



Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
= MESTRADO e DOUTORADO =

PARECER

Aos treze dias do mês de março do ano de dois mil e dez, a banca examinadora constituída pelos Professores Doutores **Maurice Borges Vincent, Valéria Paula Sassoli Fazan, Juliana Geremias Chichorro, Rosana Hermínia Scola e Lincú Cesar Werneck**, exarou o presente parecer sobre a tese elaborada por **Elcio Juliato Piovesan**, aluno concluinte do **Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde – Mestrado e Doutorado**, da **Universidade Federal do Paraná**, intitulada: “EFEITO DA TOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A SOBRE A NOCICEPÇÃO TRIGEMINAL”. A Banca examinadora considerou que Elcio Juliato Piovesan, apresentou trabalho adequado para tese e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, de modo a merecer a sua **aprovação**, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Doutor em Medicina Interna** e a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.

Curitiba, 13 de março de 2010.

Dr. Maurice Borges Vincent

Dra Valéria Paula Sassoli Fazan

Dra Juliana Geremias Chichorro

Dra Rosana Hermínia Scola

Dr. Lincú Cesar Werneck

ELCIO JULIATO PIOVESAN

Efeito da Toxina Botulínica Tipo-A Sobre Um Modelo de Nocicepção Trigeminal

**Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-
Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Paraná.**

Orientador. Prof. Dr. Lineu César Werneck

Curitiba

2010

DEDICATORIA

Aos meus familiares e aos que me
Inspiraram a arte da Medicina.

AGRADECIMENTOS

- Gostaria de agradecer a minha esposa Liciane e minha filha Sarah Vicktoria que souberam dividir o nosso tempo para que este trabalho fosse concluído.
- Aos meus pais e irmãs que me deram e ensinaram os principais valores da vida.
- Ao meu mestre, orientador e disciplinador que me deu a oportunidade para me espelhar como um Neurologista, Neurocientista, Professor Doutor Lineu César Werneck.
- Nos momentos difíceis desta caminhada a ajuda, orientação, apoio e o incentivo desmedido da Professora Doutora Rosana Herminia Scola.
- Ao Professor Doutor Hélio Ghizoni Teive pela oportunidade e pelo seu empenho em meu aprendizado no ambulatório de toxina botulínica, bem como seu auxílio logístico na utilização da toxina botulínica neste estudo.
- Especial agradecimento ao colega Eduardo Manoel Pereira, pelo auxílio na padronização dos métodos utilizados neste estudo.
- Ao Doutor Pedro André Kowacs, pelos seus ensinamentos, auxílio e apoio na arte do manejo das cefaléias.
- Ao professor Doutor Rogério Andrade Mulinari que incansavelmente participou auxiliando diretamente e indiretamente o meu trabalho no Laboratório Experimental do Setor de Ciências da Saúde.
- Ao professor Doutor Édison Matos Novak por sempre me amparou nos momentos difíceis me ensinando os caminhos a serem percorridos.
- Aos Doutores Victor Hugo Radünz, Marco Antonio Takashi Utiumi, Éder Barbosa Muranaka, que desenvolveram seus estágios de iniciação científica neste trabalho..
- Ao meu amigo e acadêmico de iniciação científica Lucas Leite e Silva que sempre esteve de forma capaz e incansável ao meu lado durante todos os experimentos deste estudo.
- Ao Sr. Jair José de Lima que me auxiliou diretamente durante todos os experimentos.
- A aluna de biologia e laboratorista Nyvea Milicio Coblinski Hrysay por ter participado ativamente durante todos os processos de análises e preparos dos fármacos.

- Aos professores e doutores Claudio da Cunha, Célia Regina Cavichiolo Franco, Edvaldo da Silva Trindade, Maria Aparecida Barbato Frazão Vital, Anete Curte Ferraz, Roberto Andreatini e Aleksander Roberto Zampronio pelo apoio na metodologia deste estudo.
- Ao Sr. Cândido José Thomaz Pereira e ao Sr. Antonio Luiz de Andrade. Pelo auxílio na aquisição e manutenção dos animais para a realização deste estudo.
- A Sra. Eunice Rechetelo e ao professor Doutor Rogério Lange, pelo auxílio no preparo e na aquisição de anestésicos utilizados neste estudo.
- Aos professores que me auxiliaram durante minha formação acadêmica: Carlos Eduardo Silvado; Duilton de Paola; Luciano de Paola; Walter Oleshko Arruda; Viviane F. Zétola; Mauro Piovezan; Sergio Monteiro de Almeida; João Gastão Rocha de Carvalho; Ehrenfield Othmar Wittig; Isac Bruck.
- Aos meus colegas neurologista, residentes e funcionários do serviço de neurologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.
 - Ao meu tio Dr. João Renato Piovesan, pelas sugestões e padronização desta tese.
 - As secretárias Valéria Knapp, Lúcia Lemiszka e Deise Cunha Santos pelo apoio durante a elaboração desta tese.

ÍNDICE GERAL

| | | |
|-------------|--|------------|
| 1. | Introdução | 001 |
| 1.1 | Conceitos Básicos | 002 |
| 1.1.1 | Núcleos do Trigêmeo | 006 |
| 1.1.1.1 | Núcleo Sensitivo Mesencefálico do Trigêmeo | 006 |
| 1.1.1.2 | Núcleo Sensorial Principal do Trigêmeo | 006 |
| 1.1.1.3 | Núcleo Espinhal do Trigêmeo | 009 |
| 1.1.1.3.1 | Núcleo Espinhal Caudal do Trigêmeo | 009 |
| 1.1.1.3.1.1 | Conecções Aferentes Para o Subnúcleo Espinhal Caudal do Trigêmeo | 009 |
| 1.1.3.1.1 | Conecções Eferentes do Subnúcleo Espinhal Caudal do Trigêmeo | 013 |
| 1.1.2 | Neuroanatomia Nociceptiva das Vibrissas | 013 |
| 1.1.3 | Neuralgia do Trigêmeo | 019 |
| 1.1.4 | Neuralgia do Trigêmeo e Modelos Experimentais | 021 |
| 1.1.5 | Fisiopatologia da Dor Neuropática e Neuralgia do Trigêmeo | 023 |
| 1.2 | Toxina Botulínica | 025 |
| 1.2.1 | História da Toxina Botulínica | 025 |
| 1.2.2 | Microbiologia da Toxina Botulínica | 027 |
| 1.2.3 | Toxina Botulínica e Neurotransmissores | 029 |
| 1.2.4 | Indicações Médicas da Toxina Botulínica | 030 |
| 1.2.5 | O Efeito Antinociceptivo da Toxina Botulínica | 030 |
| 1.2.5.1 | Receptores Vanilóides (TRPV1) e Toxina Botulínica | 030 |
| 1.2.5.2 | Expressão do TRPV1 no Sistema Nociceptivo Trigeminal | 032 |
| 1.3 | Teste da Formalina (TF) | 033 |
| 1.3.1 | Conceitos Básicos | 033 |
| 1.3.2 | Formalina, Substância P e Alterações de seus Receptores | 037 |
| 1.3.3 | Toxina Botulínica e Teste da Formalina | 038 |
| 1.3.4 | Toxina Botulínica – Glutamato e Teste da Formalina | 039 |
| 1.4 | Teste da Constrição do Nervo Infra-Orbital | 040 |
| 1.4.1 | Considerações | 040 |
| 1.4.2 | Fisiopatologia da Hipernocicepção Térmica | 041 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 1.4.3 | Padrão Comportamental do Teste do – 20 graus em Animais Submetidos à Constricção do Nervo Infra-orbital. | 044 |
| 1.5 | Evidências Clínicas da Utilização da Toxina Botulínica no Controle das Síndromes Dolorosas | 044 |
| 1.5.1 | Migrânea (Enxaqueca) | 044 |
| 1.5.2 | Cefaléia Crônica e Diária e Toxina Botulínica | 045 |
| 1.5.3 | Toxina Botulínica e Outras Síndromes Dolorosas Crônicas | 046 |
| 1.5.4 | Toxina Botulínica e Neuralgia do Trigêmeo | 046 |
| 1.6 | Considerações Finais | 046 |
| 2. | Objetivos | 048 |
| 3. | Material e Métodos | 050 |
| 3.1 | Introdução | 051 |
| 3.2 | Animais, microambiente, macro ambiente e condições nutricionais. | 051 |
| 3.3 | Origem e Admissão dos Animais | 052 |
| 3.4 | FASE 1 – Modelo Experimental de Dor Aguda | 052 |
| 3.4.1 | Randomização dos Animais | 052 |
| 3.4.2 | Etapas e Modelo de Estudo | 052 |
| 3.4.3 | Períodos Run-In | 053 |
| 3.4.4 | Drogas Utilizadas e Técnicas de Inoculação | 055 |
| 3.4.4.1 | Neurotoxina Botulínica do Tipo-A, Solução Salina Isotônica 0,9%. | 055 |
| 3.4.4.2 | Formalina 2,5% | 056 |
| 3.4.5 | Avaliação da Variação do Peso | 056 |
| 3.4.6 | Comportamento Motor e Atividade Exploratória (Teste do Campo Aberto) | 057 |
| 3.4.6.1 | Parâmetros Avaliados no Teste do Campo Aberto | 058 |
| 3.4.7 | Teste da Formalina 2,5% | 059 |
| 3.4.7.1 | Técnica de Aplicação da Formalina 2,5% (FO) | 060 |
| 3.4.7.2 | Parâmetros Avaliados durante o Teste da Formalina (TF) | 060 |
| 3.4.8 | Teste do Labirinto em Cruz Elevada | 061 |
| 3.4.9 | Teste da Exploração do Campo Claro versus Escuro | 064 |
| 3.4.10 | Efeitos Colaterais | 066 |
| 3.4.11 | Eutanásia | 066 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 3.4.12 | Testes Estatísticos | 066 |
| 3.5 | FASE 2 – Modelo Experimental de Dor Crônica – Constricção do Nervo Infra-orbital | 067 |
| 3.5.1 | Randomização dos Animais | 067 |
| 3.5.2 | Etapas e Modelo de Estudo. | 067 |
| 3.5.3 | Determinação do Limiar Nociceptivo Térmico (Teste do – 20 ⁰ C) | 068 |
| 3.5.4 | Anestesia dos Animais | 070 |
| 3.5.5 | Estudo da Anatomia do Nervo Infra-orbital | 070 |
| 3.5.6 | Exposição do Nervo Infra-orbital | 071 |
| 3.5.7 | Constricção do Nervo Infra-orbital | 072 |
| 3.5.8 | Avaliação da Hipernocicepção ao Frio (Teste do -20 ⁰ C) | 073 |
| 3.5.9 | Randomização dos Animais após Hipernocicepção | 074 |
| 3.5.10 | Teste do – 20 graus após o Tratamento Farmacológico | 074 |
| 3.5.11 | Testes Estatísticos | 074 |
| 3.6 | Comitê de Ética em Animais | 075 |
| 4. | Resultados | 076 |
| 4.1 | PRIMEIRA FASE DO ESTUDO. | 077 |
| 4.1.1 | Peso | 077 |
| 4.1.1.1 | Avaliação do Peso nos Diferentes Momentos do Estudo | 077 |
| 4.1.1.2 | Porcentagem de Variação do Peso nos Diferentes Momentos do Estudo | 077 |
| 4.1.2 | Unidades e Volume dos Fármacos Administrados | 078 |
| 4.1.3 | Teste do Campo Aberto (TCA) | 078 |
| 4.1.3.1 | Latência | 078 |
| 4.1.3.1.1 | Latência Após o Primeiro Bloqueio | 078 |
| 4.1.3.1.2 | Latência Após o Segundo Bloqueio | 079 |
| 4.1.3.2 | Número de Casas Andadas | 079 |
| 4.1.3.3 | Número de Levantamentos | 079 |
| 4.1.3.4 | Tempo de Imobilidade | 079 |
| 4.1.3.5 | Variação do Campo Aberto Durante o Primeiro versus o Segundo Bloqueios. | 080 |
| 4.1.3.6 | Análise Geral dos Resultados do Campo Aberto | 082 |
| 4.1.4 | Teste da Formalina 2,5% | 082 |
| 4.1.4.1 | Análise Descritiva do TF Após o Primeiro e Segundo Tratamentos | 082 |
| 4.1.4.2 | Análise Estatística Comparativa do TF 2,5% Fase Neurogênica | 083 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| 4.1.4.3 | Análise Estatística Comparativa do Teste da Formalina 2,5% - Fase Inflamatória. | 083 |
| 4.1.4.4 | Análise Geral dos Resultados do Teste da Formalina 2,5% | 084 |
| 4.1.5 | Teste do Labirinto em Cruz Elevada (TCE) | 084 |
| 4.1.5.1 | Resultados Descritivos | 084 |
| 4.1.5.2 | Análise Comparativa do Teste da Cruz Elevada. | 085 |
| 4.1.5.2.1 | Latência | 085 |
| 4.1.5.2.2 | Porcentagem de Entradas no Braço Aberto (%EBA). | 085 |
| 4.1.5.2.3 | Porcentagem de Entradas no Braço Fechado (%EBF). | 085 |
| 4.1.5.2.4 | Porcentagem de Tempo no Braço Aberto (%TBA). | 085 |
| 4.1.5.2.5 | Porcentagem de Tempo no Braço Fechado (%TBF). | 086 |
| 4.1.5.2.6 | Porcentagem de Tempo no Campo Neutro "Central" (%TCN). | 086 |
| 4.1.5.2.7 | Número de Quedas (NQ). | 087 |
| 4.1.5.3 | Análise Global do Teste do Teste do Labirinto em Cruz Elevada. | 087 |
| 4.1.5.4 | Análise Geral dos Resultados do Teste do Labirinto em Cruz Elevada (TCE) | 087 |
| 4.1.6 | Teste do Campo Claro versus Campo Escuro. | 088 |
| 4.1.6.1 | Resultados Descritivos. | 088 |
| 4.1.6.2 | Análise Comparativa do Teste do TCCVE | 088 |
| 4.1.6.2.1 | Latência | 088 |
| 4.1.6.2.2 | Número de Entradas no Campo Escuro | 088 |
| 4.1.6.2.3 | Tempo Despendido Dentro do Campo Escuro (TCE) | 088 |
| 4.1.6.2.4 | Tempo Despendido Dentro do Campo Claro (TCC) | 088 |
| 4.1.6.3 | Avaliação Descritiva e Comparativa Global do Teste do Campo Claro versus Escuro | 089 |
| 4.1.6.4 | Análise Geral dos Resultados do Teste do Campo Claro versus Escuro (TCCE) | 089 |
| 4.2 | SEGUNDA FASE DO ESTUDO | 089 |
| 4.2.1 | Teste do – 20 ^o C, Fase Basal do Estudo. | 089 |
| 4.2.1.1 | Randomização | 089 |
| 4.2.2 | Análise Descritiva do Peso | 090 |
| 4.2.3 | Volume e Unidades de NTBo-A aplicados nos Animais | 090 |
| 4.2.4 | Randomização Após Cirurgia | 090 |
| 4.2.5 | Hipernocicepção Térmica | 090 |
| 4.3 | Efeitos Colaterais | 091 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 4.3.1 | Fase I do Estudo | 091 |
| 4.3.2 | Fase II do Estudo | 092 |
| 5. | Discussão | 093 |
| 5.1 | Efeito Antinociceptivo da NTBo-A | 094 |
| 5.1.1 | Efeito antinociceptivo profilático da NTBo-A “evidências Clínicas” | 094 |
| 5.1.2 | Efeito antinociceptivo profilático da NTBo-A “evidências Pré-Clínicas” | 094 |
| 5.1.3 | Efeito antinociceptivo profilático da NTBo-A “correlação clínico laboratorial”. | 094 |
| 5.2 | Efeito Analgésico da NTBo-A | 096 |
| 5.2.1 | Efeito Antinociceptivo Analgésico da NTBo-A “Evidências Clínicas”. | 096 |
| 5.2.2 | Efeito Antinociceptivo Analgésico da NTBo-A “Evidências Pré-Clinicas”. | 098 |
| 5.2.3 | Efeito Antinociceptivo Analgésico da NTBo-A “Correlação Clínico Laboratorial”. | 099 |
| 5.3 | Efeito Motor da NTBo-A na Fase 1. | 100 |
| 5.3.1 | Teste do Campo Aberto. | 100 |
| 5.4 | Varição dos Resultados do Campo Aberto no Primeiro e Segundo Momentos do Estudo Durante a Fase 1. | 101 |
| 5.5 | Testes de Avaliação Comportamental a Ansiedade | 102 |
| 5.5.1 | Teste do Labirinto em Cruz Elevada | 102 |
| 5.6 | Efeitos Colaterais da NTBo-A | 103 |
| 6. | Conclusões | 104 |
| 7. | Referências | 106 |
| 8. | Anexos | 142 |

