

EFEITOS DA APLICAÇÃO INTRAGLANDULAR DE TOXINA BOTULÍNICA TIPO A NA MICROBIOTA ORAL DE RATOS

Priscilla Suelen Oliveira Carvalho da Silva¹; Liriane Baratella Evêncio²

¹Estudante do Curso de Odontologia- CCS – UFPE; E-mail: priscilla_suelen@hotmail.com,

²Docente/pesquisador do Depto de Histologia e Embriologia – CCB – UFPE. E-mail: liriane@uol.com.br.

Sumário: O tratamento da sialorréia extensa e hipersalivação se faz necessário pelo constante risco de infecção pulmonar em pacientes com desordens neurológicas. Uma nova opção terapêutica surge com a aplicação da toxina botulínica em glândulas salivares. Assim, este trabalho teve como objetivo observar aspectos microbiológicos da cavidade oral de ratos submetidos ao tratamento intraglandular com toxina botulínica. Os animais foram divididos: o grupo I, que não receberam tratamento; o grupo II, submetidos à injeção intraglandular apenas com o veículo da toxina botulínica, a gelatina de origem bovina; e o grupo III, tratados com injeção intraglandular de toxina botulínica do tipo A. A coleta da microbiota oral foi realizada na saída dos ductos das glândulas submandibulares da cavidade oral do animal, através de um “swab” embebido em 40µL de solução de NaCl 0,9% estéril. O material coletado foi semeado em placas de Petri contendo Ágar-sangue e Ágar-Levine. Os resultados mostraram que o percentual de Unidades formadoras de colônias (UFCs) encontradas no grupo III apresentou um aumento significativo em relação aos grupos I e II. Na comparação das espécies bacterianas, houve uma maior variedade no grupo III além da identificação de bactérias gram-negativas, não observada nos grupos I e II.

Palavras-chave: glândula submandibular; microbiologia; toxina botulínica.

INTRODUÇÃO

O tratamento da sialorréia extensa, hipersalivação e aspiração de saliva em pacientes com desordens neurológicas como esclerose lateral amiotrófica, doença de Parkinson e paralisia cerebral, se fazem necessário pelo constante risco de infecção pulmonar destes pacientes (ELLIES et al., 2002). O procedimento proposto até então recorria ao uso de medicação anticolinérgica, terapia oromotora, procedimentos cirúrgicos (SAVARESE et al., 2004). O uso de anticolinérgicos traz muitos efeitos colaterais sistêmicos, por isso raramente são indicados. Estudos confirmam que o uso da toxina botulínica tipo A em injeções intraglandulares nas parótidas e submandibulares, guiadas ou não pelo método de ultrassonografia, levam a diminuição da secreção salivar, trazendo benefícios aos pacientes e familiares (JEUNG, 2012). Apesar da duração limitada, a injeção intraglandular de toxina botulínica tipo A é um procedimento pouco invasivo, constituindo-se em ótima alternativa de tratamento (MENDES et al., 2010). Entretanto, pouco se sabe dos reais efeitos colaterais da aplicação da BTX-A em glândulas salivares, pois na literatura corrente os estudos são com amostras de tamanhos pequenos e não identificam claramente estes possíveis efeitos adversos (BHAYANI e SUSKIND, 2008). Assim sendo, o presente estudo teve como objetivo estudar a composição bacteriana da saliva de ratos, após o tratamento com injeção intraglandular de toxina botulínica do tipo A em glândulas submandibulares, a fim de verificar alterações na microbiota oral destes animais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPE, sob nº 23076.023152/2014-14. Trinta ratas Wistar foram divididas em três grupos: o grupo I (controle, n = 6), que não receberam tratamento; o grupo II (grupo gelatina bovina, n = 12), submetidos a injeção intraglandular de 0,25mg do veículo da toxina botulínica, a gelatina de origem bovina (Gelita do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) diluída em 0,1 ml de NaCl 0,9%; e o grupo III (grupo BTX-A, n = 12), tratados com injeção intraglandular de 2,5 U de toxina botulínica do tipo A (Prosigne®, Cristália, China) reconstituída em 0,1ml de NaCl a 0,9% (Ellies *et al.*, 1999). O grupo II e o grupo III foram divididos em 2 subgrupos de 6 animais cada, sendo um com 15 e outro com 28 dias após a aplicação da droga. Cada subgrupo sofreu uma nova coleta de saliva na região de desembocadura dos ductos excretores das glândulas submandibulares, sendo realizada nova análise microbiológica. Inicialmente, os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (10mg/kg) e quetamina (0,5 mg/kg), administrados por via intramuscular. Após a obtenção do efeito anestésico foi realizada a coleta da microbiota oral correspondente à saída dos ductos das glândulas submandibulares na região sublingual da cavidade oral do animal, através de um “swab” embebido em 40µL de solução de NaCl 0,9% estéril. Foram semeadas placas de Petri contendo Ágar-sangue e Ágar-Levine para isolamento das bactérias gram-positivas e gram-negativas, respectivamente. Posteriormente, estas placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas o que permitiu a obtenção do crescimento bacteriano. As lâminas foram confeccionadas a partir de esfregaços secos à temperatura ambiente, fixadas pela chama do bico de Bunsen e coradas pelo método de Gram. Logo após a primeira coleta, foi realizada antissepsia da região cervical dos animais com clorexidina 2 % e a seguir realizada as injeções em uma única aplicação. Posteriormente, com 15 e 28 dias após a aplicação da droga, cada subgrupo sofreu uma nova coleta de saliva na região de desembocadura dos ductos excretores das glândulas submandibulares, sofrendo nova análise microbiológica. As UFCs que cresceram nas placas de Petri foram enumeradas por um contador manual de colônias sob lupa e os seus percentuais calculados. Para identificação das bactérias gram-negativas foi utilizado o Kit enterobactéria (Laborclin®, Pinhais, Paraná, Brasil). Para as bactérias gram-positivas empregaram-se os testes: Staphclin, Novobiocina e Optoquina; Ágar Bile Esculina e NaCl 6,5%. Em todos os testes estatísticos foi considerado um nível de significância de 5% (Field, 2009).

