

Avaliação hepática e renal em ratas submetidas à administração crônica de toxina botulínica tipo A na glândula salivar submandibular

Hepatic and renal evaluation in rats submitted to chronic administration of botulinum toxin tip A in the submandibular salivary gland

Evaluación hepática y renal en ratas sometidas a la administración crónica de toxina botulínica tipo A en la glándula saliva submandibular

Recebido: 02/07/2022 | Revisado: 16/07/2022 | Aceito: 18/07/2022 | Publicado: 26/07/2022

Janayze Suéllen de Lima Mendes Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7496-8207>
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: janayzesuellen@hotmail.com

Francisco de Assis Leite Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6770-8797>
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: francisco.alsouza@ufrpe.br

Maria Edna Gomes de Barros

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3028-9186>
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: m.ednabarros@gmail.com

Augusto César Leal Da Silva Leonel

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8760-7328>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: augusto.leonel@ufpe.br

Liriane Baratella Evêncio

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0560-0681>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: liriane@uol.com.br

Luciana Silva Regueira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4139-6251>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: luciana.regueira@ufpe.br

Joaquim Evêncio Neto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6026-1390>
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: joaquim.evenciont@ufrpe.br

Jaciel Benedito de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5967-1800>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: jaciel.oliveira@ufpe.br

Juliana Pinto de Medeiros

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9400-8067>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: juliana.pintomedeiros@ufpe.br

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. Sendo assim, objetivou-se avaliar alterações histopatológicas do parênquima hepático e renal de ratas tratadas cronicamente com injeção de toxina botulínica tipo A no complexo submandibular-sublingual. Foram utilizadas 21 ratas Wistar adultas, distribuídas em três grupos com 7 animais cada: controle; grupos BTX-12 e BTX-35, que receberam 3 aplicações intercaladas de BTX-A. O grupo BTX-12 e BTX-35 foram analisados aos 12 e 35 dias após o tratamento, respectivamente. Foram realizadas as análises histopatológicas e histomorfométricas do fígado e do rim de todos os animais dos grupos. No fígado foi observado alterações histopatológicas caracterizadas por hipertrofia de hepatócitos, picnose, degeneração centrolobular e infiltrado linfo-histiocitário, neutrofílico e nos rins foi observado diminuição do espaço capsular, glomerulopatias e degenerações nos néfrons e túbulos contorcidos. A histomorfometria revelou redução no tamanho dos núcleos dos

hepatócitos e também do glomérulo 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-chave: Neurotoxina; Fígado; Rim; Toxicidade; Histopatologia.

Abstract

Botulinum toxin type A (BTX-A) has been used as one of the treatment options to control sialorrhea, however its systemic effects after chronic treatment are not yet known. Therefore, the objective was to evaluate histopathological alterations of the hepatic and renal parenchyma of rats chronically treated with botulinum toxin type A injection in the submandibular-sublingual complex. Twenty-one adult Wistar rats were divided into three groups with 7 animals each: control; groups BTX-12 and BTX-35, which received 3 intercalated applications of BTX-A. The BTX-12 and BTX-35 groups were analyzed at 12 and 35 days after treatment, respectively. Histopathological and histomorphometric analyzes of the liver and kidney of all animals in the groups were performed. In the liver, histopathological changes were observed characterized by hypertrophy of hepatocytes, pyknosis, centrilobular degeneration and lymphohistiocytic, neutrophilic infiltrate and in the kidneys, decreased capsular space, glomerulopathies and degenerations in nephrons and convoluted tubules were observed. Histomorphometry revealed a reduction in the size of the hepatocyte nuclei and also of the renal glomerulus. Therefore, it can be suggested that botulinum toxin type A administered to rats for the treatment of sialorrhea has hepatotoxic and nephrotoxic potential.

Keywords: Neurotoxin; Liver; Kidney; Toxicity; Histopathology.

