

Ilana Dantas Neves

PROCESSOS INTERATIVOS
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO • ICS • UFBA



EFEITOS DA TOXINA BOTULÍNICA A EM MASSETERES DE RATOS EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOR INFLAMATÓRIA

Salvador
2019

Ilana Dantas Neves

Efeitos da Toxina Botulínica A em Masseteres de Ratos em Modelo Experimental de Dor Inflamatória

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Cajazeira Aguiar

Coorientadora: Profa. Dr^a. Luciana Lyra Casais e Silva

Salvador
2019

DEDICATÓRIA

Dedico a minha querida avó
Zuleica (*in memoriam*), maior
representação de amor
maternal, de força e de
resiliência.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcio Cajazeira, uma referência de dedicação à vida acadêmica que preza, acima de tudo, a qualidade do trabalho científico, realizado com detalhismo, ética, seriedade e muita organização. Aqui registro meus mais sinceros agradecimentos pela oportunidade, pela confiança e pelos preciosos ensinamentos.

À minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Luciana Lyra Casais e Silva, devido a toda atenção, disposição e motivação dispendidas ao meu auxílio, desde a elaboração do pré-projeto, aos inúmeros artigos compartilhados, à participação na banca de qualificação e à grande contribuição estatística.

À Prof^a. Dr^a. Tânia Rodriguez, pelo apoio diante do modelo experimental do trabalho e pelo direcionamento metodológico com os roedores. Todo o cuidado e preocupação que possui com a rotina e o bem-estar dos animais foram admirados e absorvidos.

À Prof^a. Dr^a. Águida Cristina Henriques Leitão, devido às orientações no tirocínio docente e pela didática impecável dividida.

Ao aluno de iniciação científica Pedro Paulo Pinho, exemplo de garra e determinação, por conta da grande parceria firmada, dos trabalhos pela madrugada, do colo amigo e, principalmente, das lições científicas e de vida prestadas.

Ao médico veterinário Felipe Chaimsohn, em virtude das horas de trabalho direcionadas ao projeto, da motivação e da tranquilidade prestadas, e do carinho no manejo dos animais. Foi um privilégio ter esse olhar especializado participando do trabalho com tamanha humildade.

À técnica em laboratório de Histologia Aline Helenita Santos, em razão da proatividade diária, de todo tempo e cuidado minuciosos dispensados à inclusão das lâminas histológicas, dos ensinamentos laboratoriais, da simpatia contagiante, das palavras de consolo e do abraço caloroso.

Ao colega de profissão Kelvin Borges, pela dedicação dispensada ao projeto piloto e pelo interesse em contribuir.

À mestranda e biomédica Laiane Pena, por motivo do auxílio no processamento das lâminas, do aprendizado relacionado à rotina e equipamentos laboratoriais,

dos momentos de desabafos e das palavras motivadoras.

Às mestrandas e amigas Lorena Ferraz e Ana Paula Teixeira, devido ao companheirismo nessa jornada, pois sem elas seria mais difícil.

Ao amigo e doutorando Osvaldo Schitini, por ter me apresentado e estimulado a ingressar no Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas (PIOS).

Ao Prof. Dr. João Macedo Sobrinho, ao Prof. Dr. Marcio Lisboa, à Prof^a. Dr^a. Ana Paula Martins, à Prof^a. Dr^a. Tatiane Teixeira e à Prof^a. Dr^a. Gisele Graça dos Santos, dadas as suas valiosas sugestões, correções e alterações dispensadas ao trabalho.

Aos secretários do PIOS, Carlos Alberto Santos, Célia Maria da Silva e Tarcísio Mikelly Vivas, em atenção a um atendimento extremamente humanizado a todos os alunos, prezando pela eficiência e respeito.

À João Santos, pela recepção sempre sorridente e prazerosa, no estacionamento do ICS, à manobra e à limpeza do meu veículo. Talvez ele não tenha a dimensão de quanto faz a diferença no mundo, por isso registro minha gratidão.

À equipe da escola Recanto de Viver que acolheu meu bebê com segurança, proporcionando maior tranquilidade às minhas atividades.

Ao meu filho Alexandre de Almeida Couto, gerado e nascido ao longo do curso, por trazer mais amor, alegria e realização para minha vida e isso, diretamente, refletir em tudo que faço.

Aos meus pais, Reinaldo Neves e Sonira Neves, por terem priorizado sempre a saúde e a educação familiar, por incentivarem meu crescimento profissional, respeitarem minhas escolhas e assumirem meu filho nos momentos da minha ausência.

Ao meu marido Rafael de Almeida Couto, por motivo de compartilhamento de mais um projeto, de doação aos meus ansejos, e por corresponder à figura de pai que sempre imaginei que seria. Assim conseguimos concluir outra etapa, ainda extremamente unidos e fortes.

À minha irmã Manuela, graças a sua motivação, seus momentos de descontração e cuidados com Alexandre.

À Deus, por ter permitido a conclusão de mais um ciclo, com vida e saúde.

A dor é a origem do conhecimento.

Simone Weil

RESUMO

A disfunção temporomandibular (DTM) compreende um conjunto de distúrbios envolvendo os músculos mastigatórios, a articulação temporomandibular e estruturas associadas. Um dos sintomas mais frequentes relatados pelos pacientes são as dores nos músculos mastigatórios. Dentre as terapias propostas, destaca-se a toxina botulínica (TNBo/A). Embora existam algumas evidências sobre o seu efeito antinociceptivo, pouco se conhece sobre sua ação e os seus efeitos indesejáveis quando aplicada em um músculo da mastigação. O presente estudo avaliou os efeitos da toxina botulínica sobre a nocicepção, o reparo e o processo inflamatório no músculo masseter de ratos em um modelo experimental de dor inflamatória. Carragenina, uma droga inflamatória, foi injetada no músculo de masseter de ratos tratados com TNBo/A ou com o anti-inflamatório não esteroide ibuprofeno. Masseteres infiltrados com soro fisiológico foram usados como controle. A mensuração do limiar nociceptivo foi executada com um analgesímetro digital Von Frey antes e após da carragenina 5 horas, 1, 3 e 7 dias de sua administração. Decorridos 8 dias da administração da carragenina, os animais foram eutanasiados, sendo seus masseteres encaminhados para processamento e análise histológica. Em comparação com o grupo tratado apenas com carragenina, os espécimes tratados com carragenina e TNBo/A mostraram um aumento nos percentuais de variação do limiar nociceptivo em relação ao basal nos períodos de 1 (um) dia ($p < 0,001$), 3 (três) dias ($p < 0,001$) e 7 (sete) dias ($p < 0,05$). O efeito da TNBo/A sobre a nocicepção foi similar ao observado no grupo tratado com carragenina e ibuprofeno, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$). A avaliação histológica mostrou áreas focais de destruição tecidual e um infiltrado inflamatório crônico com alguns linfócitos, muitos macrófagos e raros mastócitos no local da infiltração da carragenina em todos os grupos experimentais, sendo discretamente mais extensas no grupo tratado com TNBo/A. Estes achados revelaram que a TNBo/A possui um efeito antinociceptivo em condições dolorosas no músculo masseter, mas pode se constituir em um elemento adicional de dano tecidual se um ambiente inflamatório está instalado no tecido muscular, não se constituindo, portanto, na primeira opção para o tratamento de dores miofasciais.

Palavras-chave: Dor miofascial. Toxina botulínica A. Nocicepção.

ABSTRACT

Temporomandibular dysfunction (TMD) comprises a set of disorders involving the masticatory muscles, the temporomandibular joint and associated structures. One of the most frequent symptoms reported by patients is pain in the chewing muscles. Among the proposed therapies, the botulinum toxin (TNBo/A) is highlighted. Although there is some evidence about its antinociceptive effect, little is known about its action and its undesirable effects when applied to a chewing muscle. This study evaluated the effects of botulinum toxin on nociception, repair and inflammatory process in rat masseter muscle in an experimental model of inflammatory pain. Carrageenan, an inflammatory drug, was injected into the masseter muscle of rats treated with TNBo/A, or by the non-steroidal anti-inflammatory drug ibuprofen. Masseter infiltrates with saline were used as controls. The nociceptive threshold measurement was performed with a Von Frey digital analgesometer before and after carrageenan, in a period equivalent to 5 (five) hours, and 1 (one), 3 (three) and 7 (seven) days from its administration. Eight days after carrageenan administration, the animals were euthanized, and their masseters were sent for processing and histological analysis. Compared to the group treated only with carrageenan, the specimens treated with carrageenan and TNBo/A showed an increase in the percentile variation of the nociceptive threshold from baseline over the periods of 1 (one) day ($p < 0.001$), 3 (three) days ($p < 0.001$) and 7 (seven) days ($p < 0.05$). The effect of TNBo/A on nociception was similar to that observed in the group treated with carrageenan and ibuprofen, with no statistically significant difference between the groups ($p > 0.05$). Histological evaluation showed focal areas of tissue destruction and a chronic inflammatory infiltrate with some lymphocytes, many macrophages and rare mast cells at the carrageenan infiltration site in all experimental groups, being slightly more extensive in the TNBo/A treated group. These findings revealed that TNBo/A has an antinociceptive effect in the masseter muscle on painful conditions, but it may constitute an additional element of tissue damage if an inflammatory environment is present in the muscle tissue, thus not constituting the first option for the treatment of myofascial pain.

Keywords: Myofascial Pain. Botulinum Toxin A. Nociception.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Linha experimental22
- Figura 2** Fotomicrografias mostrando secções transversais das fibras musculares do músculo masseter direito de ratos infiltrado com soro fisiológico (A, C e E) ou com carragenina (B, D e F), 8 dias após a intervenção 28
- Figura 3** Fotomicrografias mostrando áreas de perimísio do músculo masseter direito de ratos infiltrado com soro fisiológico (A, C e E) ou com carragenina (B, D e F), 8 dias após a intervenção29
- Figura 4** Efeito de diferentes drogas administradas no masseter sobre o percentual de variação do limiar de resposta nociceptiva mecânica em relação ao valor basal mensurado com analgesímetro digital de Von Frey.....30
- Figura 5** Efeito do soro fisiológico (GI) e da carragenina (GII) administrados no masseter sobre o percentual de variação do limiar de resposta nociceptiva mecânica em relação ao valor basal mensurado com analgesímetro digital de Von Frey31
- Figura 6** Efeito da administração da carragenina (GII) e da carragenina e ibuprofeno (GIV) sobre o percentual de variação do limiar de resposta nociceptiva mecânica em relação ao valor basal mensurado com analgesímetro digital de Von Frey.....32
- Figura 7** Efeito da administração da carragenina (GII) e da carragenina e toxina botulínica (GVI) sobre o percentual de variação do limiar de resposta nociceptiva mecânica em relação ao valor basal mensurado com analgesímetro digital de Von Frey33
- Figura 8** Efeito da administração da carragenina e ibuprofeno (GIV) e da carragenina e toxina botulínica (GVI) sobre o percentual de variação do limiar de resposta nociceptiva mecânica em relação ao valor basal mensurado com analgesímetro digital de Von Frey33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Distribuição dos animais no tempo experimental de acordo com os grupos	22
----------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AINE	Anti-inflamatório não Esteroide
AINEs	Anti-inflamatórias não Esteroides
ATM	Articulação Temporomandibular
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
CID	Classificação Internacional de Doenças
COX	Ciclooxigenase
DM	Dor Miofascial
DMs	Dores Miofasciais
DTM	Disfunção Temporomandibular ICS Instituto de Ciências da Saúde
PGs	Pontos de Gatilhos
SNAP 25	Synaptosomal-associated Protein 25
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive
SNC	Sistema Nervoso Central
TNBo	Toxina Botulínica
TNBo/A	Toxina Botulínica A
TNBos	Toxina Botulínicas
UFBA	Universidade Federal da Bahia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 ANIMAIS.....	22
4.2 INDUÇÃO DA DOR INFLAMATÓRIA.....	23
4.3 APLICAÇÃO DO IBUPROFENO	23
4.4 APLICAÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA A.....	23
4.5 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA NOCICEPTIVA.....	24
4.6 PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA DE LUZ.....	25
4.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	25
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
5 RESULTADOS.....	26
5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA	26
5.2 AVALIAÇÃO DO LIMAR DE RESPOSTA NOCICEPTIVA.....	30
6 DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS.....	40
ANEXO 1- CERTIFICADO	48

1 INTRODUÇÃO

A dor, segundo a Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP), é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial.¹ Quando crônica, acredita-se que é modulada por fatores psicológicos (que incluem aspectos emocionais, cognitivos e comportamentais), sendo, muitas vezes, a percepção da doença pelo paciente maior do que a própria injúria.²

Algumas dores associadas a condições musculoesqueléticas são consideradas causas de incapacidade na população em geral.³ A disfunção temporomandibular (DTM) é um tipo de condição musculoesquelética que envolve alterações nos músculos mastigatórios, na articulação temporomandibular (ATM) e nas estruturas associadas. A DTM, caracterizada por dor na ATM, na região periauricular ou nos músculos mastigatórios, por ruídos articulares, por desvios ou por restrições na movimentação mandibular, é a maior causa de dor facial de origem não odontogênica.⁴ A dor miofascial (DM), especialmente sobre os músculos mastigatórios, é o principal sintoma apresentado pelos pacientes portadores de DTM, comprometendo especialmente a mastigação.⁵

Em geral, a DM é tratada por meio de terapias conservadoras como placas oclusais⁶, farmacoterapia⁷, fisioterapia⁸ e laserterapia.⁹ Ensaios clínicos vêm demonstrando bons resultados utilizando a toxina botulínica A (TNBo/A) no tratamento de dores miofasciais, no entanto, ainda é uma opção controversa.^{10, 11}

Alguns trabalhos têm sugerido um efeito antinociceptivo da TNBo/A em alguns modelos de dor experimental, independente do seu efeito já conhecido no relaxamento muscular.^{12,13,14,15} Tais estudos têm sido realizados pela infiltração da toxina na pata traseira de ratos e camundongos, um modelo empregado para a avaliação da eficácia de drogas analgésicas e anti-inflamatórias. É possível que a TNBo/A possa ser uma opção no tratamento da DM, especialmente se o efeito antinociceptivo da toxina for mais duradouro, confortável e satisfatório para o paciente, em relação às outras terapias.