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|----|--|-----|
| 01 | Distribuição Cutânea do Nervo Trigêmeo e Nervos Cervicais Adjacentes | 04 |
| 02 | Núcleo Sensitivo Mesencefálico do Trigêmeo (NM) | 07 |
| 03 | Núcleo Sensitivo Principal do Trigêmeo (NPT) | 08 |
| 04 | Núcleo Caudal Espinhal do Trigêmeo e Mecanismos de Aferência | 10 |
| 05 | Distribuição Somatotópica da Sensibilidade Térmico e Dolorosa em Casca de Cébola e sua Distribuição para o Núcleo Espinhal do Trigêmeo | 11 |
| 06 | Identificação do Aparato Vibrissa | 14 |
| 07 | Via Lemniscal de Excitabilidade Cortical a partir da deflecção das vibrissas | 17 |
| 08 | Via Paralemniscal de Excitabilidade Cortical a partir da deflecção das vibrissas | 18 |
| 09 | Anatomia do Nervo Infra-orbital e sua Distribuição Somatotópica | 22 |
| 10 | Formação do Complexo SNARE | 028 |
| 11 | Interiorização da Neurotoxina Botulínica e seu Efeito Inibidor. | 029 |
| 12 | Mecanismos envolvidos na expressão dos receptores do TRPV1 em resposta a estímulos nociceptivos | 31 |
| 13 | Ação da NTBo-A sobre a expressão dos receptores TRPV1 | 32 |
| 14 | Local de injeção da formalina e respostas comportamentais bifásica do animal | 34 |
| 15 | Teste da formalina: 1- Inoculação da formalina com lesão tecidual | 35 |
| 16 | Mecanismos envolvidos na neuromodulação | 37 |

| | | |
|----|---|----|
| | nociceptiva ao nível do cordão dorsal espinhal | |
| 17 | Teste da formalina e efeito da NTBo-A. Resumo dos principais mecanismos neurofisiológicos relacionados ao efeito da NTBo-A sobre a nocicepção | 39 |
| 18 | Fluxograma do tempo e das etapas da primeira fase do estudo | 54 |
| 19 | Técnica para imobilização do animal e local da inoculação da droga | 55 |
| 20 | Aparato para Avaliação do Teste do Campo Aberto, distribuição da arena e diâmetros | 57 |
| 21 | Teste do campo aberto | 58 |
| 22 | Teste da Formalina 2.5% | 60 |
| 23 | Teste do Labirinto em Cruz Elevada | 62 |
| 24 | Teste do Labirinto em Cruz Elevada | 63 |
| 25 | Teste do campo claro versus escuro | 65 |
| 26 | Teste do campo claro versus escuro | 66 |
| 27 | Fluxograma dos testes realizados na Fase II | 69 |
| 28 | Teste da estimulação térmica ao frio | 70 |
| 29 | Anatomia do nervo infra-orbital | 71 |
| 30 | Fases para a exposição do nervo infra-orbital | 72 |
| 31 | Constricção do nervo infra-orbital | 73 |
| 32 | Animal com Efeito Colateral | 92 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | | |
|----|---|----|
| 01 | Latência para início dos movimentos dentro do campo aberto | 79 |
| 02 | Teste do Campo Aberto – Número de casas andadas antes do primeiro tratamento versus antes do segundo tratamento | 81 |
| 03 | Teste do Campo Aberto – Levantamentos antes do primeiro tratamento versus antes do segundo tratamento | 81 |
| 04 | Teste do Campo Aberto – Tempo de Imobilidade antes do primeiro tratamento versus antes do segundo tratamento | 82 |
| 05 | Teste da Formalina 2,5% – Fase Inflamatória | 84 |
| 06 | Teste do Labirinto em Cruz Elevada – % de Tempo no Braço Aberto | 86 |
| 07 | Teste do Labirinto em Cruz Elevada – % de Tempo no Campo Neutro | 87 |
| 08 | Efeito do tratamento sobre o nervo infra-orbital na hipernocicepção ao frio (-20°C). | 91 |
| 09 | Efeito de todos os tratamentos sobre o nervo infra-orbital na hipernocicepção ao frio (-20°C) | 91 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | | |
|----|--|-----|
| 01 | CARACTERÍSTICAS DO ALIMENTO FORNECIDO AOS ANIMAIS | 143 |
| 02 | FORMAÇÃO DO MÚSCULO TRAPÉZIO, INSERÇÕES, ORIGENS, INERVAÇÃO SENSITIVA E MOTORA. | 144 |
| 03 | REGISTRO DA PESQUISA NO BANPESQ | 145 |
| 04 | CARTA DE APROVAÇÃO DO ESTUDO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE | 146 |
| 05 | PESO NO GRUPO NTBO-A, ANTES DO PRIMEIRO TRATAMENTO (T=1), ANTES DO SEGUNDO TRATAMENTO (T=2) E AO FINAL DO ESTUDO (T=3) | 147 |
| 06 | PESO NO GRUPO SSI, ANTES DO PRIMEIRO TRATAMENTO (T=1), ANTES DO SEGUNDO TRATAMENTO (T=2) E AO FINAL DO ESTUDO (T=3) | 148 |
| 07 | ORCENTAGEM DE VARIAÇÃO DO GANHO DE PESO NOS DIFERENTES MOMENTOS DO ESTUDO GRUPO NTBO-A | 149 |
| 08 | PORCENTAGEM DE VARIAÇÃO DE GANHO DE PESO NOS DIFERENTES MOMENTOS DO ESTUDO GRUPO SSI. ANTES DO PRIMEIRO TRATAMENTO (T=1), ANTES DO SEGUNDO TRATAMENTO (T=2) E AO FINAL DO ESTUDO (T=3) | 150 |
| 09 | ANALISE DESCRITIVA E COMPARATIVA DO PESO SEGUNDO OS DIFERENTES MOMENTOS | 151 |
| 10 | VALOR EM UNIDADES DE NTBO-A E VOLUME DOS FÁRMACOS ADMINISTRADOS NOS SUBGRUPOS DOS GRUPOS NTBO-A E SSI (DURANTE O PRIMEIRO TRATAMENTO | 152 |
| 11 | VALOR EM UNIDADES DE NTBO-A E VOLUME DOS FÁRMACOS ADMINISTRADOS NOS SUBGRUPOS DOS GRUPOS NTBO-A E SSI (DURANTE O SEGUNDO TRATAMENTO | 153 |
| 12 | ANALISE ESTATÍSTICA DESCRITIVA E COMPARATIVA DO NÚMERO DE UNIDADES E VOLUME APLICADOS NOS DIFERENTES GRUPOS E SUBGRUPOS DO ESTUDO | 154 |
| 13 | RESULTADOS DO TESTE DO CAMPO ABERTO PARA O GRUPO NTBO-A, APÓS O PRIMEIRO TRATAMENTO | 155 |
| 14 | RESULTADOS DO TESTE DO CAMPO ABERTO PARA O GRUPO SSI, APÓS O PRIMEIRO TRATAMENTO | 156 |