Resumen

La toxina botulínica tipo A (BTX-A) se ha utilizado como una de las opciones de tratamiento para controlar la sialorreia, sin embargo, aún no se conocen sus efectos sistémicos después del tratamiento crónico. Por tanto, el objetivo fue evaluar las alteraciones histopatológicas del parénquima hepático y renal de ratas tratadas crónicamente con inyección de toxina botulínica tipo A en el complejo submandibular-sublingual. Veintiún ratas Wistar adultas se dividieron en tres grupos de 7 animales cada uno: control; grupos BTX-12 y BTX-35, que recibieron 3 aplicaciones intercaladas de BTX-A. Los grupos BTX-12 y BTX-35 se analizaron a los 12 y 35 días después del tratamiento, respectivamente. Se realizaron análisis histopatológicos e histomorfométricos del hígado y riñón de todos los animales de los grupos. En hígado se observaron cambios histopatológicos caracterizados por hipertrofia de hepatocitos, picnosis, degeneración centrolobulillar e infiltrado linfocitario, neutrofílico y en riñones se observó disminución del espacio capsular, glomerulopatías y degeneraciones en nefronas y túbulos contorneados. La histomorfometría reveló una reducción del tamaño de los núcleos de los hepatocitos y también del glomérulo renal. Por lo tanto, se puede sugerir que la toxina botulínica tipo A administrada a ratas para el tratamiento de la sialorreia tiene potencial hepatotóxico y nefrotóxico.

Palabras clave: Neurotoxina; Hígado; Riñón; Toxicidad; Histopatología.

1. 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).

Sendo assim, buscando 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, o presente estudo tem o objetivo de avaliar e descrever as possíveis alterações teciduais do parênquima hepático e renal de ratas Wistar tratadas com injeção de BTX-A no complexo submandibular-sublingual.

2. Metodologia

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. 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 de toxina botulínica tipo A (Prosigne[®], Cristália, Itapira, SP, Brasil), reconstituída em 0,1 mL de solução de cloreto de sódio 0,9%, analisadas 12 dias após a terceira aplicação; grupo BTX-35, cujas glândulas salivares receberam o mesmo tratamento do grupo BTX-12 dias, porém foram analisadas 35 dias após a terceira aplicação, seguindo metodologia descrita por Wen, et al., (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 dos grupos BTX-12 e BTX-35 recebeu um total de três aplicações intervaladas a cada 35 dias, sendo o tempo de análise de cada grupo 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 antisepsia 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.

O fígado e os rins foram coletados aos 12 dias (BTX-12) e 35 dias (BTX-35) após a terceira 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 eutanásia dos animais foi realizada uma incisão na cavidade abdominal dos animais, para que o fígado e os rins fossem removidos (Moller & Vazquez, 2011). Após a coleta dos órgãos, estes 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 histopatológica e histomorfométrica

Após a fixação, o material foi encaminhado para processamento histológico de rotina, onde foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol, incluídos em parafina, para posterior confecção dos blocos. O material foi cortado a 5µm em micrótomo rotativo RM 2125 (Leica®) para em seguida serem dispostos em lâminas untadas com albumina de Mayer. As preparações foram então coradas pela hematoxilina e eosina (HE) e por Ácido Periódico de Schiff (PAS - *Periodic Acid Schiff's*) para proceder as análises histopatológica e histomorfométrica (Tolosa *et al.*, 2003; Junqueira & Carneiro, 2017).

A análise histopatológica foi realizada em microscópio óptico de luz. A análise descritiva e qualitativa foi realizada por dois examinadores por meio de sistema duplo-cego. A análise histomorfométrica foi realizada no *software Caseviewer* através de mensurações realizadas em imagens digitais obtidas em scanner *Pannoramic MIDI II* (3DHISTECH, Budapest, Hungary). Nos rins foi aferidos o comprimento de 30 glomérulos renais por animal, traçando uma linha horizontal no plano equatorial do tufo glomerular e nos fígados foram aferidas a área e o perímetro dos núcleos de 90 hepatócitos por animal.

