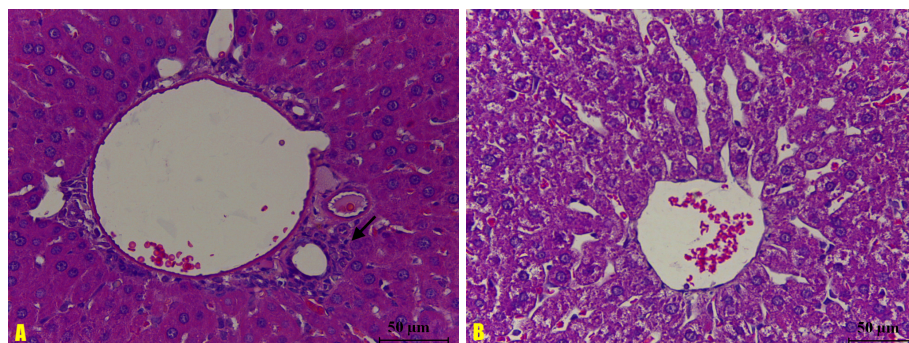


Figura 1: Fotomicrografias de fígados de ratas do grupo tratado com toxina botulínica tipo A analisado com 12 dias (A) e com 35 dias após a 3ª aplicação (B); A: Presença de infiltrado periportal neutrofílico histiocitário discreto (seta). B: Degeneração centrolobular difusa moderada. **Coloração:** Hematoxilina e Eosina. **Aumento:** 400x.

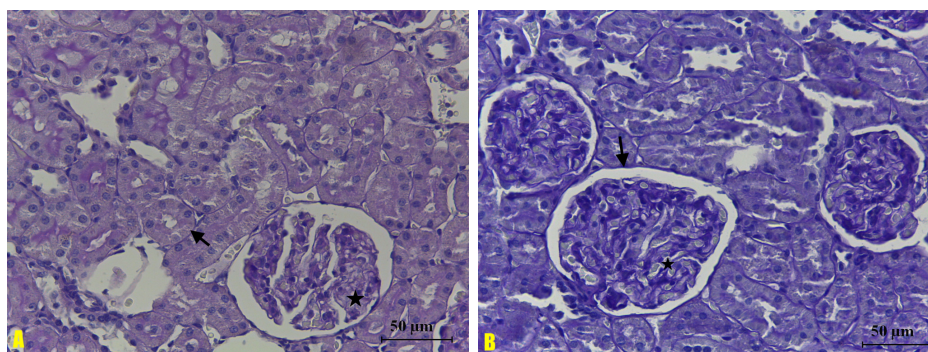


Figura 2: Fotomicrografias do córtex renal de ratas tratadas com toxina botulínica tipo A analisado com 12 dias (A) e com 35 dias após a 3ª aplicação (B) A- Glomerulopatia membranosa (asterisco) e espessamentos das membranas (seta). B- Glomerulopatia membrano-proliferativa – espessamento da cápsula de Bowman (seta) e proliferação de células mesangiais (asterisco). **Coloração:** Ácido Periódico de Schiff. **Aumento:** 400x.

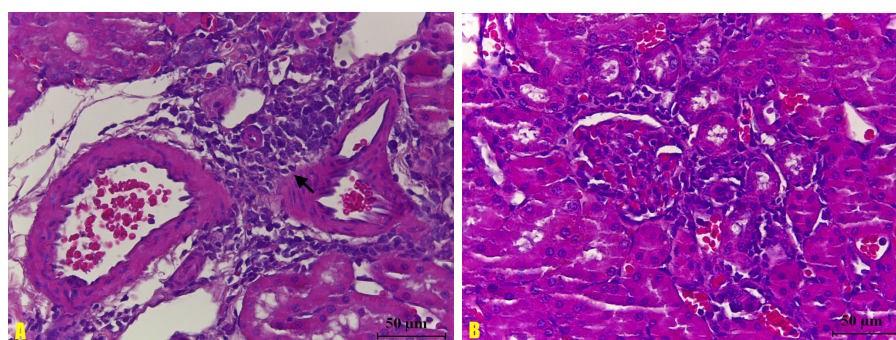


Figura 3: Fotomicrografias do córtex renal de ratas tratadas com toxina botulínica tipo A analisado com 12 dias (A) e com 35 dias após a 3ª aplicação (B). A: Infiltrado linfo-histiocitário perivascular (seta). B: Glomerulonefrite. **Coloração:** Hematoxilina e Eosina. **Aumento:** 400x.

ANEXO A- COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

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

Recife, 16 de março de 2017.

Ofício nº 11/17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Liriane Baratella Evencio**

Centro de Biociências

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº **23076.023152/2014-14**

Certificamos que a proposta intitulada **“Efeito do Tramento com Toxina Botulinica Tipo A no Complexo Submandibular-Sublingual de Ratos: Análise Morfológica, Microbiológica, Bioquímica e Imunohistoquímica”**, registrada com o nº **23076.023152/2014-14** sob a responsabilidade de Prof.º **Liriane Baratella Evencio** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 08/03/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	
Espécie/linhagem/raça	Ratos Wistar
Nº de animais	60
Peso/Idade	150-200g 30 dias
Sexo	Femea
Origem	Biotério de Depto de Nutrição

Atenciosamente,


 Prof. Dr. Pedro V. Carelli
 Presidente da CEUA / CCB - UFPE
 UFPE SIAPE 1801584