Com o propósito de avaliar o efeito antinociceptivo de algumas drogas, vários modelos *in vivo* têm sido utilizados. Muitos desses experimentos empregam estímulos dolorosos em animais que apresentam reações comportamentais proporcionais a sua percepção da nocicepção. Alguns desses

modelos animais utilizam diferentes irritantes que são injetados na pele, pata, músculo, articulação e vísceras. Esses irritantes incluem aqueles que produzem dor inflamatória aguda associada ao recrutamento de neutrófilos, bem como respostas de dor mais sustentadas associadas a uma infiltração de macrófagos, sendo empregados para simular condições inflamatórias aguda e crônica.¹⁶

A carragenina é um irritante inflamatório bastante utilizado para gerar uma inflamação aguda inicial que se converte em uma inflamação crônica após algumas semanas. Dessa forma, a carragenina aumenta a sensibilidade aos estímulos térmicos e mecânicos no local da infiltração, sendo útil na compreensão da dor inflamatória aguda, com potencial para simular condições associadas a lesões teciduais, como entorses, distensões e miosites. Em adição, o modelo de inflamação induzido pela aplicação de carragenina em patas de ratos vêm sendo largamente utilizado para testar efeitos e mecanismos anti-inflamatórios de muitas drogas.^{17,18,19,20,21,22} A nocicepção gerada pela carragenina pode ser medida pelo teste de Von Frey, permitindo a avaliação do aumento da sensibilidade aos estímulos inócuos (alodinia) ou nocivos (hiperalgesia). O teste é realizado por meio de um anesthesiômetro eletrônico, que consiste em um transdutor de pressão adaptado a um contador digital de força expressa em gramas.^{23,24} A associação dos dois métodos de investigação experimental pode ser útil na caracterização farmacológica da TNBo/A com relação a sua capacidade de interferir com o curso da dor.

Portanto, a fim de aprofundar os conhecimentos sobre sua ação antinociceptiva e sua influência sobre as alterações teciduais no tecido muscular, o presente estudo investigou os efeitos da TNBo/A sobre o músculo masseter de ratos em um modelo experimental de dor inflamatória provocado pela carragenina.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito da TNBo/A sobre a nocicepção e o processo inflamatório no músculo masseter de ratos em um modelo experimental de dor inflamatória.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito antinociceptivo da TNBo/A por meio do teste de avaliação do limiar nociceptivo (teste de Von Frey) em masseteres de ratos infiltrados com carragenina;
- Analisar histologicamente as alterações estruturais em masseteres de ratos infiltrados com carragenina e tratados com TNBo/A.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

A dor é uma experiência somática reconhecível que reflete a apreensão da pessoa sobre uma ameaça da integridade física e existencial. Trata-se de um fenômeno subjetivo que reflete uma sensação desagradável com o corpo. Pode ser originada de um dano tecidual real ou potencial, geralmente acompanhada por ansiedade, medo, aflição ou depressão.¹

Cefaleia e dor orofacial são os distúrbios dolorosos mais prevalentes, tendo sido caracterizados recentemente como entidades distintas na Classificação Internacional de Doenças (CID). Dentre as desordens incapacitantes mais frequentes, destacam-se a dorsalgia, a depressão e a cefaleia. A dor orofacial afeta aproximadamente um quarto da população, com possível impacto na qualidade de vida, muitas vezes, com comprometimento da atividade laboral.²⁵ Em geral, as dores orofaciais são localizadas e possuem etiologia odontogênica, muscular, intracapsular, neuropática, por enxaqueca, entre outras.²⁶ Acometem mais mulheres, estando frequentemente associada a um distúrbio na articulação temporomandibular e músculos mastigatórios.²⁷

DTM é um termo usado para definir um subgrupo de desordens orofaciais dolorosas na região da ATM e músculos mastigatórios, estando presente entre 40 e 70% dos indivíduos nas populações estudadas.^{28,29,30} A etiologia é multifatorial, incluindo trauma; doença sistêmica imune; lesão neoplásica; mudanças posturais; disfunção da musculatura mastigatória e estruturas adjacentes; mudanças estruturais da ATM e hábitos parafuncionais dentários.^{31,32}

A DTM compreende patologias da ATM que se relacionam com a musculatura craniana, cervical e facial. A síndrome da DM é a forma mais comum de DTM.³¹ Uma das queixas mais comuns relacionadas à DTM é uma sensação dolorosa nos músculos mastigatórios.³³

A DM é caracterizada por dor aguda ou crônica decorrente da presença de pontos de gatilhos (PGs) extremamente sensíveis à palpação, conhecidos como *trigger points*.³⁴ Em geral, está associada a outros achados clínicos, como: diminuição da abertura bucal máxima, estalido articular e aumento do tônus muscular mastigatório e cervical. Devem ser diferenciados, clinicamente, de dores de etiologia dentária, cervicalgia, migrâneas, cefaleia tensional, problemas vasculares intra e extracranianos e desordens otorrinolaringológicos e oculares.³⁵

Muitas vezes, essa síndrome é causada por uma hiperatividade muscular. A hiperatividade muscular, gerada por sobrecarga oclusal ou parafunção, causa dor pelo aumento da liberação de acetilcolina, gerando o aumento da contração da musculatura local, a compressão de pequenos vasos sanguíneos, a diminuição do fluxo sanguíneo e a isquemia com liberação de bradicinina e a sensibilização ou excitação de nociceptores. A dor muscular relacionada à contração muscular também ocorre pela diminuição do pH. Na síndrome miofascial, a dor está associada à despolarização anormal da placa motora por excessiva liberação de acetilcolina, a defeitos da enzima acetilcolinesterase e/ou aumento da atividade do receptor nicotínico da acetilcolina, conduzindo a um potencial de ação duradouro com contração muscular e encurtamento dos sarcômeros dentro das miofibrilas. Isso ocasiona trocas no metabolismo oxidativo, com diminuição de substratos energéticos e indução da secreção de substâncias algógenas, a exemplo da bradicinina, da histamina e da substância P.³⁶

A presença de banda muscular palpável representa o espasmo segmentar de uma pequena porção do músculo, originando o ponto de gatilho (PG), que é um foco de irritabilidade no músculo quando é submetido à pressão e/ou a um estiramento manifestado por dor local e referida. No caso específico da síndrome miofascial de origem na DTM, os músculos mastigatórios (temporal, masseter e pterigoideos medial e lateral) e os músculos do ventre anterior do digástrico e o milo-hióideo são derivados do primeiro arco branquial e inervados pelo ramo inferior do trigêmeo, podendo apresentar pontos de gatilho na face e irradiação para coluna cervical pela anastomose com ramos nervosos do plexo cervical.³⁷

O tratamento para dores miofasciais, geralmente, é multidisciplinar e conservador, consistindo em manejo farmacológico, no uso de órteses, principalmente a placa oclusal,³⁸ no tratamento fisioterápico, na laserterapia³⁹ e na ozonioterapia.⁴⁰ Nos casos em que há um distúrbio emocional, a equipe multidisciplinar também pode ser composta adicionalmente por um psicólogo ou psiquiatra.⁴¹

A farmacoterapia é uma das opções terapêuticas nos pacientes com DM, auxiliando no manejo da disfunção e do desconforto causados pela desordem crônica.^{7,42} O tratamento da DM, que geralmente afeta todos os músculos mastigatórios e não um especificamente,⁴³ deve ser a primeira opção antes de técnicas mais invasivas.^{11,44} As DMs podem ser tratadas por meio de drogas anti-

inflamatórias não esteroides (AINEs), relaxantes musculares, analgésicos opioides, antidepressivos, antiepilépticos e injeções anestésicas.⁴⁵ Embora haja muitas opções, não existe um consenso sobre o tratamento de escolha, visto que o mecanismo da dor miofascial ainda é desconhecido. Independente disso, alguns estudos experimentais sugerem que a inflamação pode desempenhar importante participação nesses distúrbios.^{46,47}

As drogas não esteroidais estão entre as medicações mais frequentemente prescritas para DM no mundo, entretanto, a administração desses fármacos por período prolongado está associada a uma variedade de efeitos adversos, como a ulceração gástrica, os sangramentos gastrointestinais⁴⁸ e os riscos cardiovasculares pelo uso de AINES COX-2 seletivos.^{49,50} Isso pode limitar o uso em pacientes com dores crônicas e oferecer importantes benefícios em pacientes portadores de dores agudas.⁵¹

Dentre os AINEs, apesar da droga ibuprofeno ser um dos agentes terapêuticos largamente usados nas DMs, a literatura sugere que as dores crônicas relacionadas às DTMs possuem envolvimento das células gliais centrais e periféricas,^{52,53} o que justifica as propriedades analgésicas do ibuprofeno não apresentarem resultados clínicos tão favoráveis quando comparados a outras drogas,⁵⁴ a exemplo das que agem no sistema nervoso central (SNC).^{55,56}

Nas últimas duas décadas, o uso clínico e o interesse em pesquisas sobre a toxina botulínica (TN/Bo) aumentaram exponencialmente. A TN/Bo é produzida pela bactéria gram-positiva e anaeróbia *Clostridium botulinum*, uma das toxinas biológicas mais potentes da natureza e a primeira toxina a ser usada na história da Medicina. TN/Bos entram nas terminações nervosas, clivando e inativando proteínas *soluble N-ethylmaleimide-sensitive* (SNARE), essenciais para liberação de neurotransmissores. Pode-se afirmar que consiste em uma proteína complexa, composta por uma parte neurotóxica e por proteínas auxiliares.⁵⁷ A molécula da toxina pesa 150 kDa e é composta de uma cadeia pesada (100 kD), que media a internalização da toxina na célula, e de uma cadeia leve (50 kDa), que, por sua vez, cliva o complexo SNARE. Existem oito sorotipos de TN/Bo (A, B, C1, C2, D, E, F e G), cada tipo cliva diferentes proteínas dentro da SNARE.⁵⁸

A TNBo/A, por exemplo, cliva as proteínas SNAP 25 (*synaptosomal-associated protein 25*) dentro da SNARE, impedindo a liberação de neurotransmissores pelas terminações nervosas pré-sinápticas. Apenas os tipos

A e B são utilizados na Medicina, mas, na Odontologia, apenas a toxina botulínica do tipo A (TNBo/A) é empregada. Existem mais de 20 fabricantes que comercializam a TNBo/A, todas possuem o mesmo princípio ativo, porém as proteínas auxiliares variam por marca, assim a potência por unidade de toxina de cada fabricante é específica.⁵⁹

A TN/Bo é conhecida pelo fato de causar botulismo, doença neuromuscular de baixa frequência, mas fatal em 5 a 10% dos indivíduos portadores. Para fins terapêuticos, a TNBo/A é usada em pequenas doses em intervalos grandes de tempo.⁶⁰ O efeito da TNBo/A sobre o músculo é provisório, pois a desnervação química gerada pela droga estimula brotamentos axonais laterais, pelos quais o tônus muscular é parcialmente restaurado até o restabelecimento das proteínas de fusão, com a recuperação da junção neuromuscular.⁶¹ Seu efeito é estável, variando de 3 a 6 meses para distúrbios musculares e até 18 meses para distúrbios do sistema nervoso autônomo.^{62,63}

Além de inibir a exocitose da acetilcolina nas junções neuromusculares e autônomas, gerando relaxamento muscular e inatividade glandular, acredita-se que a TNBo/A possa agir nos neurônios sensoriais impedindo a liberação de neurotransmissores relacionados à dor e a pró-inflamatórios, nomeadamente o glutamato, a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). No tratamento das dores orofaciais, acredita-se que a TNBo/A possa gerar uma inibição direta sobre o sistema nervoso central (SNC), por transporte axonal retrógrado, nos neurônios sensoriais e motores, permitindo que dores faciais possam ser aliviadas pela combinação dos efeitos antinociceptivos da TNBo/A sobre os SNC e periférico.⁵⁷ O mecanismo de ação atual sugere que, nos motoneurônios, além do mecanismo clássico dominante na junção neuromuscular, parte da toxina é transportada para o cérebro até os neurônios superiores, entretanto, nos neurônios sensoriais, após o transporte retrógrado, ocorre um bloqueio da ação.⁵⁹

A TNBo/A é uma droga segura, sendo utilizada há mais de 30 anos para o tratamento de muitas condições neurológicas, como a espasticidade de membros e de patologias relacionadas à hiperatividade muscular, a exemplo das distonias focais, o estrabismo e o blefaroespasma.⁶⁴ Distúrbios do trato urinário inferior, como a hiperatividade detrusora e a prostatite,⁶⁵ e do sistema gastrointestinal, como acalasia esofágica⁶⁶ que envolvem o sistema nervoso autônomo com

hiperatividade da musculatura lisa, também possuem a terapia com TNBo/A como opção. Além disso, patologias menos comuns, particularmente o vaginismo e a neuropatia diabética, utilizam a TNBo/a como opção terapêutica.^{67,68}

Não menos importante, o efeito anticolinérgico da TNBo/A tem sido empregado no tratamento de distúrbios de glândulas exócrinas, a exemplo das hiperidroses e da sialorreia. Atualmente, o tratamento de distúrbios dolorosos com TNBo/A vêm se ampliando, havendo relatos do seu efeito benéfico sobre neuropatias trigeminais, dores lombares, cefaleias tensionais e enxaquecas, levantando a possibilidade de que seu modo de ação antinociceptivo pode nem sempre estar relacionado ao seu efeito sobre o relaxamento muscular.⁶⁹

Na Odontologia, a injeção intramuscular de TNBo/A vem sendo amplamente utilizada por indicação cosmética, no intuito de amenizar as rugas faciais, corrigir assimetrias e amenizar desarmonias faciais. Ademais, tem sido utilizada nas DTMs, na paralisia facial, na neuralgia trigeminal, na dor neuropática trigeminal traumática, nos distúrbios de glândulas salivares, e como tratamento complementar após cirurgias oral e bucomaxilofacial.^{11,59,70,71}

A aplicação de TNBo/A pode gerar efeitos colaterais sistêmicos, locais e a redução do efeito terapêutico pela formação de anticorpos. O desenvolvimento de complicações sistêmicas, geralmente, ocorre por overdose na injeção de TNBo/A e inclui náusea, fadiga, febre, aumento da pressão arterial, diarreia, dor abdominal e reações alérgicas. As complicações locais podem variar a partir do lado de injeção e cursam com cefaleia, dor, edema, equimose, hematoma, assimetria⁷² e ptose.⁷³ O efeito adverso mais comum é a cefaleia, que se desenvolve dentro das primeiras 24 horas da injeção, mas tende a reduzir conforme o aumento da frequência das injeções.⁷⁴