Análise Estatística

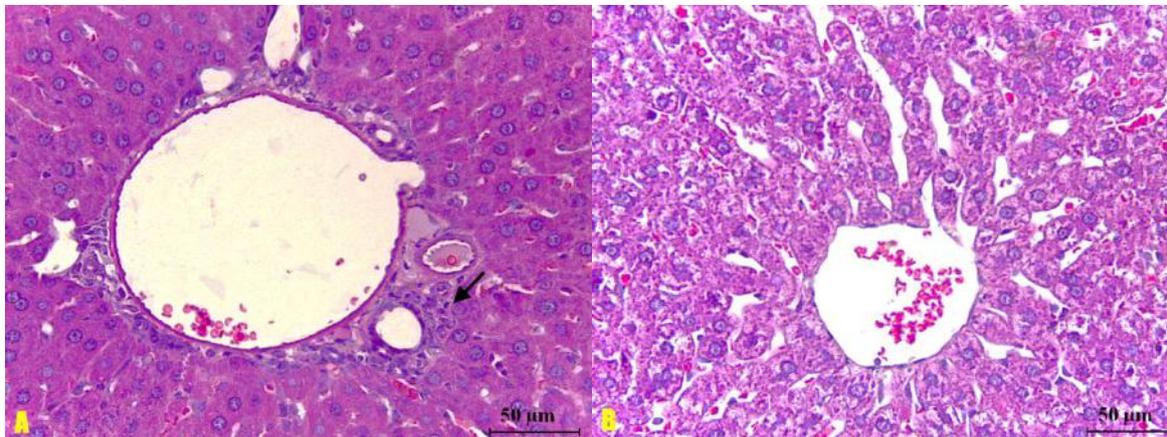
Para a análise estatística foi construído um banco de dados no Microsoft Excel o qual foi exportado para o *software SPSS*, versão 18, onde foi realizada a análise. Para avaliar a normalidade do perímetro e da área dos núcleos dos hepatócitos, assim como o comprimento dos corpúsculos renais, foi aplicado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

3. 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 de hepatite aguda a crônica multifocal discreta (Fig.1.A); os animais de ambos os grupos apresentaram mecanismo de adaptação como hipertrofia de hepatócitos multifocal moderada no grupo BTX-12 e difusa moderada no grupo BTX-35, além de hipertrofia e hiperplasia de células de Kupffer focal moderada apenas no grupo BTX-12. Em Ambos os grupos, os animais apresentaram degeneração hidrópica centrolobular, sendo 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 leve a moderada em ambos os grupos.

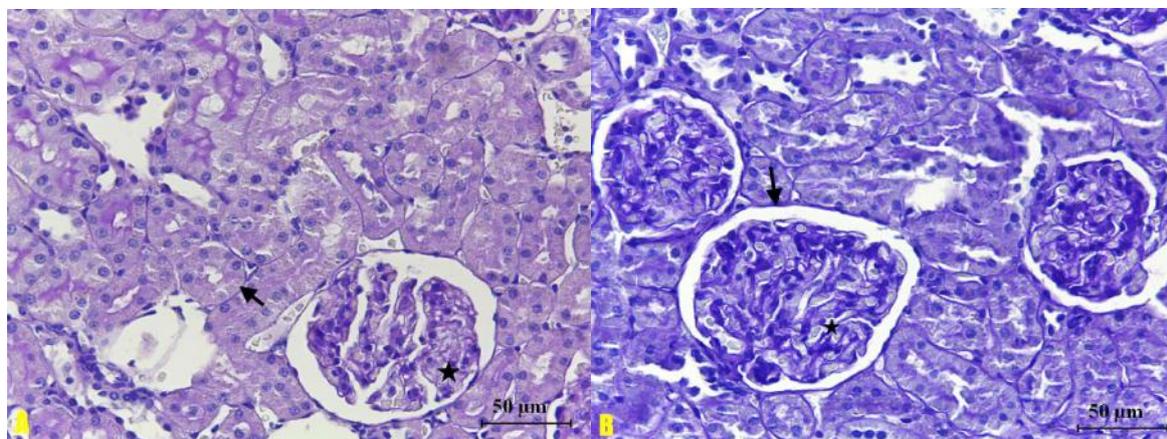
Figura 1: Fotomicrografias do fígado de ratas do grupo tratado com toxina botulínica tipo A analisado com 12 dias (**A**) e com 35 dias após a terceira aplicação (**B**); **A:** Presença de infiltrado periportal neutrofílico histiocitário discreto (seta). **B:** Degeneração centrolobular difusa moderada.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



Fonte: Dados da pesquisa (2020).