| | | |
|----|--|-----|
| 15 | RESULTADOS DO TESTE DO CAMPO ABERTO PARA O GRUPO NTBO- A, APÓS O SEGUNDO TRATAMENTO | 157 |
| 16 | RESULTADOS DO TESTE DO CAMPO ABERTO PARA O GRUPO SSI, APÓS O PRIMEIRO TRATAMENTO | 158 |
| 17 | ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA PARA O TESTE DO CAMPO ABERTO - LATÊNCIA APÓS O PRIMEIRO BLOQUEIO NOS DIFERENTES GRUPOS E SUBGRUPOS | 159 |
| 18 | ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA PARA O TESTE DO CAMPO ABERTO - LATÊNCIA APÓS O SEGUNDO BLOQUEIO NOS DIFERENTES GRUPOS E SUBGRUPOS | 160 |
| 19 | ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA PARA O TESTE DO CAMPO ABERTO - LATÊNCIA APÓS O SEGUNDO BLOQUEIO NOS DIFERENTES GRUPOS E SUBGRUPOS | 161 |
| 20 | ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA PARA O TESTE DO CAMPO ABERTO – NÚMERO DE CASAS ANDADAS APÓS O SEGUNDO BLOQUEIO NOS DIFERENTES GRUPOS E SUBGRUPOS | 162 |
| 21 | ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA PARA O TESTE DO CAMPO ABERTO – NÚMERO DE LEVANTAMENTOS APÓS O PRIMEIRO BLOQUEIO NOS DIFERENTES GRUPOS E SUBGRUPOS | 163 |
| 22 | ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA PARA O TESTE DO CAMPO ABERTO – NÚMERO DE LEVANTAMENTOS APÓS O SEGUNDO BLOQUEIO NOS DIFERENTES GRUPOS E SUBGRUPOS | 164 |
| 23 | ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA PARA O TESTE DO CAMPO ABERTO – TEMPO DE IMOBILIDADE APÓS O PRIMEIRO BLOQUEIO NOS DIFERENTES GRUPOS E SUBGRUPOS | 165 |
| 24 | ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA PARA O TESTE DO CAMPO ABERTO – TEMPO DE IMOBILIDADE APÓS O SEGUNDO BLOQUEIO NOS DIFERENTES GRUPOS E SUBGRUPOS. | 166 |
| 25 | TESTE DO CAMPO ABERTO – LATÊNCIA. COMPARAÇÃO DOS SUBGRUPOS NOS DIFERENTES GRUPOS ANTES DO PRIMEIRO VERSUS SEGUNDO TESTE DA FORMALINA (TF) | 167 |
| 26 | TESTE DO CAMPO ABERTO – CASAS ANDADAS. COMPARAÇÃO DOS SUBGRUPOS NOS DIFERENTES GRUPOS ANTES DO PRIMEIRO VERSUS SEGUNDO TESTE DA FORMALINA (TF) | 168 |
| 27 | TESTE DO CAMPO ABERTO – LEVANTAMENTOS. COMPARAÇÃO DOS SUBGRUPOS NOS DIFERENTES GRUPOS ANTES DO PRIMEIRO VERSUS SEGUNDO TESTE DA FORMALINA (TF) | 169 |

| | | |
|----|---|-----|
| 28 | 28- TESTE DO CAMPO ABERTO – TEMPO DE IMOBILIDADE. COMPARAÇÃO DOS SUBGRUPOS NOS DIFERENTES GRUPOS ANTES DO PRIMEIRO VERSUS SEGUNDO TESTE DA FORMALINA (TF) | 170 |
| 29 | RESULTADOS DO TESTE DA FORMALINA APÓS O PRIMEIRO TRATAMENTO NOS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBO-A. | |
| 30 | RESULTADOS DO TESTE DA FORMALINA APÓS O SEGUNDO TRATAMENTO NOS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBO-A | 172 |
| 31 | RESULTADOS DO TESTE DA FORMALINA APÓS O PRIMEIRO TRATAMENTO NOS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO SSI | 173 |
| 32 | RESULTADOS DO TESTE DA FORMALINA APÓS O SEGUNDO TRATAMENTO NOS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO SSI. | 174 |
| 33 | RESULTADOS NOS DIFERENTES SUBGRUPOS PARA AS FASES NEUROGÊNICA E INFLAMATÓRIA APÓS O PRIMEIRO TRATAMENTO NOS GRUPOS NTBO-A E SSI | 175 |
| 34 | RESULTADOS NOS DIFERENTES SUBGRUPOS PARA AS FASES NEUROGÊNICA E INFLAMATÓRIA APÓS O SEGUNDO TRATAMENTO NOS GRUPOS NTBO-A E SSI | 176 |
| 35 | ANALISE DESCRITIVA E COMPARATIVA DO TESTE DE FORMALINA 2.5% NOS SUBGRUPOS DO GRUPO NTBO-A E SSI PARA FASE NEUROGÊNICA APÓS O PRIMEIRO TRATAMENTO | 177 |
| 36 | ANALISE DESCRITIVA E COMPARATIVA DO TESTE DE FORMALINA 2.5% NOS SUBGRUPOS DO GRUPO NTBO-A E SSI PARA FASE NEUROGÊNICA APÓS O SEGUNDO TRATAMENTO | 178 |
| 37 | ANALISE DESCRITIVA E COMPARATIVA DO TESTE DA FORMALINA 2,5% NOS SUBGRUPOS DO GRUPO NTBO-A E SSI. FASE INFLAMATÓRIA APÓS O PRIMEIRO TRATAMENTO | 179 |
| 38 | ANALISE DESCRITIVA E COMPARATIVA DO TESTE DA FORMALINA 2,5% NOS SUBGRUPOS DO GRUPO NTBO-A E SSI. FASE INFLAMATÓRIA APÓS O SEGUNDO TRATAMENTO | 180 |
| 39 | RESULTADOS DO TESTE DA CRUZ ELEVADA PARA O GRUPO NTBO-A NOS SEUS DIVERSOS SUBGRUPOS | 181 |
| 40 | RESULTADOS DO TESTE DA CRUZ ELEVADA PARA O GRUPO SSI NOS SEUS DIVERSOS SUBGRUPOS | 182 |
| 41 | TESTE DA CRUZ ELEVADA DADOS DESCRITIVOS DOS DIFERENTES SUBGRUPOS PARA O GRUPO NTBO-A | 183 |
| 42 | TESTE DA CRUZ ELEVADA DADOS DESCRITIVOS DOS DIFERENTES SUBGRUPOS PARA O GRUPO SSI. | 184 |

| | | |
|----|--|-----|
| 43 | ANALISE DESCRITIVA E COMPARATIVA ENTRE OS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBO-A E SSI. TESTE DA CRUZ ELEVADA – LATÊNCIA. | 185 |
| 44 | ANALISE DESCRITIVA E COMPARATIVA ENTRE OS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBO-A E SSI. TESTE DA CRUZ ELEVADA - PORCENTAGEM DE ENTRADAS NO BRAÇO ABERTO | 186 |
| 45 | ANALISE DESCRITIVA E COMPARATIVA ENTRE OS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBO-A E SSI. TESTE DA CRUZ ELEVADA - PORCENTAGEM DE ENTRADAS NO BRAÇO FECHADO | 187 |
| 46 | ANALISE DESCRITIVA E COMPARATIVA ENTRE OS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBO-A E SSI. TESTE DA CRUZ ELEVADA - PORCENTAGEM DE TEMPO NO BRAÇO ABERTO | 188 |
| 47 | ANALISE DESCRITIVA E COMPARATIVA ENTRE OS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBO-A E SSI. TESTE DA CRUZ ELEVADA - PORCENTAGEM DE TEMPO NO BRAÇO FECHADO | 189 |
| 48 | ANALISE DESCRITIVA E COMPARATIVA ENTRE OS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBO-A E SSI. TESTE DA CRUZ ELEVADA - PORCENTAGEM DE TEMPO NO CAMPO NEUTRO | 190 |
| 49 | ANALISE DESCRITIVA E COMPARATIVA ENTRE OS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBO-A E SSI. TESTE DA CRUZ ELEVADA - NÚMERO DE QUEDAS | 191 |
| 50 | ANALISE ESTATÍSTICA DESCRITIVA E COMPARATIVA GLOBAL (POR GRUPO) DO TESTE DA CRUZ ELEVADA PARA TODAS AS VARIÁVEIS ESTUDADAS | 192 |
| 51 | ANÁLISE DESCRITIVA DO TESTE DO CAMPO CLARO VERSUS ESCURO NOS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBO-A PARA LATÊNCIA, TEMPO NO CAMPO ESCURO E TEMPO NO CAMPO CLARO. | 193 |
| 52 | ANÁLISE DESCRITIVA DO TESTE DO CAMPO CLARO VERSUS ESCURO NOS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO SSI PARA LATÊNCIA, TEMPO NO CAMPO ESCURO E TEMPO NO CAMPO CLARO. | 194 |
| 53 | ANALISE DESCRITIVA E COMPARATIVA ENTRE OS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBO-A E SSI. TESTE DO CAMPO CLARO VERSUS ESCURO – LATÊNCIA PARA A ENTRADA NO CAMPO ESCURO | 195 |
| 54 | ANALISE DESCRITIVA E COMPARATIVA ENTRE OS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBO-A E SSI. TESTE DO CAMPO CLARO VERSUS ESCURO – ENTRADAS NO CAMPO ESCURO. | 196 |

| | | |
|----|---|-----|
| 55 | ANALISE DESCRITIVA E COMPARATIVA ENTRE OS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBO-A E SSI. TESTE DO CAMPO CLARO VERSUS ESCURO – TEMPO DESPENDIDO NO CAMPO ESCURO | 197 |
| 56 | ANALISE DESCRITIVA E COMPARATIVA ENTRE OS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBO-A E SSI. TESTE DO CAMPO CLARO VERSUS ESCURO – TEMPO DESPENDIDO DENTRO DO CAMPO CLARO | 198 |
| 57 | ANALISE DESCRITIVA E COMPARATIVA GLOBAL DO TESTE DO CAMPO CLARO VERSUS ESCURO PARA TODAS AS VARIÁVEIS ESTUDADAS | 199 |
| 58 | RANDOMIZAÇÃO DOS ANIMAIS DURANTE A SEGUNDA FASE DO ESTUDO SEGUNDO OS RESULTADOS DO TESTE DO -200C. | 200 |
| 59 | ANDOMIZAÇÃO DOS ANIMAIS DURANTE A SEGUNDA FASE DO ESTUDO SEGUNDO OS RESULTADOS DO TESTE DO -200C | 201 |
| 60 | PESO DOS ANIMAIS NOS DIFERENTES MOMENTOS DA SEGUNDA FASE DO ESTUDO. VOLUME DE DROGA (NTBO-A E SSI) E NÚMERO DE UNIDADES DA NTBO-A APLICADAS | 202 |
| 61 | VARIAÇÃO DO PESO NOS DIFERENTES GRUPOS DURANTE AS DIFERENTES ETAPAS NA SEGUNDA FASE DO ESTUDO | 203 |
| 62 | ANALISE DESCRITIVA E COMPARATIVA DO PESO ENTRE OS DIFERENTES GRUPOS NOS DIFERENTES MOMENTOS DO ESTUDO | 204 |
| 62 | TESTE DO – 200C PARA OS ANIMAIS SUBMETIDOS À CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRA-ORBITAL E TRATADOS COM NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A | 205 |
| 64 | TESTE DO – 200C PARA OS ANIMAIS SUBMETIDOS À CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRA-ORBITAL E TRATADOS COM SSI | 206 |
| 65 | TESTE DO – 200C PARA OS ANIMAIS SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO DO NERVO INFRA-ORBITAL E TRATADOS COM NTBO-A | 207 |
| 66 | TESTE DO – 200C PARA OS ANIMAIS SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO DO NERVO INFRA-ORBITAL E TRATADOS COM SSI | 208 |
| 67 | ANALISE DESCRITIVA E COMPARATIVA DOS LIMIARES DE PERCEPÇÃO AO FRIO (TESTE DO -200C) ENTRE OS DIFERENTES GRUPOS NOS DIFERENTES MOMENTOS DO ESTUDO | 209 |