A TNBo aparece como um antígeno para o sistema imune, produzindo anticorpos neutralizantes que induzem reações imunes no corpo, podendo inibir o efeito terapêutico dessa droga. Preconiza-se o uso de doses mais baixas possíveis com intervalos de aplicação prolongados⁷⁵, no intuito de prevenir essa produção de anticorpos durante o tratamento com TNBo/A que, apesar de acometer 40-60% dos pacientes, inibe entre 2-5% de efeitos terapêuticos.⁷⁶

A depender da técnica de aplicação empregada, da dosagem (quantidade e frequência) e da diluição, pode haver migração da toxina para estruturas vizinhas ao ponto de injeção. No caso da distonia cervical, por exemplo, o

principal efeito adverso é a disfagia (22%), seguido da debilidade da musculatura platisma, da disfonia e da xerostomia,⁷⁷ e do blefaroespasma, da paralisia facial (9%), da epífora (2,5%), da diplopia (2,1) e da visão turva (0,2%).⁷⁸ Nas injeções aplicadas no músculo masseter, a diminuição na força muscular é o efeito colateral mais frequente, além da limitação do sorriso e xerostomia.⁷²

O emprego da TNBo/A, em alguns casos de DMs, pode estar indicado, principalmente quando se pretende uma ação mais localizada, visto que muitas modalidades terapêuticas acabam agindo em toda a musculatura ou tendo uma ação sistêmica.⁴³ A principal vantagem da administração da TNBo/A em relação às outras drogas é a necessidade de aplicação única por possuir durabilidade prolongada. Dessa forma, a colaboração do paciente, no sentido de tomar a medicação de horário é dispensável. O fato do não desenvolvimento de tolerância nem de sobreutilização também pode ser um diferencial para pacientes portadores de dores crônicas refratárias.⁶⁹

Acredita-se que a TNBo/A tem efeito antinociceptivo, reduzindo o dano tecidual, o processo inflamatório e o edema provocados pela infiltração de carragenina no músculo masseter de ratos em um modelo de dor inflamatória. Com o objetivo de avaliar a dor e o efeito de drogas sobre essa sensação, muitos testes de avaliação do limiar de nocicepção foram desenvolvidos, diversos deles em modelos animais, através de testes comportamentais. Estes incluem o teste da caneta quente, o teste da medida da aplicação de pressão (PAM), o modelo de dor por carragenina e o teste de Von Frey. O teste da caneta quente é baseado na hipersensibilidade ao calor. É um dispositivo com formato semelhante a uma caneta, com extremidade circular medindo 5 mm de diâmetro, mantido em torno de 45° C e é aplicado sobre a pele do músculo observado. Outro teste utilizado é o PAM, baseado na hiperalgesia mecânica, utiliza um dispositivo eletrônico que mensura a aplicação da pressão aplicada através de uma força constante de 50g/segundo transferida a um sensor circunferencial de 8 mm acoplado ao polegar do examinador. O limite de retirada do membro do animal ou vocalização, a partir da aplicação do calor, registra o pico da força. Esse limiar de nocicepção é originado pela média de três medidas consecutivas.^{79,80}

O teste de Von Frey é um método de avaliação nociceptivo muito utilizado na análise de estímulos sensoriais que, em situações normais, não provocam dor (alodinia mecânica), mensurando o limiar de dor diante de uma pressão

estabelecida sobre a superfície investigada. A técnica original preconiza a utilização de filamentos de Von Frey de diferentes rigidezes sobre a área de investigação. Uma força suficiente para dobrar esse filamento é aplicada e o limiar de dor é definido pelo último filamento que gerou resposta. Atualmente é utilizado um estesiômetro eletrônico, que comporta uma série de filamentos de Von Frey calibrados (10g, 15g, 26 g e 60 g), inicialmente usado em humanos e posteriormente em ratos. Consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g), onde é acoplada uma ponteira descartável de propileno adaptada à superfície de contato do transdutor. O limiar de dor estabelecido pelo teste de Von Frey é a mínima força capaz de gerar a remoção da cabeça, do membro ou da vocalização. São realizadas 5 aplicações do teste na mesma superfície e uma média é calculada.^{81,82,83,84}

No modelo experimental, a nocicepção pode ser investigada através de testes comportamentais no animal. O teste de Von Frey é uma opção vantajosa, simples, objetiva e confiável para avaliar o limite nociceptivo mecânico e alodinia em ratos. Originalmente utilizado na superfície lateral das patas traseiras dos ratos, foi testado na região orofacial dos animais e proposto como método para futuros estudos de nocicepção orofacial. Esse recurso foi mencionado como um facilitador a ser utilizado em futuros modelos experimentais para investigar os mecanismos das dores orofaciais, como as dores crônicas associadas à DTM.²⁴ A partir disso, o teste de Von Frey vem sendo utilizado como método de avaliação do limite de nocicepção mecânica na região orofacial, com sucesso.^{85,86} Tanto no presente estudo, como em outros trabalhos^{53,89}, o músculo masseter foi estimulado gerando um modelo de dor orofacial a ser avaliado como confiável pelo teste de Von Frey.

Dentre os modelos experimentais para mimetizar a dor inflamatória, a injeção de carragenina é um dos mais utilizados. A carragenina lambda (tipo IV) é um polissacarídeo extraído a partir de plantas marinhas, que induz inflamações agudas e crônicas, e hiperalgesias quando injetada no músculo esquelético, nas articulações e na via subcutânea. A dor induzida pela carragenina é dose-dependente. Sua intensidade e durabilidade dependem da profundidade de ação da droga sobre o tecido, por permitir uma maior ativação de mecanismos neurais espinhais e supraespinhais. O modelo está indicado para avaliar a inflamação aguda nas primeiras 24 horas e a inflamação crônica após 1 (uma) semana

quando a carragenina é aplicada nos percentuais de 1% e 3% na musculatura gastrocnêmica.^{88,99}

Os efeitos da TNBo/A em modelo experimental de dor inflamatória vêm sendo investigados em patas traseiras de ratos. O efeito antinociceptivo da TNBo/A, independente do relaxamento da musculatura, sugerindo um mecanismo de ação anti-inflamatória independente e a inibição da liberação de neurotransmissores da dor como glutamato, substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) dos terminais aferentes primários, são achados produzidos por tais estudos.^{12,14,15} Favre-Guilhard e colaboradores¹⁴ ao induzirem um modelo de dor inflamatória na pata traseira dos ratos e aplicarem a TNBo/A unilateral, constataram efeito antinociceptivo bilateral justificado pela ativação de neurônios sensoriais periféricos e pelo transporte axonal retrógrado dessa droga pela coluna espinhal.

Na DM, injeções de TNBo/A diretamente nos *trigger points*⁹⁰ ou na musculatura mastigatória têm demonstrado efeitos satisfatórios.^{10,91} Apesar disso, o uso terapêutico da TNBo/A nos pacientes portadores de DTM, como DM, ainda é controverso.^{59,92} A falta de estudos em humanos com longo período de acompanhamento, com padronização de dosagem e com protocolo de injeção quanto à localização, o número e o intervalo de aplicação dificultam a comparação dos resultados. Faz-se necessária, portanto, a realização de estudos clínicos randomizados, controlados, duplos cegos com metodologias bem detalhadas para a tomada de decisões.^{45,93,94} Estudos experimentais são necessários, a fim de elucidar os efeitos da TNBo/A e investigar os mecanismos que os permeiam e servem de embasamento para ensaios clínicos futuros.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

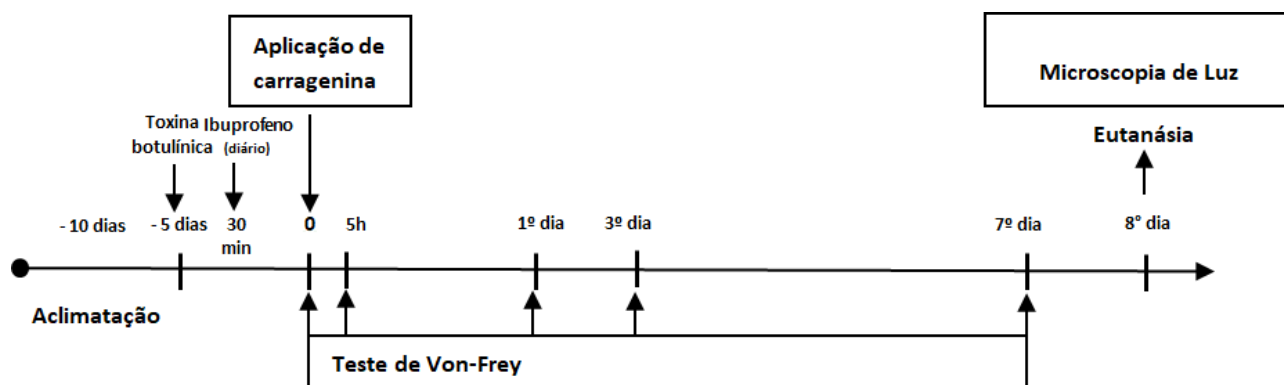
Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso dos Animais (CEUA) do Instituto de Ciências da Saúde (ICS)/ Universidade Federal da Bahia (UFBA) sob o protocolo nº 133/2018 (Anexo 1). Trinta ratos *Ratus norvegicus*, *Albinus*, *Wistar*, machos, de dois a três meses de idade, com massa corpórea entre 170 a 240 gramas, foram mantidos no biotério de experimentação do laboratório de neuro-imunoendocrinologia e toxicologia, do ICS/UFBA. Os ratos foram nutridos com ração sólida peletizada (Nuvilab CR- 1, 20 Kg- Nuvital Agropecuária Ltda.) e hidratados *ad libitum*.

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos e seis subgrupos, de acordo com a tabela 1, e submetidos aos procedimentos experimentais, conforme a figura 1.

Tabela 1 - Distribuição dos animais no tempo experimental de acordo com os grupos.

Período	Controle		Ibuprofeno		Toxina botulínica	
	Soro fisiológico (GI)	Carragenina (GII)	Soro fisiológico (GIII)	Carragenina (GIV)	Soro fisiológico (GV)	Carragenina (GVI)
8 dias	n= 5	n= 5	n= 5	n= 5	n= 5	n= 5

Figura 1 – Linha experimental



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

Após a aclimatação, a região orofacial correspondente aos masseteres direitos foi tricotomizada, mediante anestesia com uma associação de solução de cloridrato de cetamina a 10% (Cetamin®, Syntec), na dose de 100mg/ Kg) e solução de 2% de cloridrato de xilazina (Sedanew®, Vetnil) a 14mg/ Kg, via intraperitoneal.

4.2 INDUÇÃO DA DOR INFLAMATÓRIA

O modelo de dor inflamatória foi estabelecido pela injeção de solução a 2% de carragenina lambda (type IV, Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) no músculo masseter direito dos animais. Em todos os grupos, metade dos animais (experimental) receberam no masseter direito 100 µL de uma solução de 2% de carragenina (diluído em soro fisiológico), enquanto a outra metade foi tratada com 100 µL de solução salina. As injeções de ambas substâncias foram realizadas com seringas de insulina de 1 ml acopladas a agulhas 30 G em animais anestesiados com solução de 2% de isoflurano (Isoforine®, Cristalia).

O local de infiltração das drogas utilizadas no masseter direito de todos os animais foi o ponto resultante do cruzamento entre duas linhas imaginárias, sendo elas: uma horizontal de 1,5 cm em continuidade à comissura labial para posterior e a outra vertical formada no limite superior pelo ponto central da linha imaginária traçada entre a órbita e o trágus (região de músculo temporal), estendendo-se até 1 cm inferior.

4.3 APLICAÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA A

Cinco dias antes da infiltração de soro fisiológico ou carragenina^{13,95}, os masseteres direitos dos animais do grupo toxina botulínica foram infiltrados com neurotoxina *Clostridium botulinum* tipo A purificada (TNBo/A), via intramuscular, no mesmo ponto de aplicação da carragenina, em única dose de 3,5 U/ kg (Prosigne®, Cristalia),¹² utilizando seringas de insulina Ultra-fine™, 0,5 ml e agulhas 8 mm x 0,3 mm (30G).

4.4 APLICAÇÃO DO IBUPROFENO

Trinta minutos antes da aplicação de carragenina ou soro, todos os animais dos grupos GIII e GIV receberam ibuprofeno¹⁵ (Genérico®), por via oral, na dose de 14 mg/ Kg, por meio de uma seringa para insulina de 1 ml BD® sem agulha. Nas primeiras 24 horas, essa droga foi administrada de 6 em 6 horas, em seguida, em intervalos de 12 em 12 horas até completar 7 dias.⁹⁶

4.5 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA NOCICEPTIVA

A avaliação da resposta nociceptiva no músculo masseter de ratos foi adaptada a partir do método para avaliação da alodinia mecânica proposto por Ren (1999).²⁴ Os ratos foram habituados a se manterem eretos sobre as patas traseiras sobre uma superfície revestida por tecido de algodão, sempre encostados à mão do avaliador protegida por uma luva de couro comum. A habituação foi potencializada pela manipulação diária e carícias executadas sob o seu dorso com os dedos por um mesmo operador.

A mensuração do limiar de retirada da cabeça foi executada com analgesímetro digital de Von Frey (modelo EFF 301, Insight) antes da infiltração de carragenina (basal), 5 horas, 1, 3 e 7 dias após a aplicação deste agente inflamatório. Baseado no fato de que sondas nociceptivas com o diâmetro maior ou igual a 1,6 mm refletem o limite de nocicepção mecânica em tecidos mais profundos, como os músculos,⁹⁷ a ponta metálica rígida do analgesímetro foi revestida por uma capa arredondada (diâmetro de 3 mm), confeccionada previamente com resina acrílica autopolimerizável DuraLay (Reliance Dental MFG. CO.) com objetivo de promover uma pressão muscular efetiva, evitando um estímulo cutâneo.

A ponta foi pressionada gradualmente contra a superfície cutânea da área correspondente ao músculo masseter, perpendicularmente ao plano sagital até o animal ter o reflexo de retirada da cabeça ou emitir um sinal fonético, havendo o registro automático em gramas da maior força aplicada. O limiar de retirada da cabeça de cada animal foi calculado como uma média de cinco medidas realizadas, com um intervalo entre as mensurações de 1 minuto. Para todos os protocolos, o examinador desconheceu o tratamento empregado em cada animal.