Em relação aos rins os animais do grupo controle (CN) apresentaram um padrão tecidual sem alteração com 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 observada presença de infiltrado inflamatório. Todos os 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 membranoproliferativa 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.

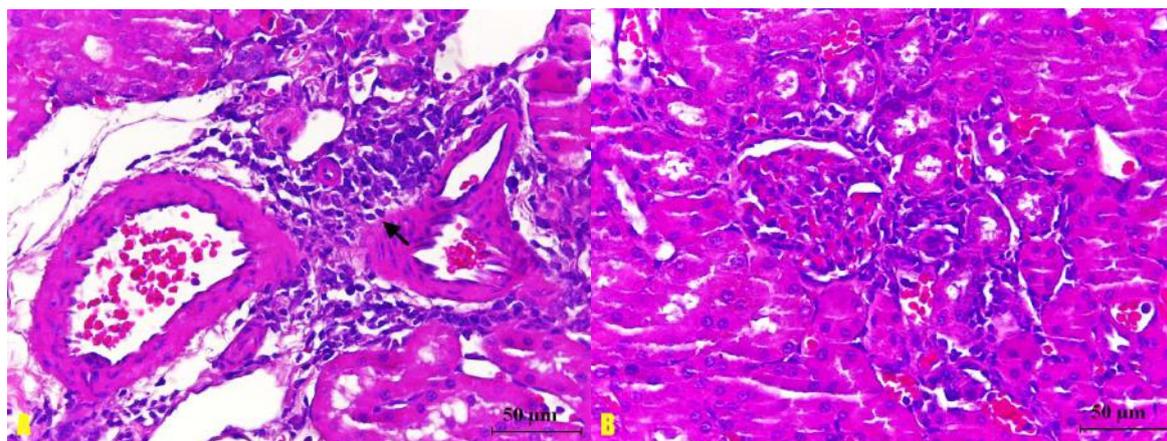
Figura 2: Fotomicrografias do córtex renal de ratas tratadas com toxina botulínica tipo A analisado com 12 dias (**A**) e com 35 dias após a terceira aplicação (**B**); **A:** Glomerulopatia membranosa (asterisco) e espessamentos das membranas (seta). **B:** Glomerulopatia membranoproliferativa – espessamento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



Fonte: Dados da pesquisa (2020).

Os dois grupos tratados com BTX-A apresentaram nos néfrons, degeneração hidrópica difusa discreta em BTX-12 e moderada em BTX-35 e nos túbulos contorcidos degeneração hidrópica difusa moderada. Também foi observado infiltrado linfocitário perivascular focalmente extenso moderado em BTX-12 e (Fig. 3. A) Glomerulonefrite focalmente extensa moderada em BTX-35 (Fig. 3. B).

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 terceira aplicação (B). **A:** Infiltrado linfo-histiocitário perivascular focalmente extenso moderado (seta). **B:** Glomerulonefrite focalmente extensa moderada. **Coloração:** Hematoxilina e Eosina.



Fonte: Dados da pesquisa (2020).

Análise Histomorfométrica

Na Tabela 1 é apresentada 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.

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
¹p-valor do teste de Kruskal-Wallis		

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

A comparação da distribuição do perímetro e da área entre os grupos de tratamentos foi significativo ($p < 0,001$), indicando que existe diferença entre os grupos. Ainda, verificou-se que o CN apresenta um perímetro e área significativamente maior ($p < 0,001$) que todos os demais grupos avaliados (Tabela 2).

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
¹p-valor do teste de Mann-Whitney		

Fonte: Dados da pesquisa (2020).

Na Tabela 3 são apresentadas 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 ($p < 0,001$), que todos os demais grupos avaliados (Tabela 4).

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-valor¹	<0,001	
¹p-valor do teste da ANOVA.		