ABREVIATURAS

| | |
|----------|---|
| Ach – | Acetilcolina. |
| AINES – | Antiinflamatórios não esteróides. |
| BCCP – | Biotério Central do Centro Politécnico – UFPR. |
| CGRP – | Gene Relacionado com o Peptídeo da Calcitonina. |
| CTC – | Convergência Trigemino-Cervical. |
| DVS – | Divalproato de Sódio. |
| EBA(%) – | Porcentagem de Entradas no Braço Aberto. |
| EBF(%) – | Porcentagem de Entradas no Braço Fechado. |
| FDA - | Food and Drug Administration. |
| FO – | Formalina 2,5%. |
| GABA – | Ácido Gaba Amino Butírico. |
| GNTMP - | Grupo Nuclear Talâmico Médio Posterior |
| GT – | Glutamato. |
| L – | Latência para o início dos movimentos. |
| NCT – | Núcleo Caudal do Trigêmeo. |
| NDAA - | Neurônios Dinâmicos de Amplo Alcance |
| NGF – | Fator de Crescimento Neural. |
| NI - | Núcleo Intralaminar |
| NK – | Neuroquininas. |
| NK1- | Receptor da Neuroquinina. |
| NMPV - | Núcleo Medial Posterior Ventral |
| NQ – | Número de Quedas. |
| NT - | Neuralgia do Trigêmeo |
| NET - | Núcleo Espinhal do Trigêmeo |
| NMT - | Núcleo Mesencefálico do Trigêmeo. |
| NMPVT - | Núcleo Medial Posterior Ventral do Tálamo. |
| NTBo- | Neurotoxina Botulínica. |
| NTBo-A – | Neurotoxina Botulínica Tipo-A |
| NTBo-E – | Neurotoxina Botulínica Tipo-E |
| MBL - | Mecanoreceptores de Baixo Limiar |
| PKA – | Proteína quinase A. |
| PKC – | Proteína quinase C. |

| | |
|-----------|---|
| SNARE – | Soluble <i>N</i> -ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) ou (Receptores para o SNAP). |
| SNAP 25 – | (Proteína Sinaptosomal com peso molecular de 25KDa). |
| SNC – | Sistema Nervoso Central. |
| SNP – | Sistema Nervoso Periférico. |
| Sp5 – | Núcleo Sensorial Principal. |
| Sp5C – | Subnúcleo caudalis. |
| Sp5I – | Subnúcleo interpolar. |
| Sp5O – | Subnúcleo oral. |
| SSI- | Solução Salina Isotônica 0,9%. |
| SP – | Substância P. |
| Syt IX - | Synaptotagmin IX. |
| TBA(%) – | Porcentagem de Tempo no Braço Aberto. |
| TBF(%) – | Porcentagem de Tempo no Braço Fechado. |
| TBo-B – | Toxina Botulínica tipo B. |
| TBo-E – | Toxina Botulínica tipo E. |
| TCN(%) – | Porcentagem de Tempo no Campo Neutro. |
| TEL – | Trato Espinotalâmico Lateral. |
| TF – | Teste de Formalina. |
| TRP – | Receptor de Potencial Transitório. |
| TRPA1 - | Receptor de Potencial Transitório Anquirina - 1. |
| TRPM8 – | Receptor de Potencial Transitório Melastatina 8. |
| TRPV1 – | Receptor de Potencial Transitório Vanilóide-1. |
| TTX - | Tetrodotoxina. |
| WDR – | Neurônios de amplo campo receptivo. |
| VAMP – | Proteína de Membrana Associada a Vesículas (Sinônimo de Sinaptobrevim). |
| ZIV - | Zona Incerta Ventral |

RESUMO

A neurotoxina botulínica do tipo A (NTBo-A) é uma substância com efeito sobre o sistema colinérgico, autonômico e sobre neurotransmissores envolvidos nos mecanismos nociceptivos. Sua utilização em síndromes álgicas tem sido indicada com resultados conflitantes. O objetivo do estudo é avaliar o efeito antinociceptivo da NTBo-A em modelos de dor aguda (tratamento preventivo) e crônica (efeito analgésico). Para dor aguda utilizamos um modelo de dor induzida pela formalina 2,5% (TF) aplicada sobre o segundo ramo do trigêmeo (lábio superior) e para dor crônica modelo de constrição do nervo infra-orbital (NIO) submetido ao teste do menos 20°C. Cento e oitenta e quatro animais *Rattus norvegicus* foram alocados durante as duas fases do estudo. Fase 1 – Dor aguda (n=95 animais) divididos em dois grupos conforme o tratamento prévio ao TF: (grupo NTBo-A e grupo SSI) cada grupo foi subdividido em seis subgrupos conforme o período da realização do TF após o tratamento (subgrupos: 24 horas; 8 dias; 15 dias; 22 dias; 29 dias e 36 dias). Os animais foram submetidos a dois tratamentos com SSI e o mesmo para o grupo NTBo-A. Os TF foram realizados após os respectivos tratamentos. Fase 2 – Um total de 89 animais foi submetido ao teste do -20°C. Os animais foram selecionados e divididos em quatro grupos: Grupo 1 – animais submetidos a constrição do nervo infra-orbital (NIO) e tratados posteriormente com NTBo-A (n=8); Grupo 2 – Animais submetidos a constrição do NIO e tratados com SSI (n=8); Grupo 3 – Animais submetidos a exposição do NIO e tratados com NTBo-A (n=7); Grupo 4- Animais submetidos a exposição do NIO e tratados com SSI (n=8). A atividade motora foi avaliada na Fase 1 utilizando-se do teste do campo aberto. Também na fase 1 foram aplicados testes comportamentais (teste do labirinto em cruz elevada e teste do campo claro versus escuro). Os resultados mostraram que o efeito antinociceptivo profilático ocorreu somente para o grupo NTBo-A subgrupo 8 dias, após o primeiro tratamento e somente durante a fase inflamatória do TF (p=0,011), todas as outras comparações não foram significativas. O efeito antinociceptivo analgésico ocorreu seis horas após a aplicação da NTBo-A (Grupo 1 versus 2 p=0,026) mantendo-se durante as avaliações de 24 horas após o tratamento (p= 0,012), 48 horas (p=0,046), 72 horas (p=0,048) voltando a um estado de hipernocicepção 96 horas após (p=1). A atividade motora não foi alterada nos animais submetidos a NTBo-A. Os animais avaliados 24 horas após o uso de NTBo-A apresentavam-se mais ansiosos e os avaliados 29 dias após apresentavam menores escores de ansiedade. Concluímos que a NTBo-A apresenta efeito preventivo em um modelo de dor aguda quando utilizada até 8 dias; repetidas aplicações de NTBo-A não potencializam este efeito. A NTBo-A pode ser considerada como uma droga analgésica sendo capaz de dessensibilizar um estado de dor crônica iniciando-se 6 horas após e mantendo-se por até 72 horas. Em conclusão a NTBo-A tem ação preventiva e analgésica sobre a nocicepção trigeminal.

Palavras Chaves: Dor Aguda; dor crônica; nervo trigêmeo; toxina botulínica do tipo-A.

ABSTRACT

Botulinum Toxin Type-A Effect Over the Trigeminal Nociception Model: Botulinum neurotoxin type A (BoNT-A) is a substance with effect on the cholinergic and autonomic neural transmission involved in nociceptive mechanisms. Its use in pain syndromes has been indicated, however with conflicting results. This study aims to evaluate the antinociceptive effect of BoNT-A in models of acute pain (preventive treatment) and chronic pain (analgesic effect). The acute pain model consisted of induction by formalin 2.5% test (FT) applied to the second branch of the trigeminal nerve (upper lip) and the chronic pain model consisted of constriction of the infra-orbital (ION) nerve submitted to the test of -20°C . One hundred and eighty-four animals, *Rattus norvegicus*, were allocated during the two phases of the study. Phase 1 - Acute pain (n= 95 animals) were divided into two groups according to prior treatment the FT: (BoNT-A group and saline group) each group was subdivided into six subgroups according to the period of implementation of FT after treatment (subgroups : 24 hours, 8 days, 15 days, 22 days, 29 days and 36 days). The animals of each group (saline and BoNT-A) were submitted to two batteries of treatment at two different timelines with a 42-day interval. The TF were performed after the respective treatments. Phase 2 - A total of 89 animals were tested with the -20°C . The *Rattus norvegicus* were selected and divided into four groups: Group 1 - animals subjected to constriction of the ION and subsequently treated with BoNT-A (n= 8), Group 2 - animals subjected to constriction of the ION and treated with SSI (n= 8) and Group 3 - animals subjected to exposure ION and treated with BoNT-A (n= 7), Group 4 - animals subjected to exposure of the ION and treated with saline (n= 8). Motor activity was evaluated in Phase 1 using the Open Field Test. Also, in phase 1 behavioral test was applied (test of High-Maze Test and Light Field versus Dark Field). The results showed that the prophylactic analgesic effect occurred only among the BoNT-A sub-group 8th-day measurement after the first treatment, and only during the inflammatory phase of TF ($p= 0.011$). All other comparisons were not significant. The antinociceptive analgesic effect occurred six hours after application of BoNT-A (Group 1 *versus* 2 $p= 0.026$) remained in the 24 hours evaluations ($p= 0.012$), 48 hours ($p= 0.046$), 72 hours ($p= 0.048$) after treatment, returning to a state of hypernociception at 96 hours after treatment ($p=1$). Motor activity was not altered in animals subjected to BoNT-A. The animals evaluated 24 hours after the use of BoNT-A had become more anxious. Those evaluated 29 days after BoNT-A, had lower scores of anxiety. We conclude that BoNT-A has a preventive effect in a model of acute pain when used up to 8 days and that repeated applications of BoNT-A did not potentiate this effect. The BoNT-A may be regarded as an analgesic drug being able to desensitize a state of chronic pain starting 6 hours after and maintained for 72 hours. In conclusion, BoNT-A has analgesic and preventive action on trigeminal nociception.

Keywords: acute pain; botulinum toxin type-A; chronic pain; trigeminal nerve.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONCEITOS BÁSICOS:

Nos mamíferos estímulos potencialmente agressivos vindos do meio externo são detectados por estruturas especializadas no sistema nervoso periférico (SNP), chamados de nociceptores. Eles podem reagir a estímulos químicos, térmicos ou mecânicos transmitindo e conectando o SNP ao sistema nervoso central (SNC). Um tecido lesado ou que está sofrendo um processo inflamatório gera numerosas moléculas ativadoras dos nociceptores. Dentre estas, incluem-se os peptídeos (exemplo – bradisininas) e lipídios (exemplo – prostaglandinas) [Julius e Basbaum, 2001].