As médias de cada grupo e de cada período foram convertidas em percentuais calculados a partir das médias obtidas nos testes de nocicepção coletados no tempo 0, ou seja, antes da administração das drogas testadas e da carragenina (valor basal). As médias foram comparadas entre os grupos estudados.

4.6 PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA DE LUZ

Decorridos 8 dias da aplicação da carragenina ou soro fisiológico nos masseteres, os animais foram eutanasiados com sobredosagem de uma associação de solução de cloridrato de cetamina 10% (Cetamin®, Syntec) e solução de 2% de cloridrato de xilazina (Sedanew®, Vetnil), via intraperitoneal. Em seguida, foi realizada a dissecação do masseter de forma a obter a porção posterior do masseter profundo, a qual foi fixada em solução de 4% de formaldeído tamponado em fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4, por 24 horas.

Após fixação, os espécimes indicados para o estudo em microscopia de luz foram processados e corados para H&E, de forma a obter cortes semisseriados com 5 µm de espessura e transversais ao longo eixo do músculo masseter.

4.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA

As secções coradas com H&E foram analisadas por um único observador e capturadas com o auxílio de uma câmera digital (DP71, Olympus, Japão), acoplada a um microscópio de luz (modelo BX-51, Olympus, Japão), processado por um computador de mesa Pentium IV e auxílio do programa Image-Pro Plus® (Versão 6.2 – Media Cybernetics, USA).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados, expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.), foram testados quanto à normalidade através dos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. As análises estatísticas foram feitas utilizando o teste de Anova-Two Way, seguido de pós-teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

5 RESULTADOS

Durante as avaliações, os animais permaneceram calmos e exibiram comportamento normal de limpeza (*grooming behavior*). Os valores relativos aos limiares de resposta nociceptiva foram determinados pelo operador sem intercorrências ou interrupções.

5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As características da matriz extracelular e das células relacionadas ao músculo masseter direito nos animais eutanasiados no período de 8 dias após a infiltração com soro fisiológico ou carragenina foram avaliadas e foram descritas a seguir (**Figuras 2 e 3**).

Nas amostras do grupo GI (soro fisiológico), em secção transversal, as fibras musculares do masseter mostravam aspecto poliédrico, com um espaço endomisial pouco perceptível (**Figura 2- A**). O espaço perimisial estava preenchido por tecido conjuntivo formado por fibroblastos, fibras colágenas tipo I e vasos sanguíneos (**Figura 3- A**). Em algumas amostras, foi observada uma área de aspecto linear e bastante celular, associada com a destruição de algumas células musculares esqueléticas, provavelmente relacionadas à penetração da agulha hipodérmica no músculo masseter.

No grupo GII (carragenina), os masseteres apresentaram algumas áreas focais com moderada a intensa destruição de fibras musculares esqueléticas, com aumento dos espaços endomisial e perimisial (**Figura 2- B**). O espaço perimisial estava preenchido por um tecido muito celular, contendo alguns linfócitos, muitos macrófagos e raros mastócitos (**Figura 3- B**).

No grupo GIII (soro e ibuprofeno), o músculo masseter mostrava fibras musculares preservadas, de aspecto poliédrico, com núcleos de localização periférica. Os espaços endomisiais e perimisiais eram delgados (**Figura 2- C**). O espaço perimisial estava preenchido por um tecido conjuntivo denso com fibras colágenas do tipo I e vascularizado, contendo fibroblastos (**Figura 3- C**).

No grupo GIV (carragenina e ibuprofeno), algumas áreas localizadas de moderada destruição tecidual foram observadas no masseter (**Figura 2- D**). Nas proximidades dessas áreas, os espaços perimisiais estavam preenchidos por um

tecido bastante celular, contendo alguns linfócitos, macrófagos e raros mastócitos **(Figura 3- D)**.

No grupo GV (soro e toxina botulínica), as fibras musculares estavam preservadas, com sarcoplasma acidófilo e núcleos situados perifericamente. Os espaços endomisiais e perimisiais eram delgados **(Figura 2- E)**. O espaço perimisial era constituído por um tecido conjuntivo denso, muito vascularizado com arteríolas, capilares e vênulas, e com fibroblastos **(Figura 3- E)**. Um espécime mostrou a presença de alguns linfócitos nas proximidades de um nervo periférico aparentemente lesionado.

No grupo GVI (carragenina e toxina botulínica), os masseteres tratados com carragenina e toxina botulínica mostraram alguns focos de severa destruição tecidual, com alargamento dos espaços perimisiais nas áreas circunvizinhas **(Figura 2- F)**. Esses espaços perimisiais estavam formados por um tecido muito celular, contendo linfócitos, muitos macrófagos e raros mastócitos **(Figura 3- F)**. A quantidade de linfócitos era equivalente ao observado nos espécimes do grupo tratado isoladamente com carragenina.

Figura 2 – Fotomicrografias mostrando secções transversais das fibras musculares do músculo masseter direito de ratos infiltrado com soro fisiológico (**A, C e E**) ou com carragenina (**B, D e F**), 8 dias após a intervenção. Fibras musculares esqueléticas poliédricas, acidófilas e bem preservadas envolvidas individualmente por endomísio delgado e associadas a perimísios vascularizados são observadas nos grupos tratados com soro fisiológico. Os espécimes tratados com carragenina mostram áreas bem delimitadas de destruição tecidual, com aumento dos espaços perimisiais (setas) e endomisiais (cabeças de seta). Note que o grupo tratado com carragenina e toxina botulínica (**F**) mostrou uma área discretamente mais ampla de destruição tecidual quando comparado com os demais grupos experimentais (**B e D**). Coloração H & E.

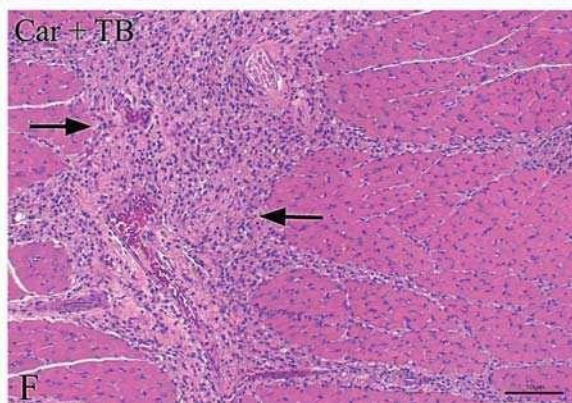
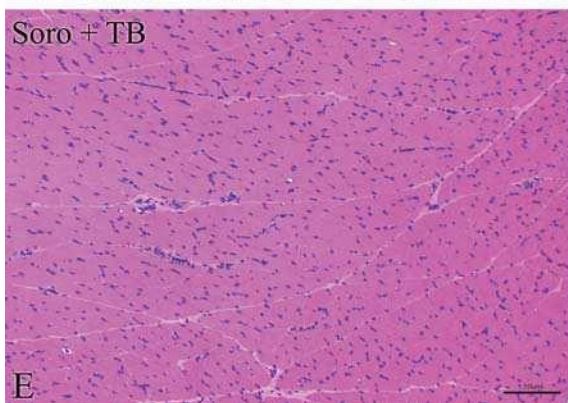
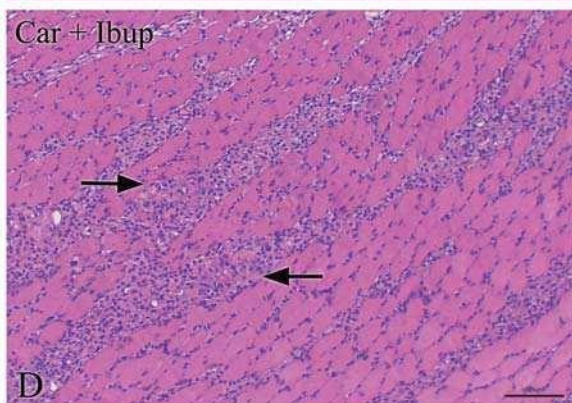
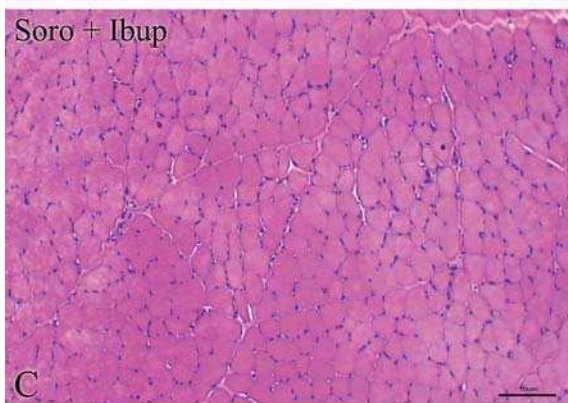
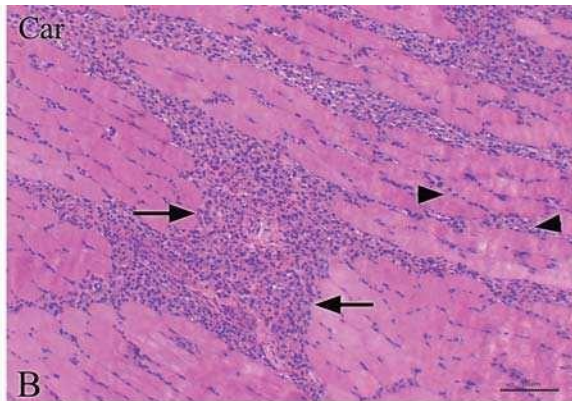
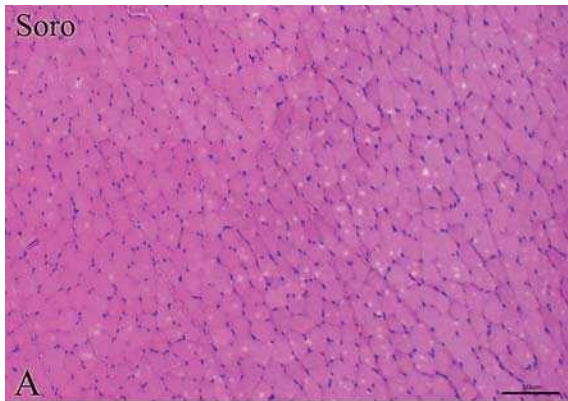
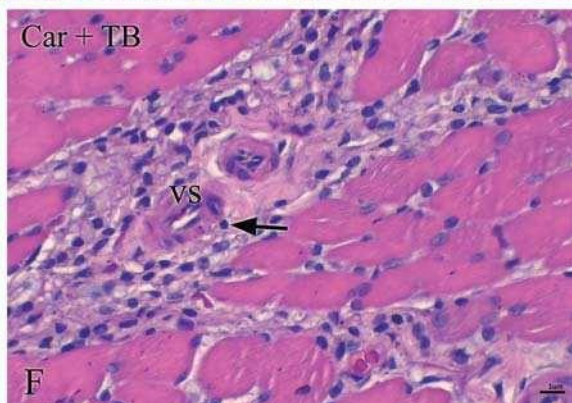
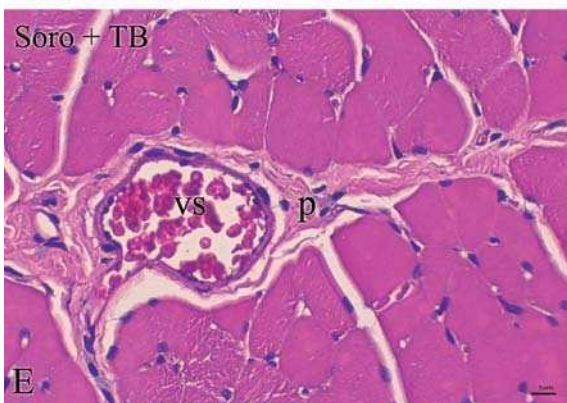
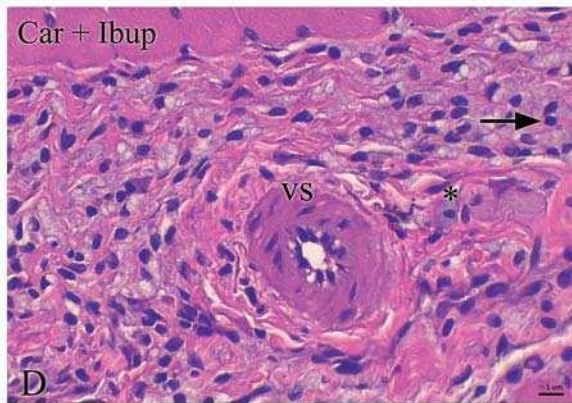
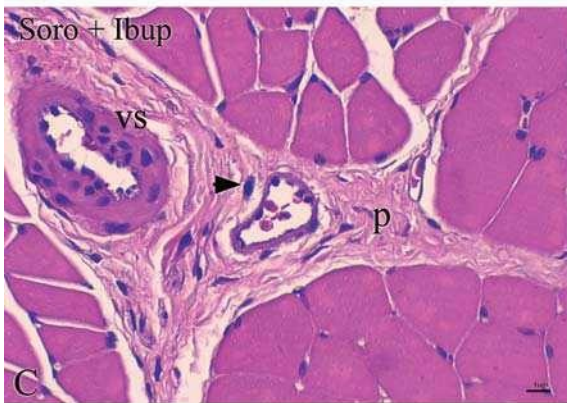
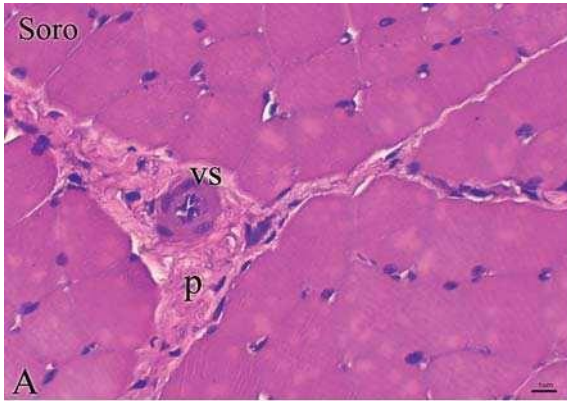


Figura 3 - Fotomicrografias mostrando áreas de perímio do músculo masseter direito de ratos infiltrado com soro fisiológico (**A, C e E**) ou com carragenina (**B, D e F**), 8 dias após a intervenção. Perímios de aspecto normal e formados por tecido conjuntivo denso, fibroblastos (cabeça de seta) e conjuntos de arteríolas, vênulas e capilares são observados nos grupos tratados com soro fisiológico. Os espécimes tratados com carragenina mostram áreas alargadas de perímio, com poucas fibras colágenas e muito celularizada. Observe que o tecido perimisial, embora bastante celularizado, mostra poucos linfócitos (setas), alguns mastócitos (asterisco) e nenhum leucócito polimorfonuclear. Coloração H & E. Vs, vaso sanguíneo; p, perímio.