Fonte: Dados da pesquisa (2020).

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

Comparação realizada	p-valor ¹ 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	

Fonte: Dados da pesquisa (2020).

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, também não foi encontrado em nenhuma base de dados informações referentes a hepatotoxicidade e nefrotoxicidade 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 entender o processo de metabolização e excreção da BTX-A. Simpson (2013), hipotetizou que a BTX-A permanece por longos períodos no organismo porque seu título circulante é muito baixo para ser detectado com eficiência e facilidade pelo fígado. No presente estudo as análises histopatológicas do fígado indicam que os grupos tratados com BTX-A sofreram alterações no seu parênquima tecidual, demonstrando também que o grupo BTX-35 apresentou lesões mais severas que o 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.

Al-Saleem *et al.*, (2017), demonstraram que há um acúmulo substancial de complexos anticorpo-antígeno no fígado em animais imunizados, pois a eliminação de imunocomplexos da circulação sanguínea provavelmente utiliza o sistema complemento, no qual os imunocomplexos são opsonizados pelo C3b e se ligam ao Receptor do Complemento 1 (CR1) na superfície das hemácias, a partir do qual são entregues aos macrófagos no fígado e no baço. 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 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) 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 (Grudzinski *et al.*, 2019; Thakkar *et al.*, 2020). A BTX-A ainda não se encontra na lista de drogas capazes de induzir lesão hepática, contudo, os achados histopatológicos e histomorfométricos encontrados neste trabalho pode sugerir que a BTX-A provoca DILI. Já foi observado, no uso de outras drogas, necrose centrolobular com infiltrados lobulares de células inflamatórias, sugerindo hepatite aguda induzida por medicamento após administração de metilprednisolona na pulsoterapia (Kimura *et al.*, 2020) e com malatão incluindo aumento proeminente de sinusóides, infiltração de células mononucleares, dilatação, hemorragia e necrose (Selmi *et al.*, 2018). Necrose hepática também foi descrita no uso de cisplatino, metotrexato e por acetaminofeno (Iorga & Dara, 2019; Zheng *et al.*, 2019; Un *et al.*, 2020; Wolverton & Vuppalachchi, 2020). O tratamento crônico com BTX-A apresentou padrão tecidual semelhante, dado que foi verificado no grupo BTX-12 presenças 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 Kupffer (KCs). De acordo com Shan & 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. Bhajjee 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 linfo-histiocitário 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.

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 Wolverson e Vuppalanchi (2020), que afirma que a associação temporal com o medicamento implicado é um dos principais aspectos para o diagnóstico do DILI. Esses autores ainda afirmaram, que outros aspectos para este diagnóstico melhora com a descontinuação, a exclusão de etiologia competitiva e a reexposição, porém, no atual estudo, não foi possível avaliar se a descontinuação do tratamento com BTX-A ocasionaria melhora, visto que as análises ocorreram 12 e 35 dias após a 3ª aplicação. Entretanto, os animais desta pesquisa não tinham outra etiologia que comprometesse o fígado e não sofreram reexposição. Sendo assim, fica evidente que a BTX-A pode induzir o DILI e pode ser considerada como medicamento hepatotóxico diante das alterações histopatológicas evidentes neste trabalho.

Em relação a morfometria não houve diferença significativa entre BTX-12 e BTX-35, mas nos animais de ambos os grupos que receberam tratamento crônico apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle. Os resultados identificaram que no fígado os núcleos dos hepatócitos de todos os grupos tratados diminuíram em relação ao grupo controle sugerindo a ocorrência de apoptose. Al-Qadhi *et al.*, (2021), em seu trabalho com folhas de *CathaedulisForsk*, observaram características semelhantes as encontradas nesta pesquisa, típicas de apoptose, como encolhimento nuclear ou arredondamento celular. As KCs foram encontradas com intensidade moderada na histopatologia dos grupos tratados com BTX-A, sendo mais um indicativo de apoptose. A morte celular no DILI 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 & Dara, 2019).

Em relação aos rins a análise histopatológica evidenciou que os grupos tratados com BTX-A apresentou sinais sugestivos 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.