As fibras periféricas que inervam a cabeça e pescoço originam-se de corpos celulares localizados no núcleo do trigêmeo dentro do gânglio do trigêmeo e da raiz dorsal da medula cervical nos níveis C₂ e C₃ [Julius e Basbaum 2001]. O nervo trigêmeo, ou quinto nervo craniano, é um nervo mixto, transmitindo informações motoras e sensoriais. Ele é o mais largo nervo craniano, apresentando relações com o terceiro, quarto, sexto, sétimo, nono e décimo pares cranianos e com o sistema nervoso simpático [Haerer AF, 1992]. O nervo trigêmeo é subdividido em três ramos: ramo oftálmico; maxilar e ramo mandibular. As células que originam a porção sensorial deste nervo possuem seu núcleo localizado dentro do gânglio de gasser ou semilunar (localizado dentro do cavum de Meckel na extremidade superior do rochedo) [Duus P, 1989]. As células do gânglio são pseudounipolares.

A divisão oftálmica é a mais fina dos três, passando na parede lateral do seio cavernoso onde mantém relação estreita com o terceiro, quarto e sexto pares cranianos entrando na órbita através da fissura orbitária superior. Este ramo irá fornecer a sensibilidade exteroceptiva das seguintes estruturas: pele da região frontal, temporal e vertex; pele da região superior dos olhos, anterior e lateral do nariz; olhos; conjuntiva superior; córnea; corpo ciliar; íris; mucosa da membrana superior do seio frontal; porção dos seios esfenoidal e etmoidal; porção superior da cavidade nasal; raízes sensoriais para o gânglio ciliar; ramos para glândula lacrimal; tentorium cerebral; nervos oculomotor, troclear e abducenter [Testut L, Latarjet A, 1979; Brodal A, 1984; Haerer AF, 1992] (Figura 1).

A divisão maxilar passa através da porção lateral do seio cavernoso, exteriorizando-se da cavidade craniana através do forâmen redondo, trafega

pela fossa pterigo palatina e entra na órbita pela fissura orbitária inferior alcançando a face pelo forâmen infra-orbital. Antes de deixar o crânio a divisão maxilar emite um ramo medial ou recorrente (nervo meningeal) que irá inervar a fossa craniana média. Ainda dentro do canal infra-orbital este ramo originará terminações sensoriais para o gânglio esfenopalatino, ramos alveolares superio-posterior e zigomático. Na face após deixar o forâmen infra-orbital ele divide-se em ramo palpebral inferior, ramo nasal interno e externo e ramos labiais superiores [Testut L, Latarjet A, 1979; Brodal A, 1984; Haerer AF, 1992]. Esta divisão promove a sensibilidade exteroceptiva da pele da metade posterior do nariz, porção inferior dos olhos; face superior; região temporal anterior; lábio superior; mucosa da membrana conjuntival inferior; seio maxilar; porções dos seios esfenóide e etmoide; porção inferior do nariz; dentes superiores; porção oral do palato duro; palato mole exceto o bordo posterior; úvula e nasofaringe (Figura 1). A divisão maxilar também supre a dura da fossa craniana média através do nervo meningeo médio e fornece informações para o gânglio esfenopalatino. Através do gânglio esfenopalatino o ramo maxilar irá manter conexões com o sétimo par craniano “nervo facial” (através do gânglio geniculado) e com o sistema nervoso simpático (através do nervo vidiano, nervo petroso maior superficial e petroso profundo) [Testut L, Latarjet A, 1979; Brodal A, 1984; Haerer AF, 1992].

A divisão mandibular é a única porção mista (sensitiva e motora) deixa o crânio através do forâmen oval. A porção motora é mais anterior e menor e a sensorial posterior e maior. Este nervo divide-se em dois ramos: ramo recorrente ou espinhoso que entra no crânio através do forâmen espinhoso suprindo a dura mater, asa maior do osso esfenóide e as membranas superiores da mastóide; ramo posterior que se subdivide em três outros ramos (lingual, auriculo-temporal e alveolar inferior) [Testut L, Latarjet A, 1979; Brodal A, 1984; Haerer AF, 1992]. A divisão mandibular fornece a sensibilidade exteroceptiva da porção posterior da face, áreas temporais, porção anterior da “pinna” (asa do nariz), porção superior do canal auditivo externo, metade anterior do tímpano, lábio inferior, queixo, mucosa do lábio inferior, porção inferior da superfície bucal, língua e assoalho da boca (Figura 1). Além destas estruturas o ramo mandibular (ramo alveolar inferior) também fornece

inervação exteroceptiva para área gengival inferior, eixo alveolar inferior e dentes inferiores. O ramo recorrente (ramo meningeo) inerva a dura mater da fossa craniana anterior e média, asa maior do esfenóide, e membrana da mucosa do teto das células mastóideas. O nervo mandibular ainda promove a inervação para a articulação temporo-mandibular e ramos para o gânglio ótico e submaxilar [Testut L, Latarjet A, 1979; Brodal A, 1984; Haerer AF, 1992].

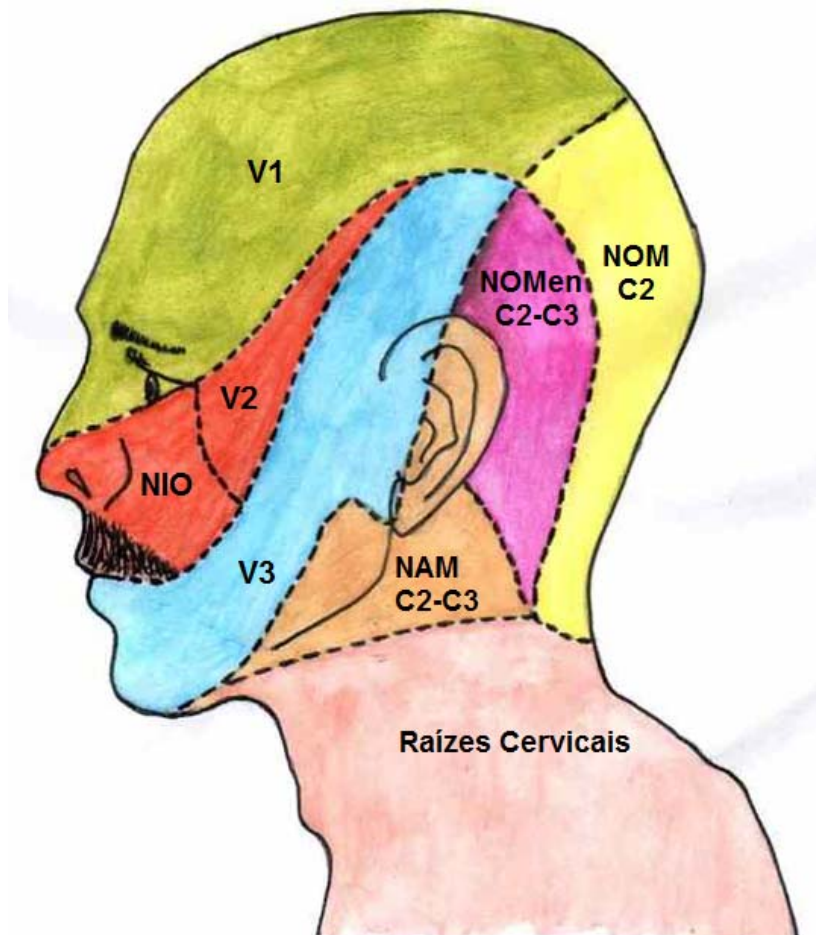


Figura 1 – Distribuição cutânea do nervo trigêmeo e nervos cervicais adjacentes. Modificado de Haymaker e Woodhall (1945), Testut L e Latarjet A (1979), Brodal A (1984), Martin (1996). Primeiro ramo do trigêmeo (V1) nervo oftálmico; segundo ramo do trigêmeo (V2) nervo maxilar; terceiro ramo do trigêmeo (V3) nervo mandibular. NIO – Nervo Infra-Orbital (oriundo do ramo maxilar “V2”). NOM – Nervo Occipital Maior (Ramo da segunda raiz cervical “C2”). NOMen – Nervo Occipital Menor (ramo da segunda e terceiras raízes cervicais “C2-C3”). NAM – Nervo Auricular Maior (ramo da segunda e terceiras raízes cervicais “C2-C3”).

O gânglio do trigêmeo é um análogo dos gânglios das raízes dorsais da medula espinhal. Filogeneticamente alguns corpos celulares de neurônios periféricos trigeminais além de localizar-se no gânglio do trigêmeo foram translocados para dentro do sistema nervoso central denominado de núcleo trigeminal mesencefálico (NM) (o único do espécime humano) [Johnston, 1909; Brodal A, 1984]. Eles formarão uma classe funcional distinta de neurônios trigeminais (neurônios proprioceptivos) e talvez formado por alguns interneurônios [Lazarov, 2002] (Figura 2). O gânglio do trigêmeo inerva mecanoreceptores, termoreceptores, nociceptores e alguns proprioceptores das estruturas anatômicas anteriormente citadas inclusive às vibrissas [Dubner R e Bennett GJ, 1983; Lazarov, 2002].

Embriogeneticamente, o gânglio do trigêmeo é formado por dois grupos principais de células: Célula A, grande e luminosa (large light) e Célula B, escura e pequena (small dark) [Ramón e Cajal, 1909; Scharf, 1958; Lazarov, 2002]. As células A irão originar as fibras fortemente mielinizadas, ou fibras do tipo A β e A α e as fracamente mielinizadas ou fibras do tipo A δ , enquanto que as células B irão originar as fibras amielinizadas ou fibras do tipo C [Scharf, 1958; Lazarov, 2002].

Fibras do tipo A β , conduzem sensações inócuas; fibras A δ conduzem a dor aguda bem localizada e as fibras do tipo C trafegam com a dor pouco localizada do tipo crônica observadas nos estados de inflamação ou de etiologia neuropática [Harper AA e Lawson SN, 1985; Cameron e col., 1986]. Esta distribuição linear das fibras não se mantém durante todo trajeto das fibras periféricas, passando pelo gânglio e chegando no seu aferente central. Os conhecimentos modernos mostram que as fibras podem sofrer transformações em sua capacidade de mielinização à medida que entram nas estruturas neurais centrais vindos da periferia. Um exemplo clássico ocorre nas fibras do nervo alveolar inferior, fortemente mielinizadas (alta velocidades de condução) em sua porção extra-pulpa e fracamente mielinizadas em sua porção intra-pulpa (menores velocidades de condução) [Paik e col., 2009].

Todas as fibras do trigêmeo penetram ao nível da ponte (tronco cerebral). As fibras após penetrarem irão se direcionar para diferentes núcleos [Brodal A, 1984]. Os núcleos serão sensitivos e motor. Os núcleos sensitivos são

classificados em: 1- Núcleo Mesencefálico do Trigêmeo (NM); 2- Núcleo Principal do Trigêmeo (NPT); 3- Núcleo Espinhal do Trigêmeo [subdividido em núcleo oral (NO), interpolar (NI) e caudal do trigêmeo (NC)]. O núcleo motor é único e denominado de núcleo motor do trigêmeo [Haymaker e Woodhall, 1945; Testut L e Latarjet A, 1979; Brodal A, 1984; Martin, 1996].