5.2 AVALIAÇÃO DO LIMIAR DE RESPOSTA NOCICEPTIVA

O estudo comparativo intergrupos mostrou diferenças importantes na resposta nociceptiva, algumas delas estatisticamente significantes, que estão descritas a seguir (**Figura 4**).

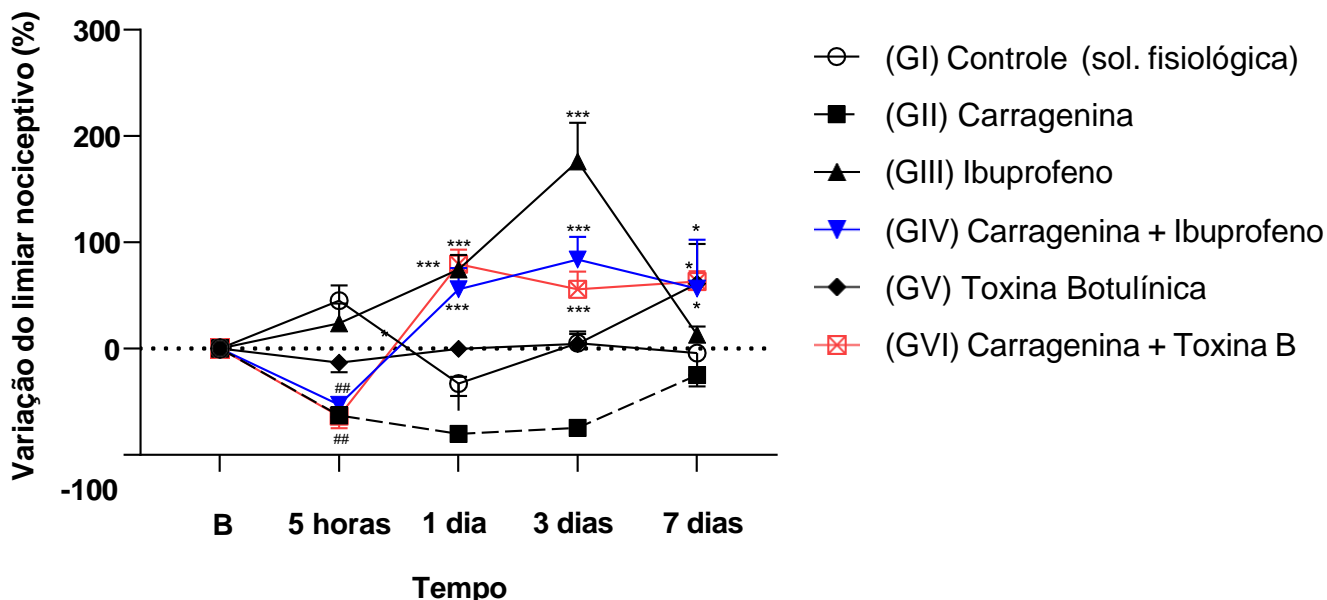


Figura 4 – Efeito de diferentes drogas administradas no masseter sobre o percentual de variação do limiar de resposta nociceptiva mecânica em relação ao valor basal mensurado com analgesímetro digital de Von Frey. Os resultados foram normalizados como porcentagens dos valores basais (100%) em cada grupo e representam a média do limiar de retirada da pata (g) \pm epm (n = X). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo carragenina para o mesmo tempo. ## $p < 0,01$ em comparação com o grupo controle (solução fisiológica) para o mesmo tempo (ANOVA two-way, pós-teste de Tukey).

No grupo controle negativo (GI), a administração de soro fisiológico resultou em pequenas alterações do percentual de variação do limiar nociceptivo em relação ao valor basal. Contudo, as oscilações percentuais não foram estatisticamente significantes quando os tempos experimentais foram comparados dentro do mesmo grupo ($p > 0,05$).

No grupo controle positivo (GII), a administração isolada de carragenina resultou em mudanças relevantes do percentual de variação do limiar nociceptivo, particularmente no período de 5 horas após a aplicação da droga. Nesse período, houve uma redução do limiar nociceptivo de 2,5 vezes em relação ao grupo GI (soro), sendo o resultado estatisticamente significativo ($p < 0,01$) (**Figura 5**).

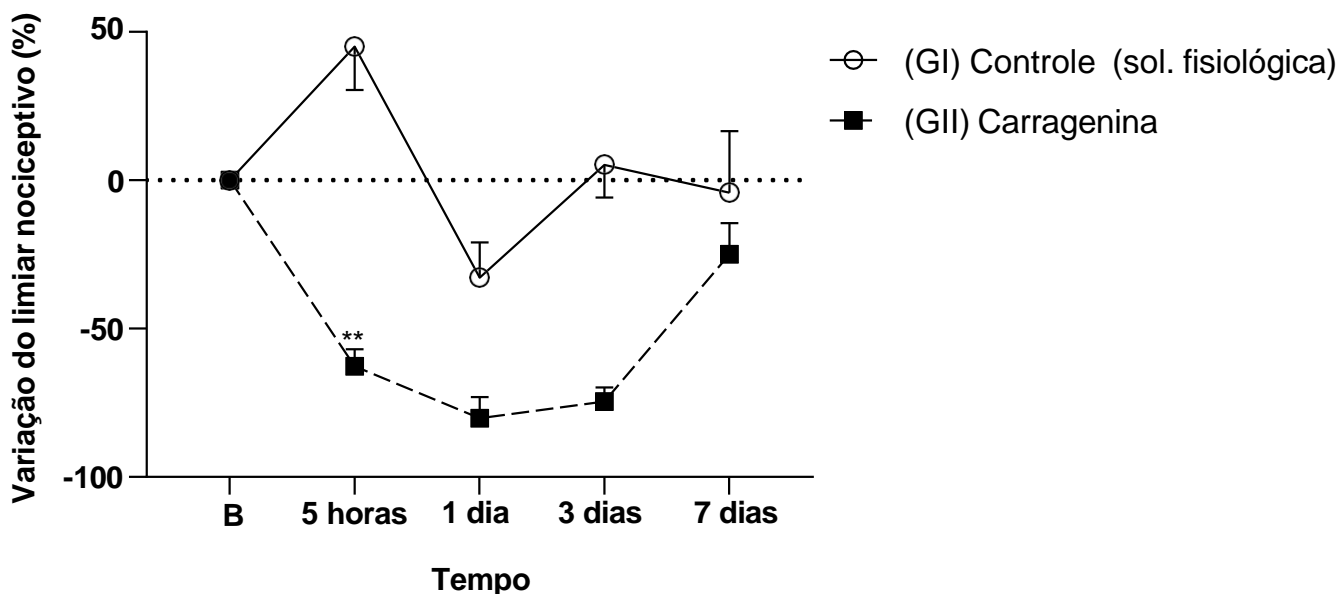


Figura 5 – Efeito do soro fisiológico (GI) e da carragenina (GII) administrados no masseter sobre o percentual de variação do limiar de resposta nociceptiva mecânica em relação ao valor basal mensurado com analgesímetro digital de Von Frey. Os resultados foram normalizados como porcentagens dos valores basais (100%) em cada grupo e representam a média do limiar de retirada da pata (g) \pm epm (n = X). ** p < 0,01 em comparação com o grupo GI (soro fisiológico) para o mesmo tempo (ANOVA two-way, pós-teste de Tukey). Observar diminuição do valor percentual de resposta nociceptiva no tempo experimental de 5 horas no grupo GII, quando comparado ao grupo GI (p < 0,01).

No grupo GIII, a administração de soro fisiológico e ibuprofeno proporcionou um aumento do limiar nociceptivo, estando acima dos valores mensurados antes da intervenção. Não houve diferenças estatisticamente significantes quando os grupos GI (soro) e o GIII foram comparados (p > 0,05). Em comparação com o grupo GII (carragenina), o grupo GIII mostrou um aumento nos percentuais de variação do limiar nociceptivo em relação ao basal nos períodos de 1 dia (p < 0,001) e 3 dias (p < 0,001) **(dados não mostrados)**.

No grupo GIV, a inoculação de carragenina nos animais tratados com ibuprofeno produziu alterações nos percentuais do limiar nociceptivo, com um percentual negativo importante no tempo experimental de 5 horas, cujo valor foi estatisticamente significativo quando comparado com o grupo GI para o mesmo período (P < 0,01). Em comparação com o grupo GII (carragenina), o grupo GIV mostrou um aumento nos percentuais de variação do limiar nociceptivo em relação ao basal nos períodos de 1 dia (p < 0,001), 3 dias (p < 0,001) e 7 dias (p < 0,05) **(Figura 6)**.

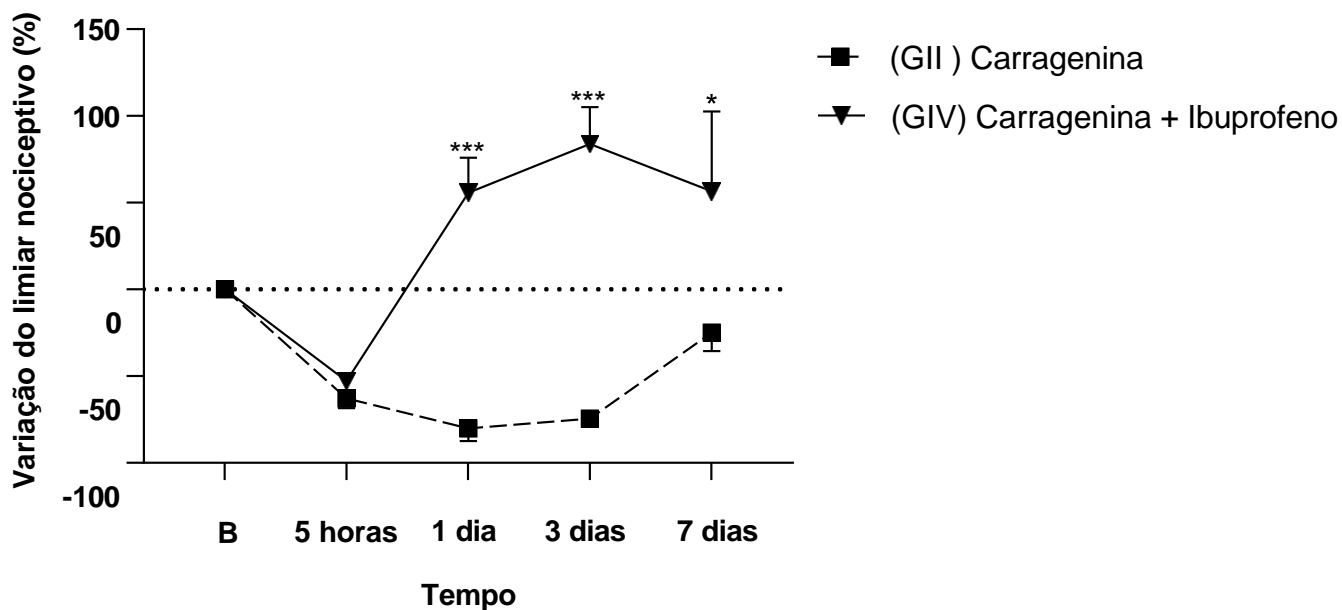


Figura 6 – Efeito da administração da carragenina (GII) e da carragenina e ibuprofeno (GIV) sobre o percentual de variação do limiar de resposta nociceptiva mecânica em relação ao valor basal mensurado com analgesímetro digital de Von Frey. Os resultados foram normalizados como porcentagens dos valores basais (100%) em cada grupo e representam a média do limiar de retirada da pata (g) \pm epm (n = X). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo GII (carragenina) para o mesmo tempo (ANOVA two-way, pós-teste de Tukey). Notar aumento nos percentuais de variação do limiar nociceptivo em relação ao basal nos tempos experimentais de 1 dia ($P < 0,001$), 3 dias ($P < 0,001$) e 7 dias ($P < 0,05$) no grupo GIV, quando comparado ao grupo G II.

No grupo GV, a administração de soro fisiológico nos animais tratados com toxina botulínica ocasionou uma redução importante nos valores percentuais em relação ao limiar nociceptivo basal nos tempos experimentais de 5 horas e de 1 dia. Em relação ao período de 5 horas, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado com soro fisiológico e com toxina botulínica, e grupo tratado apenas com carragenina ($p > 0,05$). Nos períodos de 3 e 7 dias, a média do limiar nociceptivo foi maior que os valores obtidos nas mensurações basais. Não houve diferenças estatisticamente significantes quando os grupos GI (soro) e o GV foram comparados nos períodos estudados ($p > 0,05$).

No grupo GVI, a infiltração de carragenina nos masseteres dos animais tratados com toxina botulínica reduziu o valor percentual em relação ao limiar nociceptivo basal no período de 5 horas após a intervenção. Nos períodos experimentais subsequentes, os valores percentuais foram maiores que os valores basais. Em comparação com o grupo GII (carragenina), o grupo GVI mostrou um aumento nos percentuais de variação do limiar nociceptivo em relação ao basal nos períodos de 1 dia ($p < 0,001$), 3 dias ($p < 0,001$) e 7 dias ($p < 0,05$) (**Figura 7**). Em todos os tempos experimentais, não houve diferenças

estatisticamente significantes quando os valores percentuais em relação ao limiar nociceptivo basal dos grupos GIV (carragenina + ibuprofeno) e o GVI foram comparados (**Figura 8**).