Lesões renais semelhantes as observadas nos grupos BTX-A 12 dias, degeneração hidrópica nos néfrons difusa, variando de discreta a moderada, respectivamente, túbulos contorcidos essa lesão foi difusa moderada e aumento na espessura da cápsula de Bowman, foram descritas por Jacoby-Alner *et al.*, (2011), o quais utilizando veneno de escorpião verificaram degeneração no espaço de Bowman, com inchaço glomerular; e El-Hidan *et al.*, (2015), estudando o serpente tigre australiana, apresentaram alterações hidrópicas no tecido renal e espaços expandidos de Bowman contendo um eosinofílico amorfo pálido foi sugestivo de proteinúria. Já o aumento na espessura da cápsula de Bowman foi observado por Eadon *et al.*, (2020), utilizando 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.

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-Newshy *et al.*, 2011; Del Carmen Contini *et al.*, 2017; Schyman *et al.*, 2020).

O tratamento com BTX-A sugere 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, conforme descrito por Wallig *et al.*, (2018).

Não encontramos dados na literatura sobre nefrotoxicidade da BTX-A, 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 pode-se sugerir que a BTX-A pode causar insuficiência renal, como descrito por 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).

A análise histomorfométrica dos rins indicou que todos os grupos apresentaram um leve grau de atrofia dos glomérulos em relação ao grupo controle, o que pode ser um indicativo de morte celular. Existem muitas dúvidas acerca 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.

4. Conclusão

A escassez de informações na literatura é evidente com relação a hepatotoxicidade e nefrotoxicidade da toxina botulínica tipo A (BTX-A) tornando difícil a possível corroboração com nossos achados histopatológicos e histomorfométrico. Desta forma, baseado nas análises realizadas sugere-se que a BTX-A apresenta um possível potencial hepatotóxico que pode levar ao surgimento de DILI e também nefrotóxico sugestivo de glomerulopatias.

A complementação com algumas técnicas como imunohistoquímica e microscopia eletrônica de transmissão (MET) serão realizadas para contribuir com as análises em relação ao potencial hepatotóxico e nefrotóxico da BTX-A.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Daniel Perez por disponibilizar seu laboratório e equipamentos para o escaneamento das lâminas histológicas.

Referências

- Al-Saleem, F. H., Sharma, R., Puligedda, R. D., Elias, M., Kattala, C. D., Simon, P. M., & Dessain, S. K. (2017). RBC adherence of immune complexes containing botulinum toxin improves neutralization and macrophage uptake. *Toxins*, 9(5), 173.
- Al-Qadhi, G., Mohammed, M. M. A., Al-Ak'hali, M., & Al-Moraiissi, E. A. (2021). Khat (*CathaEdulisForsk*) induced apoptosis and cytotoxicity in cultured cells: A scoping review. *Heliyon*, 7(12), e08466.
- Arellano-Saldaña, M. E., Rodríguez-Silverio, J., Morales-Osorio, M. G., & de la Luz Arenas-Sordo, M. (2014). Eficacia clínica de la aplicación de toxina botulínica tipo A en las glándulas submaxilares para el tratamiento de la salivación profusa en pacientes pediátricos con parálisis cerebral. *Investigación en Discapacidad*, 3(3), 101-105.
- Bhaijee, F., & Anders, R. A. (2017). Drug-induced hepatitis: histologic clues to a difficult diagnosis. *Diagnostic Histopathology*, 23(12), 559-562.
- 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. https://allergan-web-cdn-prod.azureedge.net/allerganbrazil/allerganbrazil/media/allergan-brazil/botox_bula_paciente.pdf.
- Couser, W. G., & Johnson, R. J. (2014). The etiology of glomerulonephritis: roles of infection and autoimmunity. *Kidney International*, 86(5), 905-914.
- Cristália. (2006). Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA. Prosigne® - Mitos e Verdades. 12f. http://www.2cristalia.com.br/prosigne/mitos_e_verdades.pdf.
- Del Carmen Contini, M., 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*, 69(7), 547-556.
- Eadon, M. T., Schwantes-An, T. H., Phillips, C. L., Roberts, A. R., Greene, C. V., Hallab, A., & Moorthi, R. N. (2020). Kidney histopathology and prediction of kidney failure: a retrospective cohort study. *American Journal of Kidney Diseases*, 76(3), 350-360.