RESULTADOS

De acordo com o estudo realizado, em relação à quantidade de UFCs que cresceram nas placas de Petri, os dados obtidos nesta pesquisa demonstraram que o percentual de UFCs no grupo I (controle) foi de 18%. No grupo II (gelatina bovina) o percentual de UFCs foi de 16% no 15º dia e de 17% no 28º dia. No grupo III (BTX-A), o percentual foi de 24% no 15º e de 24% no 28º dia. A partir destes resultados pode-se constatar que o percentual de UFC no grupo III aumentou significativamente ($p < 0,05$). Dados referentes as variedades bacterianas e seu percentual encontrado foram realatados na tabela 1. Em relação às espécies bacterianas mais frequentes na cavidade oral das ratas pôde-se constatar que no grupo controle aquelas de maior frequência foram as do grupo *Streptococcus grupo viridans* (42,86%), seguidas da *Staphylococcus aureus* (28,57%). Por outro lado, no grupo da toxina botulínica (grupo III), ao 15º, dia foram evidenciados a *Staphylococcus saprophyticus* (33,33%), seguido de *Streptococcus bovis* (22,22%). O teste Qui-Quadrado mostrou que o *Streptococcus grupo viridans* sofreu significativo aumento percentual no grupo tratado com a gelatina bovina, tanto no 15º dia (45,45%), quanto no 28º dia (77%) ($p < 0,05$).

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

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

* Grupo viridans: *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. salivarius* e *S. anginosus*.

** Bactérias Gram-negativas. † = p < 0,05.

DISCUSSÃO

Segundo Yamamoto; Gacek, 2012, a microbiota normal refere-se aos microrganismos que habitam a pele e mucosa dos seres saudáveis, que em estado de higiene física não são patogênicos. A proporção de diferentes espécies de bactérias varia de acordo com a presença de processos inflamatórios e infecciosos. Em relação às espécies bacterianas mais frequentes na cavidade oral das ratas pôde-se constatar que no grupo controle aquelas de maior frequência foram as do grupo *Streptococcus grupo viridans* (42,86%), seguidas da *Staphylococcus aureus* (28,57%). Em concordância com estudos realizados por Yamamoto; Gacek, 2012 e Araújo, *et al.*, 2007 observou-se a prevalência destes, levantando também questões sobre o papel desta bactéria na microbiota oral destes animais. Na observação de espécies gram-positivas e gram-negativas, foi observada a existência de 100% de bactérias gram-positivas no grupo controle e grupo II (gelatina bovina), com uma redução no grupo III (82%) após a administração da toxina botulínica e coleta do material nos 15° e 28° dias. Nos dois subgrupos do grupo III, pode-se verificar um surgimento de bactérias gram-negativas e uma diminuição da quantidade de gram-positivas. As alterações encontradas no grupo III denota a influência da toxina botulínica na alteração do fluxo salivar, diminuindo sua atuação na cavidade oral. O acúmulo de placa dentária ocasionado pela hipossalivação pode provocar a inflamação da gengiva predominando a microflora anaeróbia, sendo as bactérias Gram negativas predominantes, nos ratos suscetíveis no processo de acúmulo de placas. Estes dados concordam com relatos de Yamamoto; Gacek, (2012) que verificaram o surgimento de bactérias gram-negativas associada e a complexa população de espiroquetas e bactérias gram-positivas, levou a alterações proporcionais, na placa bacteriana o que contribui para o desenvolvimento da inflamação gengival, periodontoses e estomatites.

CONCLUSÕES

A aplicação de toxina botulínica tipo A intraglandular em glândulas submandibulares interferiu na microbiota oral das ratas, alterando-a quantitativa e qualitativamente quando executada em uma única aplicação. Esta aplicação da toxina promoveu um surgimento de bactérias gram-negativas e uma diminuição da quantidade de gram-positivas ocasionado pelo efeito da hipossalivação nos animais.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento à Propesq e ao CNPq pela concessão da bolsa PIBIC, a empresa Cristália que forneceu a toxina botulínica tipo A (Prosigne).

REFERÊNCIAS

ELLIES, M.; ROHBACK-VOLLAND, S.; ARGLEBE, C.; WILKEN, B.; LASKAWI, R.; HNEFELD, F. Successful management of drooling with botulinum toxin A in neurologically disabled children. *Neuropediatrics*, 33(6):327-30, 2002a.

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

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

MOURA, S.A.B.; MEDEIROS, A.M.C.; COSTA, F.R.H.; MORAES, P.H. et al. Valor diagnóstico da saliva em doenças orais e sistêmicas: uma revisão de literatura. *Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.*, v. 7, p. 187-194, 2007.

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

YAMAMOTO V, GACEK RRF. Microbiota oral de ratos e camundongos: estudo da prevalência de bactérias Gram-positivas. *RESBCAL*, v.1 n.4, p. 302-309, 2012.