1.1.1 – NÚCLEOS DO TRIGÊMEO:

1.1.1.1 – **Corpos Celulares do Núcleo Sensitivo Mesencefálico do Trigêmeo (NM)** recebe fibras que não se originam do gânglio de gasser. O núcleo trigeminal mesencefálico é formado por células pseudounipolares, semelhantes às encontradas nos gânglios dorsais cervicais e do gânglio de gasser. As fibras ali localizadas estão relacionadas principalmente com a sensibilidade proprioceptiva [Brodal A, 1984; Lazarov NE, 2002] (Figura 2). Este núcleo localiza-se na porção lateral periventricular e substância cinzenta periaqueductal [Martin, 1996]. As suas fibras transmitem informações para o controle motor e proprioceptivo da mandíbula o que permite a realização do reflexo monossináptico mandibular (análogo do reflexo patelar) [Gudaux e Desmedt, 1975; Martin, 1996] (Figura 2).

1.1.1.2 – **Corpos Celulares do Núcleo Sensorial Principal do Trigêmeo (NPT)** é formado por fibras de grande calibre, responsáveis pela sensibilidade tátil [Martin, 1996] (Figura 3). O núcleo sensorial principal do trigêmeo mantém conexões com o núcleo espinhal do trigêmeo (principalmente com o núcleo caudal) [Brodal A, 1984]. Em pacientes portadores de neuralgia do trigêmeo o estímulo tátil pode desencadear paroxismos de dor em decorrência deste “looping nociceptivo” entre núcleo sensitivo principal do trigêmeo e núcleo espinhal do trigêmeo (núcleo caudal) [Greenwood LF e Sessle B, 1976] (Figura 3). Nos pacientes portadores de neuralgia do trigêmeo, estímulos táteis leves podem desencadear quadro de alodinia cutânea dinâmica. A presença de período refratário (período de tempo entre o estímulo cutâneo tátil dinâmico até o surgimento do sintoma álgico) sugere uma etiologia periférica enquanto que sua ausência sugere uma etiologia central [Kugelberg E e Lindblom U, 1959; Bowsher D, 2005].

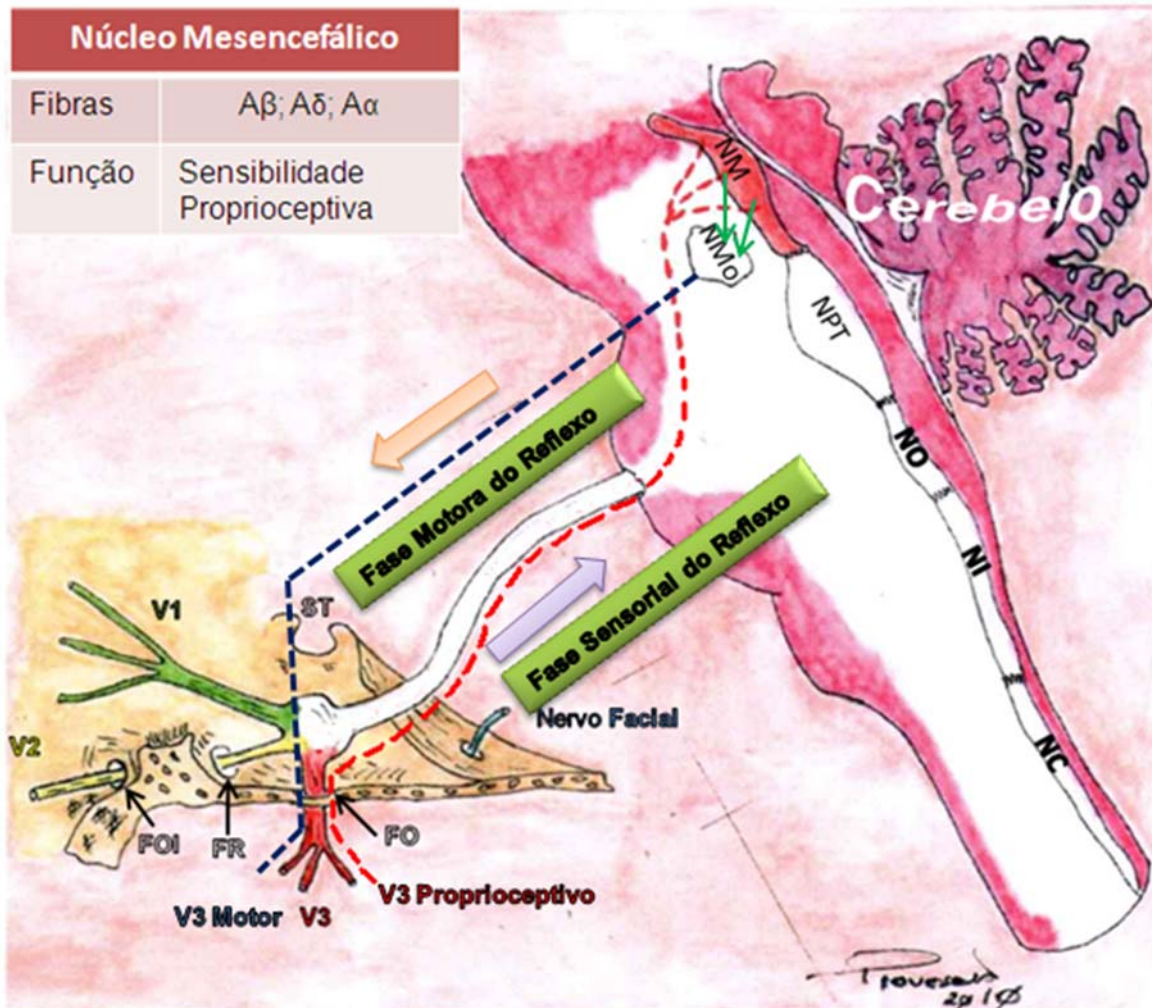


Figura 2 – Núcleo Sensitivo Mesencefálico do Trigêmeo (NM) e reflexo monossináptico mandibular. Modificado de Haymaker e Woodhall (1945), Testut L e Latarjet A (1979), Brodal A (1984) e Martin (1996). Primeiro ramo do trigêmeo (V1) nervo oftálmico; segundo ramo do trigêmeo (V2) nervo maxilar; terceiro ramo do trigêmeo (V3) nervo mandibular. ST – Sela Túrcica; FOI – Fissura Orbitária inferior; FR – Forâmen Redondo; FO – Forâmen Oval; NM – Núcleo Mesencefálico; NMo – Núcleo Motor do Trigêmeo; NPT – Núcleo Sensitivo Principal do Trigêmeo; NO – Núcleo Oral; NI – Núcleo Interpolar; NC – Núcleo Caudal.

Alodinia cutânea dinâmica sugere um estado de sensibilização das células ao nível do núcleo caudal do trigêmeo, aumento da expressão dos mecanorreceptores de baixo limiar (MBL) e dos neurônios dinâmicos de amplo alcance (NDAA) [Saito e Col., 2008]. Estas células mais sensíveis são facilmente ativadas por estímulos táteis oriundos do núcleo principal sensitivo do trigêmeo [Brodal A, 1984] (Figura 3).

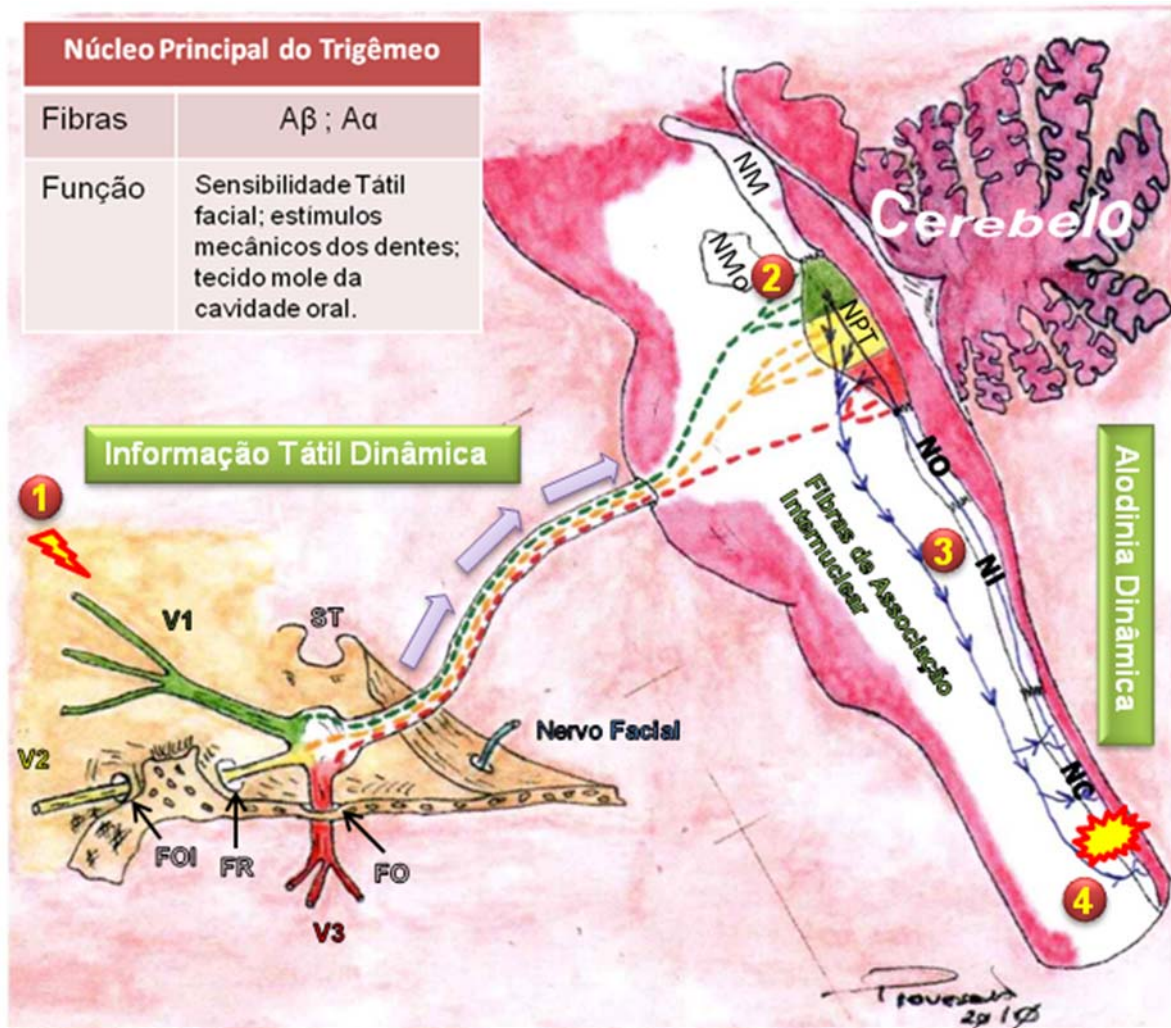


Figura 3 – Núcleo Sensitivo Principal do Trigêmeo (NPT) e Mecanismos para o acionamento dos pontos gatilhos na neuralgia do trigêmeo. Modificado de Haymaker e Woodhall (1945), Testut L e Latarjet A (1979), Brodal A (1984) e Martin (1996). Primeiro ramo do trigêmeo (V1) nervo oftálmico; segundo ramo do trigêmeo (V2) nervo maxilar; terceiro ramo do trigêmeo (V3) nervo mandibular. ST – Sela Túrcica; FOI – Fissura Orbitária inferior; FR – Forâmen Redondo; FO – Forâmen Oval; NM – Núcleo Mesencefálico; NMo – Núcleo Motor do Trigêmeo; NPT – Núcleo Sensitivo Principal do Trigêmeo; NO – Núcleo Oral; NI – Núcleo Interpolar; NC – Núcleo Caudal. 1- Estímulo cutâneo dinâmico sobre o primeiro ramo do trigêmeo; 2- Transmissão das informações táteis para o núcleo sensitivo principal do trigêmeo; 3 – Retransmissão das informações através das fibras de associação internuclear do núcleo sensitivo principal do trigêmeo para o núcleo caudal espinal do trigêmeo; 4- Ativação dos neurônios sensibilizados dentro do núcleo caudal espinal do trigêmeo e surgimento da alodinia cutânea dinâmica.