- 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: *Hottentotagentili* (Pallary, 1924). *Toxicon*, 103, 19-29.
- El-Newehy, M. S., & El-Sayed, Y. S. (2011). Influence of vitamin C supplementation on lead-induced histopathological alterations in male rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63(3), 221-227.
- Iorga, A., & Dara, L. (2019). Cell death in drug-induced liver injury. *Advances in Pharmacology*, 85, 31-74.
- Jacoby-Alner, T. E., Stephens, N., Davern, K. M., Balmer, L., Brown, S. G. A., & Swindells, K. (2011). Histopathological analysis and in situ localisation of Australian tiger snake venom in two clinically envenomed domestic animals. *Toxicon*, 58(4), 304-314.
- Jiang, H., Xiang, Y., Hu, X., & Cai, H. (2014). Acrylamide inhibits nerves sprouting induced by botulinum toxin type A. *Neural Regeneration Research*, 9(16), 1525.
- Jost, W. H. (2016). The option of sonographic guidance in Botulinum toxin injection for drooling in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, 123(1), 51-55.
- Kaartinen, K., Safa, A., Kotha, S., Ratti, G., & Meri, S. (2019, October). Complement dysregulation in glomerulonephritis. In *Seminars in immunology* (Vol. 45, p. 101331). Academic Press.
- Kimura, H., Takeda, A., Kikukawa, T., Hasegawa, I., Mino, T., Uchida-Kobayashi, S., & 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*, 42, 102065.
- Grudzinski, I. P., Ruzycka, M., Cieszanowski, A., Szeszkowski, W., Badurek, I., Malkowska, A., & Bamburowicz-Klimkowska, M. (2019). MRI-based preclinical discovery of DILI: A lesson from paracetamol-induced hepatotoxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 108, 104478.
- Manrique, D. (2005). Application of type A botulinum toxin to reduce saliva in amyotrophic sclerosis lateral. *Rev Bras Otorrinolaringol*, 71(5), 566-9.
- Møller, 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 Odontologica Scandinavica*, 69(3), 151-157.
- Möller Bredo, R., & Vazquez Odo, N. (2011). Anatomía del hígado de la rata Wistar (*Rattus norvegicus*). *International Journal of Morphology*, 29(1), 76-79.
- 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. https://www.cristalia.com.br/arquivos_medicamentos/148/Prosigne_Bula_Profissional.pdf
- Rhéaume, C., Cai, B. B., Wang, J., Fernández-Salas, E., Aoki, K. R., Francis, J., & Broide, R. S. (2015). A highly specific monoclonal antibody for botulinum neurotoxin type A-cleaved SNAP25. *Toxins*, 7(7), 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*, 442, 152530.
- 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. *Toxicology reports*, 5, 189-195.
- Simpson, L. (2013). The life history of a botulinum toxin molecule. *Toxicon*, 68, 40-59.
- 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*, 25(1), 201-208.
- Tolosa, E. M. C. D., Rodrigues, C. J., Behmer, O. A., & Freitas Neto, A. G. D. (2003). Manual de técnicas para histologia: normal e patológica.
- 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*, 880, 173168.
- Wallig, M. A., Bolon, B., Haschek, W. M., & Rousseaux, C. G. *Fundamentals of Toxicologic Pathology*. 3 Ed. United States, Elsevier, 2018.
- Wolverton, S. E & Vuppalachchi, R. Hepatotoxicity of Dermatologic Drug Therapy. *Comprehensive Dermatologic Drug Therapy*, p 677-688, 2020.
- Zheng, N., Gu, Y., Hong, Y., Sheng, L., Chen, L., Zhang, F., & Li, H. (2020). Vancomycin pretreatment attenuates acetaminophen-induced liver injury through 2-hydroxybutyric acid. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 10(6), 560-570.