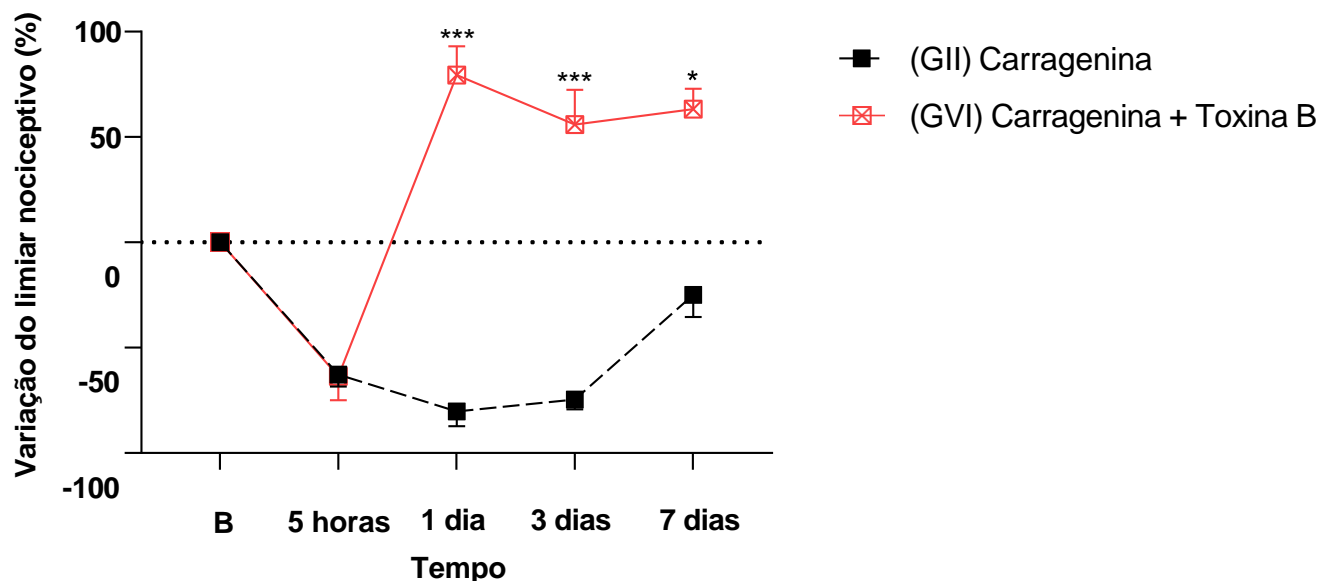


Figura 7 – Efeito da administração da carragenina (GII) e da carragenina e toxina botulínica (GVI) sobre o percentual de variação do limiar de resposta nociceptiva mecânica em relação ao valor basal mensurado com analgesímetro digital de Von Frey. Os resultados foram normalizados como porcentagens dos valores basais (100%) em cada grupo e representam a média do limiar de retirada da pata (g) \pm epm (n = X). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo GII (carragenina) para o mesmo tempo (ANOVA two-way, pós-teste de Tukey). Observar aumento nos percentuais de variação do limiar nociceptivo em relação ao basal nos tempos experimentais de 1 dia ($p < 0,001$), 3 dias ($p < 0,001$) e 7 dias ($p < 0,05$) no grupo GVI, quando comparado ao grupo G II.

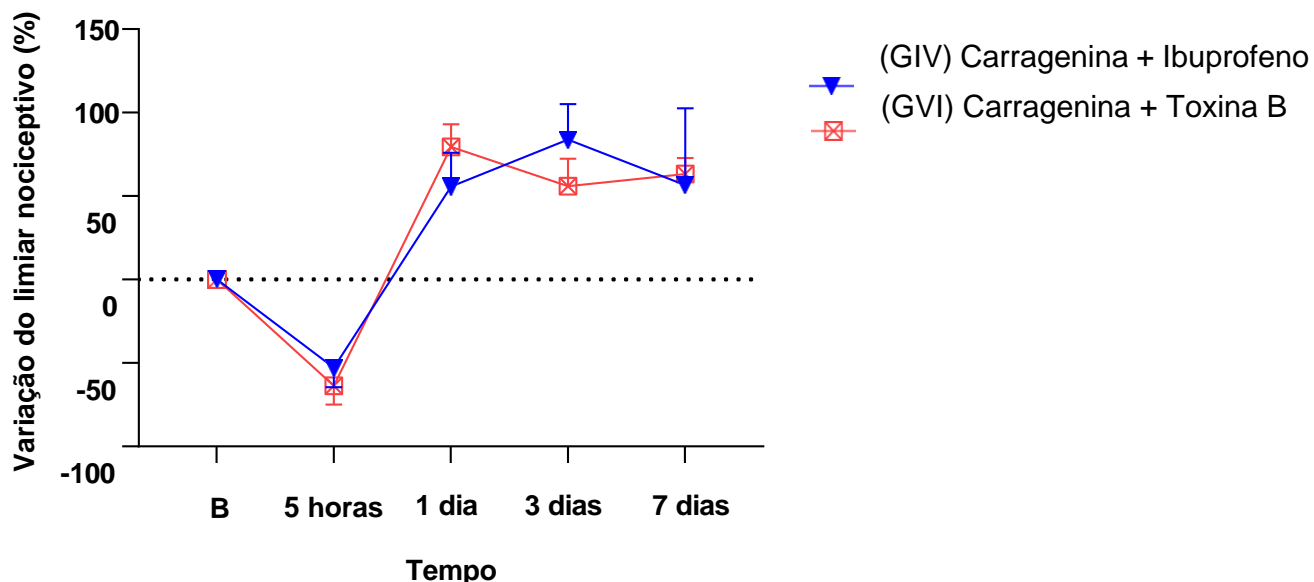


Figura 8 – Efeito da administração da carragenina e ibuprofeno (GIV) e da carragenina e toxina botulínica (GVI) sobre o percentual de variação do limiar de resposta nociceptiva mecânica em relação ao valor basal mensurado com analgesímetro digital de Von Frey. Os resultados foram normalizados como porcentagens dos valores basais (100%) em cada grupo e representam a média do limiar de retirada da pata (g) \pm epm (n = X). (ANOVA two-way, pós-teste de Tukey). Notar ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos GIV e G VI e todos os tempos experimentais ($p > 0,05$).

6 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que o modelo de dor inflamatória induzido pela carragenina alterou o limiar nociceptivo em função dos períodos de tempo, podendo ser empregado para a avaliação do efeito antinociceptivo da TNBo/A em condições dolorosas no músculo masseter. Neste estudo, a TNBo/A aumentou o limiar nociceptivo nos animais tratados com carragenina, apresentando resultados similares aos observados nos animais tratados com o anti-inflamatório não esteroide ibuprofeno. Decorridos 8 dias da intervenção terapêutica, a avaliação histológica do masseter direito de todos os grupos tratados com carragenina mostrou uma alteração tecidual localizada associada a um processo inflamatório crônico.

O efeito de algumas drogas, inclusive a TNBo/A, tem sido estudado pela inoculação de carragenina na planta da pata traseira de ratos,^{14,98} na articulação do joelho, no músculo gastrocnêmico,⁸⁸ na ATM⁹⁹ e, mais recentemente, no músculo masseter.¹⁰⁰ Ainda que esses trabalhos tenham mostrado uma ação antinociceptiva importante da TNBo/A no tecido muscular, nenhum deles investigou seus efeitos sobre o músculo masseter, um músculo que apresenta uma inervação distinta daquela observada nos músculos de outras regiões, especialmente, aqueles que compõem a pata traseira dos roedores. Acredita-se que o estudo dos efeitos da toxina botulínica em um modelo de dor inflamatória no músculo masseter possa contribuir para a compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos na possível capacidade antinociceptiva dessa droga, além de investigar os possíveis efeitos indesejáveis após o seu uso.

Os animais tratados com soro fisiológico (grupos GI, GIII e GV) não mostraram alterações teciduais importantes, enquanto os espécimes tratados com carragenina (grupos GII, GIV e GVI) exibiram pequena destruição tecidual associada a um processo inflamatório crônico no local de inoculação dessa droga. Quando os grupos tratados com carragenina foram comparados, foi observada uma destruição tecidual discretamente mais extensa no grupo que utilizou a associação carragenina e TNBo/A, podendo estar relacionada com uma importante redução do limiar nociceptivo observada no período de 5 horas. Neste período, suas médias foram equivalentes aos valores percentuais observados no

grupo GII (carragenina), não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Adicionalmente, a inexistência de diferença estatisticamente significativa entre os valores percentuais do grupo tratado com soro fisiológico e TNBo/A e do grupo tratado apenas com carragenina ($p > 0,05$) pode indicar um efeito intrínseco negativo da TNBo no início do processo inflamatório desencadeado pela carragenina.

Os achados nociceptivos e a destruição tecidual significativa observados no grupo VI (carragenina e TNBo/A) correlacionam-se com algumas complicações relatadas na literatura. A dor no local da injeção é um efeito indesejado bastante comum, com retorno aos limiares nociceptivos originais dentro de 1 a 3 dias. Eventualmente, o tratamento com TNBo/A também pode induzir a complicações, como edema local e hematomas no local de infiltração da droga, sendo decorrentes de danos vasculares localizados. De fato, no presente estudo, foi possível observar coleções de hemácias fora dos vasos sanguíneos e depositadas na matriz extracelular, caracterizando uma hemorragia em algumas amostras histológicas do grupo tratado com TNBo/A. Outras complicações incluem a tontura, a cefaleia, a fraqueza na mastigação, a flacidez, as alterações na expressão facial, os movimentos anormais da ATM, o afundamento da bochecha e a neuropraxia (contusão nervosa com bloqueio fisiológico transitório).

72

Contudo, o grupo tratado com carragenina e TNBo/A mostrou um aumento do limiar nociceptivo nos períodos de 1 dia ($p < 0,001$), 3 dias ($p < 0,001$) e 7 dias ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo tratado apenas com carragenina, indicando um efeito antinociceptivo da TNBo/A após 1 dia. Tais achados contrastam com uma destruição tecidual focal significativa neste grupo em relação aos demais grupos, mesmo aquele tratado isoladamente com carragenina, além da ausência de um efeito anti-inflamatório. Com base nesses achados, sugere-se que o efeito antinociceptivo da TNBo/A não seja local, mas requeira a ativação de neurônios sensoriais periféricos, envolvendo o transporte axonal retrógrado da droga em direção a medula espinhal. Assim, a TNBo/A seria capaz de induzir um efeito antinociceptivo significativo, mesmo maximizando a injúria local produzida pela carragenina. O local e o exato mecanismo de ação antinociceptiva da TNBo/A não foram elucidados, mas evidências apontam para uma ação central. Favre-Guilmond e colaboradores,¹⁴ por exemplo, mostraram que a administração

bilateral de carragenina nas patas de ratos e a inoculação de TNBo/A apenas na pata direita resultou na redução da hiperalgesia mecânica em ambas as patas, indicando que seus efeitos analgésicos requerem ativação de vias que induzem uma sensibilização central. Também, Drinovac e colaboradores¹⁰¹ mostraram que o naltrexona, uma droga antagonista opioide de ação central, aboliu o efeito antinociceptivo da TNBo/A em um teste de dor orofacial induzido pela formalina, sugerindo que esta droga poderia aumentar a liberação de peptídeos opioides endógenos e / ou o número de receptores opioides, diminuindo a dor associada à região trigeminal. Bach-Rojecky e colaboradores⁶⁷ demonstraram que o efeito antinociceptivo da TNBo/A foi interrompido em um modelo de hiperalgesia bilateral no músculo gastrocnêmio em ratos quando o transporte axonal retrógrado foi bloqueado pela droga colchicina, indicando a necessidade dessa via de transporte axonal e o envolvimento do SNC para a atividade antinociceptiva do TNBo/A.

O modelo de edema inflamatório da pata induzido pela carragenina tem sido uma ferramenta vital para o desenvolvimento de drogas anti-inflamatórias. Alguns estudos têm indicado o desenvolvimento inicial de um edema, acompanhado por um período de alodinia, que atinge o pico em torno de 4 horas após a inoculação da carragenina, com duração de 24 a 96 horas¹⁰², subsidiando o desenvolvimento do nosso modelo experimental que realizou avaliações nociceptivas antes da aplicação da carragenina no músculo masseter e 5 horas, 1, 3 e 7 dias após a intervenção.

Os efeitos da carragenina sobre o tecido têm sido bem descritos pela literatura e consistem em três fases. A primeira fase da sua resposta inflamatória é mediada por histamina e 5-hidroxitriptamina, sendo seguida, muitas vezes, pela liberação da bradicinina (segunda fase da inflamação). A última fase da inflamação é atribuída à produção local de prostaglandinas, principalmente do tipo E.^{103,104} Tais eventos contribuem para a imediata migração de neutrófilos para os locais de inflamação, constituindo-se nas principais células envolvidas nas fases iniciais da inflamação (inflamação aguda)¹⁰⁵. Contudo, a avaliação histológica do presente estudo mostrou que todos os espécimes tratados com carragenina mostravam espaços perimisiais preenchidos por um tecido muito celular, sem leucócitos polimorfonucleares, contendo linfócitos, muitos macrófagos e raros mastócitos compatíveis com a presença de um processo inflamatório crônico.

A diferença observada quanto à natureza do processo inflamatório pode ser atribuída ao período de eutanásia empregado em nosso estudo (8 dias). Decorridos 8 dias da administração da carragenina, muito provavelmente, o processo inflamatório agudo com pico em 4 horas após inoculação da droga inflamatória e caracterizado por vasodilatação, aumento da permeabilidade e migração de leucócitos polimorfonucleares foi convertido em um processo inflamatório crônico com infiltração de células mononucleares, levando à destruição tecidual e às tentativas de cicatrização com substituição do tecido danificado. Tais achados histológicos correlacionam-se com o estudo de Radhakrishnan e colaboradores,⁸⁸ que avaliaram o padrão inflamatório gerado pela infiltração de carragenina na articulação do joelho e no músculo gastrocnêmico em ratos nos tempos experimentais de 4, 8, 24 horas, e 1, 2, 4 e 8 semanas após a aplicação dessa droga. Após 1 (uma) semana, a inflamação inicialmente aguda com predomínio de neutrófilos tinha sido convertida em uma inflamação com predomínio de macrófagos e alguns mastócitos. A hipótese desse estudo, se verdadeira, e os achados histológicos apresentados aqui indicam a necessidade de estudar o dano tecidual e o processo inflamatório nas primeiras 24 horas após a aplicação da carragenina, a fim de observar o comportamento da toxina botulínica sobre os períodos iniciais no modelo de dor inflamatória estudado.