1.1.1.3 – Corpos Celulares do Núcleo Espinhal do Trigêmeo (NET) é subdividido em três porções: núcleo oral; interpolar e caudal [Olzewski e Baxter, 1954; Brodal A, 1984]. Este núcleo recebe aferentes formados por fibras amielínicas (fibras do tipo C) e fibras fracamente mielinizadas (Fibras A δ) [Martin JH, 1996]. Fibras de médio e grande calibre também chegam ao núcleo espinhal trigeminal diferenciando-se também em seu padrão de terminação [Martin JH, 1996]. As funções do núcleo espinhal trigeminal são semelhantes ao corno dorsal da medula espinhal [Martin JH, 1996]. De uma maneira geral, o núcleo espinhal caudal esta envolvido na função de percepção dolorosa e de temperatura da face, o núcleo oral nos reflexos trigeminais e o interpolar na sensibilidade dolorosa e seus reflexos [Martin JH 1996].

1.1.1.3.1 – Corpos Celulares do Núcleo espinhal caudal do trigêmeo, lembra muito o corno dorsal da medula espinhal (formando por uma zona marginal periférica, uma porção intermediária gelatinosa e internamente um subnúcleo magnocelular) [Brodal A, 1984]. A camada marginal corresponde à lâmina I de Rexed do corno dorsal da medula e é formada por células grandes. A camada intermediária ou gelatinosa é formada basicamente por células amielínicas (pequenas) correspondem a camada II e III de Rexed. A camada interna ou magnocelular é formada por neurônios de diferentes tipos e corresponde a camada IV de Rexed [Brodal A, 1984].

1.1.1.3.1.1- Conexões aferentes para o subnúcleo espinhal caudal do trigêmeo: O subnúcleo recebe oito aferentes: 1- Fibras sensitivas trigeminais primárias; 2- Raízes cervicais superiores (nervo occipital maior e menor, nervo auricular maior); 3 – Pares cranianos (nervo glossofaríngeo, nervo intermédio e nervo vago); 4 – Formação reticular; 5 – Cortex sensitivomotor (Sm I e Sm II) [Brodal A, 1984; Mizuno e Col., 1968]; 6 – Núcleo Sensitivo Principal do Trigêmeo (sensibilidade tátil); 7 – Núcleo Rubro [Edwards SB, 1972]; 8 – Conexões Internunciais (Núcleo oral e núcleo interpolar) [Haymaker e Woodhall, 1945; Testut L e Latarjet A, 1979, Brodal A,1984; Martin JH, 1996; Piovesan e Col., 2003] (Figura 4).

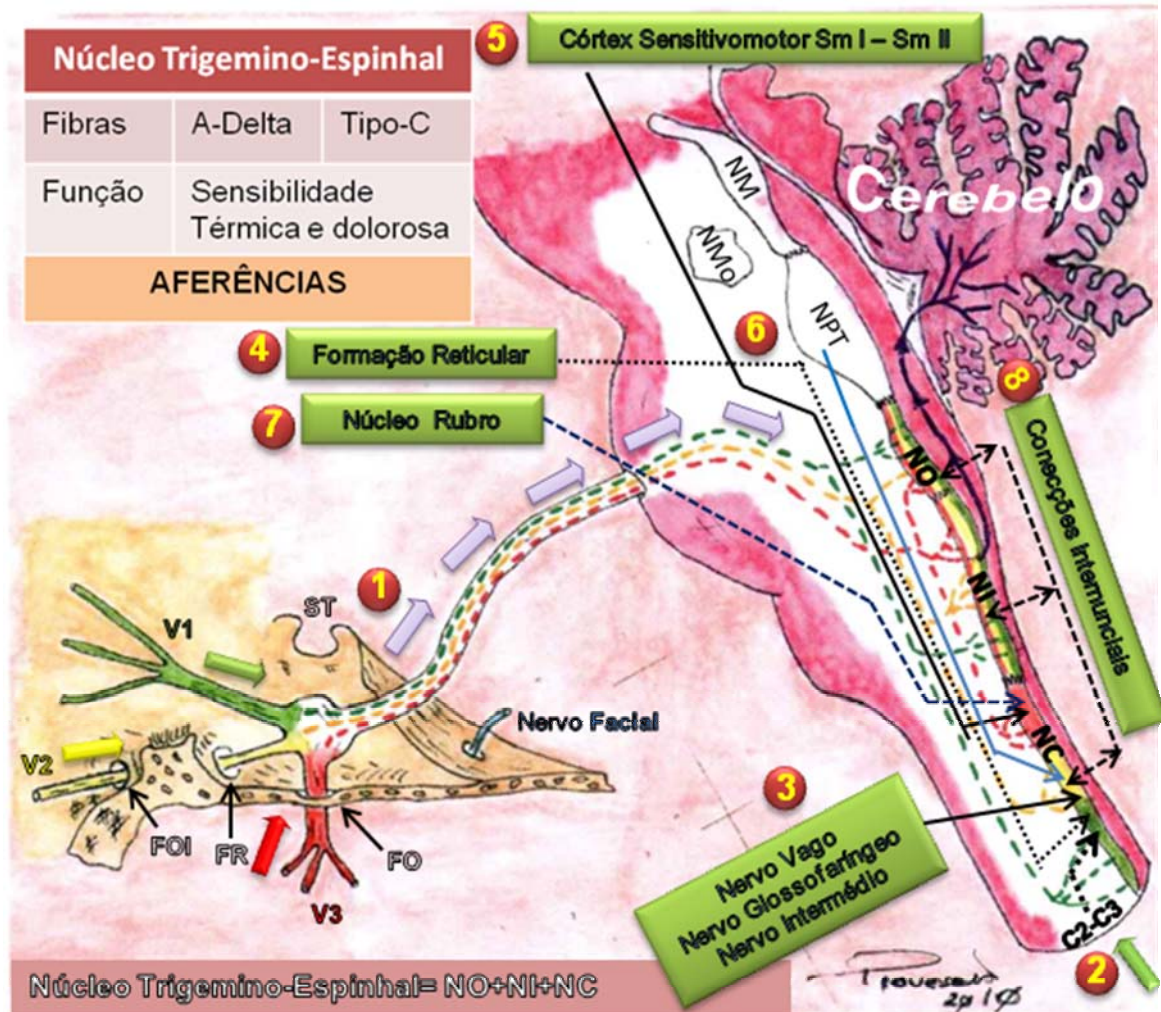


Figura 4 – Núcleo Caudal Espinal do Trigêmeo e Mecanismos de aferência. Modificado de Haymaker e Woodhall (1945), Testut L e Latarjet A (1979), Brodal A (1984), Martin (1996), Piovesan EJ (2003). Primeiro ramo do trigêmeo (V1) nervo oftálmico; segundo ramo do trigêmeo (V2) nervo maxilar; terceiro ramo do trigêmeo (V3) nervo mandibular. ST – Sela Túrcica; FOI – Fissura Orbitária Inferior; FR – Forâmen Redondo; FO – Forâmen Oval; NM – Núcleo Mesencefálico; NMo – Núcleo Motor do Trigêmeo; NPT – Núcleo Sensitivo Principal do Trigêmeo; NO – Núcleo Oral; NI – Núcleo Interpolar NC – Núcleo Caudal. 1- Aferência sensitiva trigeminal primária; 2- Aferência das raízes cervicais dorsais superiores; 3- Aferência de pares cranianos; 4- Aferência da formação reticular; 5- Aferência do córtex sensitivo motor; 6- Aferência do Núcleo sensitivo principal do trigêmeo; 7- Aferência do núcleo rubro; 8- Aferência de fibras internunciais.

As fibras sensitivas primárias do nervo trigêmeo (em seus três ramos) apresentam uma organização somatotópica em casca de cebola para o núcleo trigeminal espinal com uma distribuição rostro caudal (Figura 5). Desta maneira fibras que inervam a cabeça em sua porção adjacente a coluna cervical projetam-se mais caudalmente dentro do trato espinal trigeminal e terminam dentro da região caudal do núcleo caudal espinal trigeminal do que

as fibras que inervam a cavidade oral, face e região nasal que terminam mais rostralmente dentro do núcleo interpolar do trato espinhal do trigêmeo [Martin JH, 1996] (Figura 5).

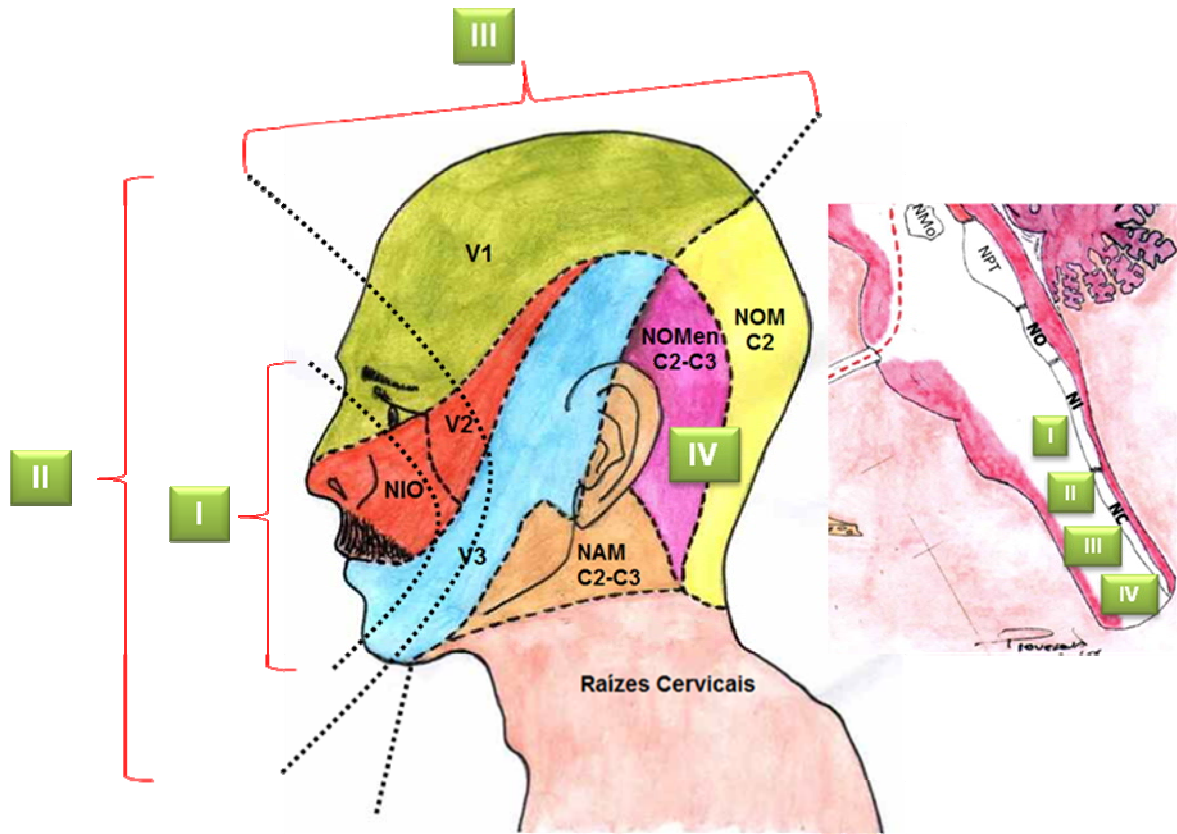


Figura 5 – Distribuição somatotópica da sensibilidade térmica e dolorosa em casca de cebola e sua distribuição para o núcleo espinhal do trigêmeo. Modificado de Haymaker e Woodhall (1945), Testut L e Latarjet A (1979), Brodal A (1984), Martin (1996). Primeiro ramo do trigêmeo (V1) nervo oftálmico; segundo ramo do trigêmeo (V2) nervo maxilar; terceiro ramo do trigêmeo (V3) nervo mandibular. ST – Sela Túrcica; FOI – Fissura Orbitária inferior; FR – Forâmen Redondo; FO – Forâmen Oval; NM – Núcleo Mesencefálico; NMo – Núcleo Motor do Trigêmeo; NPT – Núcleo Sensitivo Principal do Trigêmeo; NO – Núcleo Oral; NI – Núcleo Interpolar; NC – Núcleo Caudal. I – Núcleo interpolar; II e III – Núcleo caudal do trigêmeo e IV – Transição núcleo caudal do trigêmeo e corno dorsal da coluna cervical alta (C1-C3).