O estudo histológico comparativo do processo inflamatório entre os grupos no período de 8 dias mostrou uma pequena diferença entre os grupos IV (carragenina e ibuprofeno) e VI (carragenina e TNBo/A), sendo menos severo no primeiro grupo, indicando que a TNBo/A não apresentou um efeito anti-inflamatório no modelo experimental estudado. Nossos achados correlacionam-se com o trabalho de Bach-Rojecky e colaboradores¹³ que não observaram um efeito anti-inflamatório da TNBo/A em um modelo de dor com carragenina em patas de ratos. Contudo, Cui e colaboradores¹² mostraram que a administração de TNBo/A reduziu o edema induzido pela formalina. Os resultados diferentes entre os estudos podem estar relacionados a diferentes mecanismos desencadeadores da inflamação e sensibilização das estruturas nervosas empregadas pelos dois modelos de estudo da dor e inflamação.

No presente estudo, o anti-inflamatório não esteroide (AINE) ibuprofeno foi utilizado nos grupos controle positivos pelas suas atividades anti-inflamatória e

analgésica. Os AINEs inibem a ciclooxigenase (COX), uma enzima responsável pela transformação do ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxanos.¹⁰⁷ As prostaglandinas exercem uma ação vasodilatadora potente, resultando em um aumento da permeabilidade vascular, com extravasamento de líquidos e glóbulos brancos, fenômenos observados nas fases iniciais do processo inflamatório induzido pela carragenina. Portanto, o ibuprofeno poderia exercer um importante efeito anti-inflamatório no modelo de dor inflamatória empregado no presente estudo, visto que a inibição da síntese da COX é base da ação dos AINEs no tratamento da dor e inflamação. A inflamação induzida por carragenina demonstrou ser altamente preditiva da atividade de drogas anti-inflamatórias na doença inflamatória humana e as doses de AINEs neste modelo se correlacionam bem com a dose efetiva em pacientes.¹⁰⁷

Este trabalho foi o primeiro estudo que avaliou o efeito da toxina botulínica em um modelo de inflamação mediado pela carragenina no músculo masseter de ratos. Os resultados apresentados aqui revelaram que a TNBo/A reduziu a nocicepção em relação ao grupo tratado isoladamente com carragenina, havendo diferença estatisticamente significante entre os dois grupos, e com efeitos similares aos observados no grupo tratado com o AINE ibuprofeno. Em todos os grupos tratados com carragenina, áreas focais de destruição tecidual foram observadas. Tais áreas foram discretamente mais amplas no grupo tratado com carragenina e TNBo/A.

Os resultados apresentados revelaram que a TNBo/A possui um efeito antinociceptivo em condições dolorosas no músculo masseter, mas pode se constituir em um elemento adicional de dano tecidual se um ambiente inflamatório está instalado no tecido muscular, não se constituindo, portanto, na primeira opção para o tratamento de dores miofasciais. Assim, os achados do presente estudo devem ser confirmados por outros trabalhos experimentais empregando outras doses de TNBo/A e outros modelos de inflamação e dor, com o propósito de confirmar os efeitos benéficos potenciais da TNBo/A sobre condições dolorosas do músculo masseter e demais tecidos.

7 CONCLUSÕES

- A TNBo/A aumentou o limiar nociceptivo nos espécimes tratados com carragenina, apresentando resultados similares aos observados nos animais tratados com ibuprofeno;
- Os grupos tratados com carragenina (GII, GIV e GVI) mostraram uma destruição tecidual localizada relacionada à infiltração da droga inflamatória que foi mais extensa no grupo tratado previamente com TNBo/A;
- Os grupos tratados com carragenina (GII, GIV e GVI) mostraram áreas endomisiais e peromisiais associadas a um processo inflamatório crônico rico em macrófagos no período de 8 dias após administração da droga.

REFERÊNCIAS

1. Cohen M, Quintner J, van Rysewyk S. Reconsidering the International Association for the Study of Pain definition of pain. *Pain Rep*; Mar 2018;3(2): e634.
2. Gatchel RJ, Stowell AW, Wildenstein L, Riggs R, Ellis E. Efficacy of an early intervention for patients with acute temporomandibular disorder-related pain: a one-year outcome study. *J Am Dent Assoc*. Mar 2006;137(3):339-47.
3. Bove S E, Flatters S J, Inglis J J, Mantyh PW. New advances in musculoskeletal pain. *Brain Res Rev*. 2009; 60(1):187-201.
4. De Leeuw, R. *Orofacial Pain: guidelines for assessment, diagnoses and management*. Chicago: Quintessence, 2008.
5. De Moraes Maia ML, Ribeiro MA, Maia LG, Stuginski-Barbosa J, Costa YM, Porporatti AL, Conti PC, Bonjardim LR. Evaluation of low-level laser therapy effectiveness on the pain and masticatory performance of patients with myofascial pain. *Lasers Med Sci*. Jan 2014;29(1):29-35.
6. Altindis T, Güngörmüş M. Thermographic evaluation of occlusal splint and low level laser therapy in myofascial pain syndrome. *Complementary Therapies in Medicine*, v. 44, p. 277-281, 2009. *Complementary Therapies in Medicine*. Jun 2019;44:277-81.
7. Hersh EV, Balasubramaniam R, Pinto A. Pharmacologic management of temporomandibular disorders. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2008;20(2):197-210.
8. Bevilaqua-Grosso D, Monteiro PV, Guirro RR, Bérzin, F. A physiotherapeutic approach to craniomandibular disorders: a case report. *J Oral Rehabil*. 2002; 29(3): 268-73.
9. Yomasa MM, Rizzi EC, Leão JC, Issa JP, Dias FJ, Pereira YC, Fonseca MJ, Vicentini FT, Watanabe IS. Zymographic and ultrastructural evaluations after low-level laser irradiation on masseter muscle of HRS/J strain mice. *Lasers Med Sci*. May 2013;28(3):777-83.
10. Rana Ataran, Ayla Bahramian, Zahra Jamali, Vahid Pishahang Homayoon Sadeghi Barzegani, Parvin Sarbakhsh, Javad Yazdani. The role of botulinum toxin A in treatment of temporomandibular joint disorders: a review. *J Dent Shiraz Univ Med Sci*, Sep 2017; 18(3):157-9.
11. Sang-Yun Kim, Young-Kyun Kim, Pil-Young Yun, Ji-Hyun Bae. Treatment of non-odontogenic orofacial pain using botulinum toxin-A: a retrospective case series study. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*. Dec 2018; 40(1):21.
12. Cui M, Khanijou S, Rubino J, Aoki KR. Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduces formalin-induced pain. *Pain*. Jan 2004;107(1-2):125-33.
13. Bach-Rojecky L, Dominis M, Lackovic Z. Lack of anti-inflammatory effect of botulinum toxin type A in experimental models of inflammation. *Fundam. Clin. Pharmacol*. Oct 2008; 22(5):503-9.
14. Favre-Guilmond C, Chabrier PE, Kalinichev M. Bilateral analgesic effects of abobotulinumtoxinA (Dysport®) following unilateral administration in the rat. *Eur J*

Pain. May 2017; 21(5):927-37.

15. Favre-Guilmard C, Auguet M, Chabrier PE. Different antinociceptive effects of botulinum toxin type A in inflammatory and peripheral polyneuropathic rat models. *European Journal of Pharmacology*. Sep 2009; 617(1-3):48-53.

16. Gregory N S, Harris A L, Robinson C R, Dougherty P M, Fuchs PN, Sluka K A. An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. *J Pain* Nov 2013;14(11):1255-69.

17. Sugishita E, Amagaya S, Ogihara Y. Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. *Journal of Pharmacobiology-Dynamics*. Aug 1981;4(8): 565-75.

18. Henriques MG, Silva PM, Martins MA, Flores CA, Cunha FQ, Assreuy-Filho J, Cordeiro RS. 1987) Mouse paw edema. A new model for inflammation? *Braz J Med Biol Res*. 1987;20(2): 243-9.

19. Paschapur MS, Patil MB, Kumar R, Patil SR. Evaluation of anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Borassus flabellifer* L. male flowers (inflorescences) in experimental animals. *J Med Plants Res*. 2009;3:49–54.

20. Mandipika J, Parmar HS. Evaluation of antioxidative and anti-inflammatory potential of hesperidin and naringin on the rat air pouch model of inflammation. *Inflammation Research*. May 2011;60(5):483-91. pp.483-9.

21. Petersson M, Wiberg U, Lundeberg T, Uvnäs-Moberg K. Oxytocin decreases carrageenan induced inflammation in rats. *Peptides*, Sep 2001;22(9):1479-84.

22. Sini JM, Yaro AH, Ayanwuyi LO, Aiyelero OM, Mallum SM, Gamaniel KS. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of the root bark of *Combretum sericeum* in rodents. *African Journal of Biotechnology*. 2010; 9(51):8872-8876.

23. Silva JC, Saraiva SRGL, Raimundo Gonçalves de Oliveira Júnior RG, Almeida JRGS. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. *Rev. Bras. Farm.* 2013; 94(1):18-23.

24. Ren K. An improved method for assessing mechanical allodynia in the rat. *Physiol Behav*. Nov1999;67(5):711-6.

25. Benoliel R, Svensson P, Evers S, Wang SJ, Barke A, Korwisi B, Rief W, Treede RD. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic secondary headache or orofacial pain. *PAIN*. 2019;160(1):60-8.

26. Shahla Kakoei, Masoud Parirokh, Nouzar Nakhaee, Forogh Jamshidshirazi, Maryam Rad, Sina Kakoei. Prevalence of toothache and associated factors: a population-based study in southeast Iran. *Iran Endod J*. 2013 Summer; 8(3): 123–128.

27. Koopman JS, Dieleman JP, Huygen FJ, de Mos M, Martin CG, Sturkenboom MC. Incidence of facial pain in the general population. *Pain*. Dec 2009;147(1-3):122-7.

28. Wahid A. et al. Prevalence and severity of temporomandibular disorder (TMD) in undergraduate medical students using Fonseca's questionnaire. *Pakistan Oral Dent J*, 2014;31:38-41.

29. Syed Rashid Habib, Mohammad Qasim Al Rifaiy, Kamran Habib

- Awan, Abdulaziz Alsaif, Abdulaziz Alshalan, Yasser Altokais. Prevalence and severity of temporomandibular disorders among university students in Riyadh, Saudi Dent J. 2015;27(3):125-37.
30. Rokaya D, Suttagul K, Joshi S, Bhattarai BP, Shah PK, Dixit S. An epidemiological study on the prevalence of temporomandibular disorder and associated history and problems in Nepalese subjects. J Dent Anesth Pain Med. Feb 2018;18(1):27-33.
31. Manfredini D, Guarda-Nardini L, Winocur E, Piccotti F, Ahlberg J, Lobbezoo F. Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders: a systemic review of axis epidemiological findings. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. Oct 2011;112(4):453-62.
32. De Santis TO, Motta LJ, Biasotto-Gonzalez DA, Mesquita-Ferrari RA, Fernandes KP, de Godoy CH, Alfaya TA, Bussadori SK. Accuracy study of the main screening tools for temporomandibular disorder in children and adolescents. J Bodyw Mov Ther. Jan 2014;18(1):87-91.
33. Kim HS, Yun PY, Kim YK. A clinical evaluation of botulinum toxin-a injections in the temporomandibular disorder treatment. Maxillofac Plast Reconstr Surg. Jan 2016;38(1):5.
34. Annaswamy TM, De Luigi AJ, O'Neill BJ, Keole N, Berbrayer D.. Emerging concepts in the treatment of myofascial pain: a review of medications, modalities, and needle-based interventions. PM R. Oct 2011; 3(10):785-93.
35. Domínguez-Carrilo, Arellano-Aguilar G, Alcocer-Maldonado JL, Franco-Dávalos R, Díaz Infante-González J. Síndrome miofascial de origen en la articulación temporomandibular (Síndrome de Costen): estudio de 2,500 casos. Oral. 2018; 19(61):1630-7.
36. Mense, S. Neurobiological basis for the use of botulinum toxin in pain therapy. J Neurol. Feb 2004;251 Suppl 1:1-7.
37. YULE, P. L et al. Temporomandibular disorders. Dental Update, 2016:4339-48.
38. Ebrahim S, Montoya L, Busse JW, Carrasco-Labra A, Guyatt GH, Medically Unexplained Syndromes Research Group. The effectiveness of splint therapy in patients with temporomandibular disorders: a systematic review and meta-analysis. J Am Dent Assoc. Aug 2012;143(8): 847-57.
39. Melis M, Di Giosia M, Zawawi KH. Low level laser therapy for the treatment of temporomandibular disorders: a systematic review of the literature. Cranio. Oct 2012;30(4):304-12.
40. Celakil T, Muric A, Gokcen Rb, Evlioglu G, Keskin H. Effect oh high-frequency bio-oxidative ozone therapy for masticatory muscle pain: a double-bilnd randomized clinical trial. Journal of Oral Rehabilitation, 2017, march, p 442-45.
41. De Leeuw R, Bertoli E, Schmidt JE, Carlson CR. Prevalence of traumatic stressors in patients with temporomandibular disorders. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Jan 2005; 63(1):42-50.

42. Mujakperuo HR, Watson M, Morrison R, Macfarlane TV. Pharmacological interventions for pain in patients with temporomandibular disorders. *Cochrane Database Syst Rev*. Oct 2010;(10):CD004715.
43. Song P C, Schwartz J, Blitzer A. The emerging role of botulinum toxin in the treatment of temporomandibular disorders. *Oral Dis*. May 2007;13(3):253-60.
44. Emara, A. S, Faramawey M. I; Hassaan M. A; Hakam M. M. Botulinum toxin injection for management of temporomandibular joint clicking. *Int J Oral Maxillofac Surg*. Jun 2013; 42(6):759-64.
45. Zhou JY, Wang D. An update on botulinum toxin A injections of trigger points for myofascial pain. *Curr Pain Headache Rep*. Jan 2014;18(1):386.
46. Barbe M F, Barr, A. E. Inflammation and the pathophysiology of work-related musculoskeletal disorders. *Brain Behav Immun*. 2006; 20(5):423-9.
47. Ambalavanar R, Yallampalli C, Yallampalli U, Dessem D. Injection of adjuvant but not acidic saline into craniofacial muscle evokes nociceptive behaviors and neuropeptide expression. *Neuroscience*. 2007; 149(3): 650-9.
48. Hinz B, Brune K. Pain and osteoarthritis: New drugs and mechanisms. *Curr Opin Rheumatol*. Sep 2004;16(5):628-33.
49. Boers M. NSAID and selective COX-2 inhibitors: Competition between gastroprotection and cardioprotection, *Lancet*. Apr 2001;357(9264):1222-3.
50. Greenberg, B. P. An evidence-based review of the cardiovascular risks of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Cardiol*. May 2009;103(9):1227-37.
51. Steinmeyer J, Kontinen YT. Oral treatment options for degenerative joint disease: Presence and future. *Adv Drug Deliv Rev*, n. 58, p. 168-2011, 2006.
52. Chiang CY, Dostrovsky JO, Iwata K, Sessle BJ. Role of glia in orofacial pain. *Neuroscientist*. 2011;17(3):303–20.
53. Ferrara-Jr JI, de Souza ET, Franciosi AC, Toniolo EF, Dale CS. Photobiomodulation-induced analgesia in experimental temporomandibular disorder involves central inhibition of fractalkine. *Lasers in Medical Science*. Dec 2019; 34(9):1841-7.
54. Haghghat, A. Evaluation of glucosamine sulfate and ibuprofen effects in patients with temporomandibular joint osteoarthritis symptom, *J Res Pharm Pract*. Jan-Mar 2013;2(1):34-9.
55. Dionne, R. A controlled evaluation of Ibuprofen and diazepam for chronic orofacial muscle pain. *J Orofacial Pain*.1997;11:137-46.
56. Marini I, Bartolucci ML, Bortolotti F, Gatto MR, Bonetti GA. Palmitoylethanolamide versus a nonsteroidal anti-inflammatory drug in the treatment of temporomandibular joint inflammatory pain. *J Orofacial Pain*. 2012;26(2): 99-104.
57. Matak I, Lacković Z. Botulinum toxin A, brain and pain. *Prog Neurobiol*. Ag-Sep 2014b;119-120: 39-59.
58. Kalb SR, Santana WI, Geren IN, Garcia-Rodriguez C, Lou J, Smith TJ, Marks JD, Smith LA, Pirkle JL, Barr JR. Extration and inhibition of enzymatic activity of

- botulinum neurotoxins/B1, /B2, /B3, /B4, and /B5 by a panel of monoclonal anti-BoNT/B antibodies. *BMC Biochem.* Nov 2011;12:58.
59. Muñoz Lora VRM, Del Bel Cury AA, Jabbari B, Lacković Z. Botulinum toxin type A in dental medicine. *J Dent Res.* Dec 2019;98(13):1450-57.
60. Gill, D. M. Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiol Rev.* 1982; 46: 86-94.
61. Sellin LC, S Thesleff S. Pre- and post-synaptic actions of botulinum toxin at the rat neuromuscular junction. *J Physiol.* Aug 198; 317:487–95.
62. Truong DD, Jost WH. Botulinum toxin: clinical use. *Parkinsonism Relat Disord.* Sep 2006;12(6):331-55.
63. Chen S. Clinical uses of botulinum neurotoxins: current indications, limitations and future developments. *Toxins (Basel).* Oct 2012;4(10):913-39.
64. Walker TJ, Dayan SH. Comparison and overview of currently available neurotoxins. *J Clin Aesthet Dermatol.* Feb 2014;7(2):31-9.
65. Tincello DG, Kenyon S, Abrams KR, Mayne C, Toozs-Hobson P, Taylor D, Slack M.. Botulinum toxin a versus placebo for refractory detrusor overactivity in women: a randomised blinded placebo-controlled trial of 240 women (the RELAX Study). *Eur Urol.* Sep 2012;62(3):507-14.
66. Lacy BE, Weiser K, Kennedy A. Botulinum toxin and gastrointestinal tract disorders: Panacea, placebo, or pathway to the future? *Gastroenterol. Hepatol.* Apr. 2008; 4(4):283-25.
67. Bach-Rojecky L, Salkovic-Petrusic M, Lackovic Z. Botulinum toxin type A reduces pain supersensitivity in experimental diabetic neuropathy: Bilateral effect after unilateral injection. *Eur.J. Pharmacol.* May 2010; 633(1-3):10-4.
68. Fageeh, W. M. Different treatment modalities for refractory vaginismus in western Saudi Arabia. *J. Sex. Med.* Jun 2011;8(6):1735-9.
69. Matak I, Rossetto O, Lacković Z. Botulinum toxin type A selectivity for certain types of pain is associated with capsaicin-sensitive neurons. *Pain.* 2014a. 155(8): 1516-26.
70. Park KS, Lee CH, Le, JW Use of a botulinum toxin A in dentistry and oral and maxillofacial surgery *J Dent Anesth Pain Med.* Sep 2016;16(3):151–7.
71. Archana Ms. Toxin yet not toxic: Botulinum toxin in dentistry. *Saudi Dent J.* Apr 2016;28(2):63-9.
72. Yeh YT, Peng JH, Peng HP. Literature review of the adverse events associated with botulinum toxin injection for the masseter muscle hypertrophy. *J Cosmet Dermatol.* Oct 2018;17(5):675-87.
73. Lu DW, Lippitz J. Complications of botulinum neurotoxina. *Dis Mon.* Apr 2009;55(4):198-211.
74. Brin MF, Boodhoo TI, Pogoda JM, James LM, Demos G, Terashima Y, Gu J, Eadie N, Bowen BL. Safety and tolerability of onabotulinumtoxin in the treatment of facial lines: a metanalysis of individual patient data from global clinical registration studies in 1678 participants. *J AM Acad Dermatol.* Dec 2009;61(6):961-70.

75. Naumann M, Albanese A, Heinen F, Molenaers G, Relja M. Safety and efficacy of botulinum toxin type a following long-term use. *Eur J Neurol*. Dec 2006;13 Suppl 4:35-40.
76. Critchfield, J. Considering the immune response to botulinum toxin. *Clin J Pain*. Nov-Dec 2002; 18(6Suppl):133-41.
77. Kessler KR, Skutta M, Benecke R. Long term treatment of cervical dystonia with botulinum toxin A: efficacy, safety, and antibody frequency. *J Neurol*. Apr 1999;246(4):265-74.
78. Dutton, J. J. Botulinum A toxin in the treatment craniocervical muscle spasm: short and long term local and systemic effects. *Surv Ophthalmol*. Jul-Aug 1996;41(1):41-51.
79. Shinoda M, Kawashima K, Ozaki N, Asai H, Nagamine K, Sugiura Y. P2X (3) receptor mediates heat hyperalgesia in rat models of trigeminal neuropathic pain. *J Pain*. Jul 2007; Jul;8(7):588-97.
80. Barton NJ, Strickland IT, Bond SM, Brash HM, Bate ST, Wilson AW, Chessell IP, Reeve AJ, McQueen DS. Pressure application measurement (PAM): a novel behavioural technique for measuring hypersensitivity in a rat model of joint pain. *J Neurosci Methods*. Jun 2007;163(1):67-75.
81. Jensen K, Andersen HO, Olesen J, Lindblom U. Pressure-pain threshold in human temporal region. Evaluation of a new pressure algometer. *Pain*. Jun 1986;25(3):313-23.
82. Möller KA, Johansson B, Berge OG. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. *J Neurosci Methods*. Oct 1998;84(1-2):41-7.
83. Vivancos GG, Verri WA Jr, Cunha TM, Schivo IR, Parada CA, Cunha FQ, Ferreira SH. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz J Med Biol Res*. Mar 2004;37(3):391-9.
84. Cunha T M, Verri WA Jr, Vivancos GG, Moreira IF, Reis S, Parada CA, Cunha FQ, Ferreira SH. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz J Med Biol Res*. 2004; 37(3):401-7.
85. Takeda M, Tanimoto T, Ikeda M, Nasu M, Kadoi J, Shima Y, Ohta H, Matsumoto S. Temporomandibular joint inflammation potentiates the excitability of trigeminal root ganglion neurons innervating the facial skin in rats. *J Neurophysiol*. 2005 May;93(5):2723-38.
86. Guo W, Wang H, Watanabe M, Shimizu K, Zou S, LaGraize SC, Wei F, Dubner R, Ren K. Glial-cytokine-neuronal interactions underlying the mechanisms of persistent pain. *J Neurosci*. May 2007;27(22):6006-18.
87. Ambalavanar R, Moutanni A, Dessem D. Inflammation of craniofacial muscle induces widespread mechanical allodynia. *Neurosci Lett*. May 2006; 399(3): 249–54.
88. Radhakrishnan R, Moore SA, Sluka KA. Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain*. Aug 2003;104(3):567-77.
89. Chopade AR, Sayyad FJ, Naikwade NS. Pharmacological characterization of carrageenan induced heat muscle hyperalgesia in rats using non-selective,

- preferencial and selective COX-2 inhibitors, *Pharmacol Rep.* 2014; 66(3):353-62.
90. Guo BL, Zheng CX, Sui BD, Li YQ, Wang YY, Yang YL. A closer look to botulinum neurotoxin type A-induced analgesia. *Toxicon*, Sep 2013;71:134-9.
91. Kurtoglu C, Gur OH, Kurkcu M, Sertdemir Y, Guler-Uysal F, Uysal H.. Effect Of botulinum toxin-A in myofascial pain patients with or without functional disc displacement. *Journal of oral and maxillofacial surgery*.Aug. 2008;66(8):1644-5.
92. Ernberg M, Hedenberg-Magnusson B, List T, Svensson P. Efficacy of botulinum toxin type A for treatment of persistent myofascial TMD pain: a randomized, controlled, double-blind multicentre study. *Pain.* 2011;152(9):1988-96.
93. Chen YW, Chiu YW, Chen CY, Chuang SK. Botulinum toxin therapy for temporomandibular joint disorders: a systematic review of randomized controlled trials. *Int. J Oral Maxillofac Surg.* 2015; 44(8):1018-265.
94. Baker J, Nolan P. Effectiveness of botulinum toxin type A for the treatment of chronic masticatory myofascial pain. *J Am Dent Assoc.* 2017;148(1):33-9.
95. Bach-Rojeck L, Lackovic Z. Antinociceptive effect of botulinum toxin type a in rat modelo f carrageenan and capsaicin induced pain. *Croat Med J.* Apr 2005; 46(2): 201-8.
96. Bastos V. et al. *Cuidados e manejo de animais de laboratório.* São Paulo: Ed Atheneu; 2017.
97. Takahashi K, Taguchi T, Itoh K, Okada K, Kawakita K, Mizumura K. Influence of surface anesthesia on the pressure pain threshold measured with differentsized probes. *Somatosens Mot Res.* Dec 2005;22(4):299-305.
98. Albertini R, Villaverde A B, Aimbire F, Salgado M A C, Bjordal J M, Alves L P, Munin E, Costa M S. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. *Journal of photochemistry and photobiology B.* Nov 2007; 89 (1):50-5.
99. Carvalho C M, Lacerda JA, dos Santos Neto FP, de Castro IC, Ramos TA, de Lima FO, de Cerqueira Luz JG, Ramalho MJ, dos Santos JN, Pinheiro AL. Evaluation of laser phototherapy in the inflammatory process of the rat's tmj induced by carrageenan. *Photomedicine and Laser Surgery.* Apr 2011;29(4): 245-54.
100. Bagüés A, Martin-Fontelles M I, Esteban-Hernandez J, Sánchez-Robles E M. Characterization of the nociceptive effect of carrageenan: Masseter versus gastrocnemius. *Muscle & Nerve.* 2017; 56(4):804-13.
101. Drinovac Vlah V, Filipović B, Bach-Rojecky L, Lacković Z. Role of central versus peripheral opioid system in antinociceptive and anti-inflammatory effect of botulinum toxin type A in trigeminal region. *European Journal of Pain.* Mar 2018;22(3):583-91.
102. Fletcher D, Kayser V, Guilbaud G. Influence of timing on the analgesic effect of bupivacaine and epinephrine infiltration in carrageenan injected rats. *Anaesthesiology,* May 1996;84(5):1129-37.
103. Di Rosa, M.; Giroud, J. P.; Willoughby, D. A. Studies of the mediators of the

acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J. Pathol.* 1971; 104:15–29.

104. Necas J, Bartosikova L. Carrageenan: a review. *Veterinari Medicina.* 2013;58(4):187-205.

105. Poveda Roda R, Bagán JV, Jiménez Soriano Y, Gallud Romero L. Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs in dental practice. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* Jan 2007; 12(1):E10-8.

106. Morris, Christopher J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. In: Winyard, Paul G.; Willoughby, Derek A. *Inflammation protocols.* Totowa, NJ: Humana Press, 2013; p. 115-21.

107. Otterness IG, Wiseman EH, Gans DJ. A comparison of the carrageenan edema test and the ultraviolet light-induced erythema test as predictors of the clinical dose in rheumatoid arthritis. *Agents Actions.* Jun 1979 Jun;9(2):177-83.

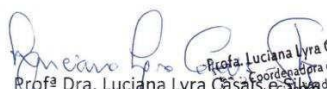
ANEXO 1 - CERTIFICADO



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Efeitos da Toxina Botulínica A em masseteres de ratos em modelo experimental de dor inflamatória”, registrada com o nº 133/2018, sob a responsabilidade do prof. Dr. Marcio Cajazeira Aguiar - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), 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 DO Instituto de Ciências da saúde (CEUA-ICS), em reunião de 11/05/2018.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/07/2018 – 01/07/2020
Espécie/linhagem/raça	<u>Rattus norvegicus</u> (Wistar)
Número de animais	83
Peso/Idade	200 g (2 meses)
Sexo	Machos
Origem	SUPRILAB (Cachoeira/Bahia)


 Prof. Dra. Luciana Lyra Casais e Silva
 Coordenadora da CEUA-ICS
 Instituto de Ciências da Saúde - UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



TERMO DE APROVAÇÃO
DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO

ILANA DANTAS NEVES

**EFEITOS DA TOXINA BOTULÍNICA A EM MASSETERES DE RATOS EM MODELO
EXPERIMENTAL DE DOR INFLAMATÓRIA**

Salvador, Bahia, 20 de dezembro de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA:



PROF. DR. MARCIO CAJAZEIRA AGUIAR (Universidade Federal da Bahia)



PROFA. DRA. GISELE GRAÇA LEITE DOS SANTOS (Faculdade de Tecnologia e Ciências)



PROFA. DRA. TATIANE DE OLIVEIRA TELXEIRA (Universidade Federal da Bahia)