As fibras das raízes dorsais dos nervos cervicais superiores quando converge para o núcleo caudal espinhal do trigêmeo induzem um mecanismo fisiológico conhecido como convergência trigemino-cervical [Kerr 196; Piovesan e Col., 2003]. Clinicamente estímulos sobre as raízes cervicais (nervo occipital maior) produzem sintomas álgicos e manifestações autonômicas sobre o primeiro ramo do trigêmeo [Piovesan e Col., 2001-a]. A manipulação do nervo occipital maior pode produzir um controle parcial das crises de migrânea e de

algumas cefaléias trigemino autonômicas [Piovesan e Col, 2001-b; Peres MF, 2002; Piovesan e Col, 2007]. Os resultados do bloqueio do nervo occipital maior no tratamento da neuralgia do trigêmeo não tem sido publicado na literatura, entretanto a observação pessoal tem mostrado que os efeitos terapêuticos não são animadores.

Uma característica destes subnúcleos é a presença de fibras internucleares ascendentes (fibras que conectam o subnúcleo oral, interpolar e caudal) [Stewart e King, 1963; Roberts e Matzke, 1971; Tiwari e King, 1974; Brodal A, 1984]. Estas fibras também podem projetar-se para o núcleo sensitivo principal e para formação reticular [Brodal A, 1984]. No núcleo caudal o predomínio das sinapses axôxônicas predomina, o que determina a grande presença de conexões internúcleares [Kerr 1970] (Figura 4).

As informações que trafegam por estes núcleos podem ser mediadas por vias corticais superiores descendentes (vias córtico-trigeminais). A ativação do subnúcleo caudal produz respostas antidrômicas em neurônios corticais inibitórios (áreas somestésicas primária e secundária) em direção a este [Darian-Smith, 1966; Dubner, 1967; Brodal A, 1984]. O núcleo caudal funciona mais do que simplesmente como um centro intermediário de transmissão dos impulsos sensitivos. O núcleo caudal interconecta-se com os outros subnúcleos espinhais e o núcleo sensitivo principal através de sua rica trama de fibras internucleares: núcleo interpolar (conexões com o cerebelo) e núcleo sensitivo principal (o núcleo de maior correlação) [Brodal A 1984].

A estimulação do nervo vago produz uma inibição da atividade sobre o núcleo caudal do trigêmeo [Bossut e Col., 1992], estímulos de baixa frequência e intensidade facilitam os reflexos trigeminais nociceptivos [Bossut DF e Maixner W 1996]. Estímulos contínuos sobre o nervo vago (24 horas) aplicados sobre ratos produzem um sustentado efeito antinociceptivo ao nível do núcleo caudal do trigêmeo [Bohotin e Col., 2003].

1.1.1.3.1.1- Conexões eferentes do subnúcleo espinhal caudal do trigêmeo:

As vias trigeminais ascendentes iniciam-se no núcleo trigeminal espinhal (especialmente o interpolar e caudal) cruzam a linha média e terminam no tálamo contralateral. Devido estas características são denominadas de trigeminotalámicas, semelhantes às vias espinotalámicas, trafegando junto com o sistema anterolateral [Martin JH, 1996]. Esta via projeta-se para o tálamo: núcleo medial posterior ventral (NMPV) e núcleo intralaminar (NI) [Martin JH, 1996]. O NMPV é o responsável pela discriminação da dor facial e da sensibilidade térmica enquanto o NI é responsável pelo aspecto afetivo e motivacional da dor facial e da sensibilidade térmica [Martin JH, 1996]. Os eferentes do NMPV projetam-se para a representação facial do córtex sensorial somático primário localizado dentro da porção lateral do giro pós-central [Martin JH, 1996]. Os eferentes do NI projetam-se para o córtex da ínsula anterior [Martin JH, 1996].

O núcleo espinhal do trigêmeo possui também eferentes para a formação reticular (trato trigeminoreticular), tecto do mesencéfalo (trato trigeminotectal) e cerebelo (trigeminocerebelar) (núcleo interpolar) [Brodal A, 1984; Martin JH, 1996].

1.1.2- Neuroanatomia Nociceptiva das Vibrissas:

Para os roedores a vibrissa é utilizada como ferramenta fundamental para o contato com o meio externo. A vibrissa é um mecanoreceptor de baixo limiar. Cada vibrissa possui uma fibra única para um neurônio localizado dentro do núcleo trigeminal chamado de “barreletes”, para o tálamo chamado de “barreloides” e para o córtex somatosensorial chamado de “barrel” [Krugel e Michel, 1962; Zucker e Welker, 1969; Deschenes M., 2009] (Figura 6). O sistema nociceptivo da vibrissa é notável. O animal desta maneira é capaz de identificar e localizar estímulos mecânicos durante a exploração do seu ambiente [Zucker e Welker, 1969; Brodal A, 1984]. Através das vibrissas móveis e estacionárias o animal é capaz de: codificar a localização periférica; direção da inclinação; início; término; amplitude; velocidade; duração; frequência de repetição e padrão temporal dos objetos pesquisados [Brodal A, 1984]. As áreas de informação relacionadas às vibrissas são tão importantes para os animais que

ocupam a maior parte em todas as regiões talâmicas e corticais referentes à informação sensitiva da face destes animais [Brodal A, 1984].

O nervo periférico a partir da vibrissa projeta-se para: núcleo sensitivo principal do trigêmeo e núcleo espinhal do trigêmeo. Estas fibras terminam em epitélios especializados denominados de subnúcleos de barreletes [Ma PM e Woolsey TA, 1984]. Estes aferentes são formados por fibras do tipo A β que transmitem impulsos nociceptivos de forma contínua e rostrocaudal [Shortland e Col., 1996]. Um único impulso aferente (originado pela deflexão da vibrissa) produz estímulos nociceptivos para os diferentes núcleos trigeminais. Estas diferentes informações permitem que no cérebro do animal crie-se uma rede de reações comportamentais a partir do contexto do estímulo. Desta maneira, o comportamento exploratório e o reconhecimento dos objetos, estão diretamente relacionados com os mecanismos nociceptivos das vibrissas [Curtis JC e Kleinfeld D, 2006].

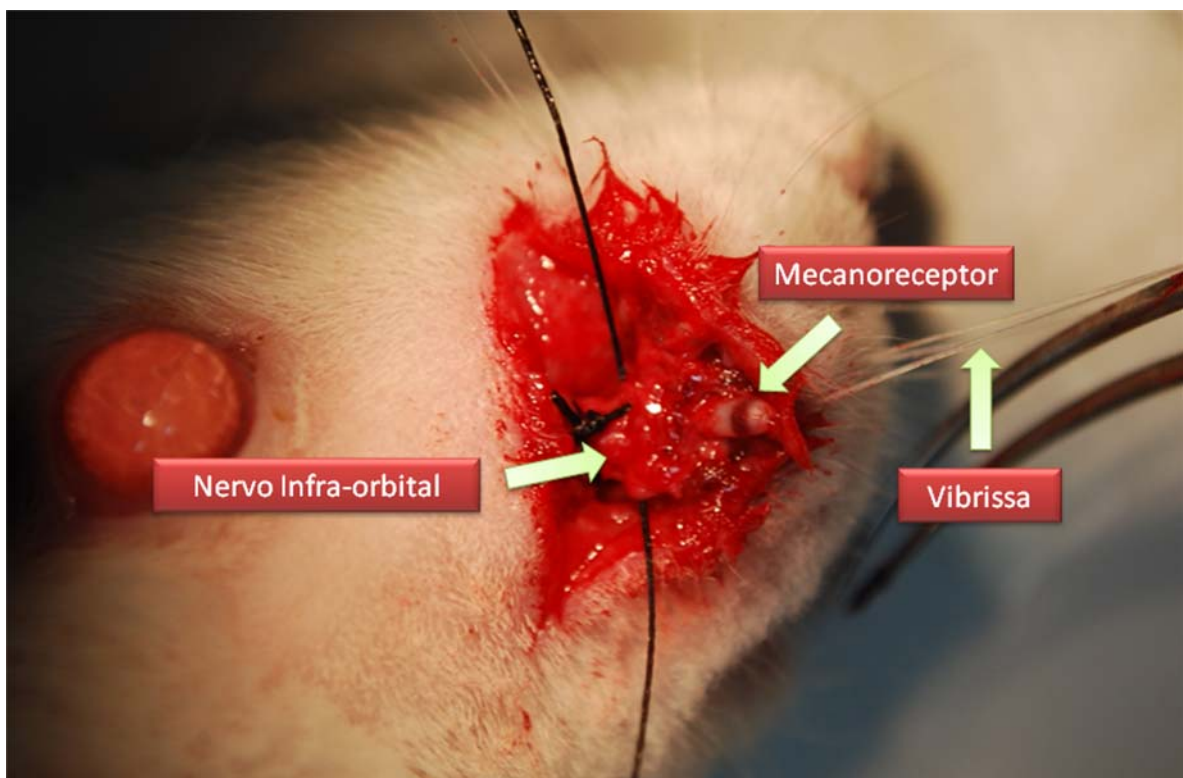


Figura 6: Identificação do aparato vibrissa, mecanoreceptor e nervo infra-orbital.

O subnúcleo caudal recebe a grande maioria das aferências trigeminais, oriundas das vibrissas. As eferências trigeminotalámicas são escassas sendo que a maior parte de seus eferentes irá para os outros núcleos trigeminais [Deschenes M, 2009].

As informações nociceptivas das vibrissas alcançam o cortex somatosensorial através de quatro vias: 1- Vias leminiscais que se origina do núcleo trigeminal sensitivo principal atravessa o núcleo medial ventral posterior do tálamo e termina no córtex de barrel (camada 4) (três vias); 2- Via paraleminiscal cuja origem exata ainda é desconhecida, passa pela porção do grupo nuclear talâmico médio posterior (GNTMP), terminando na região cortical ao redor do epitélio de barrel, tendo esta última importante função no controle das informações nociceptivas [Deschenes M, 2009] (Figura 7).

O GNTMP recebe fibras monossinápticas oriundas dos núcleos trigeminais (especialmente o núcleo interpolar rostral). Estas fibras respondem fracamente a deflexão das vibrissas e quando presentes, a latência ocorre entre 16-20ms com baixa magnitude quando comparadas as fibras estimuladas ao nível do núcleo medial posterior ventral do tálamo (NMPVT) [Deschenes M, 2009; Sosnik e Col., 2001]. No processo nociceptivo o GNTMP sofre um controle gabaérgico vindo da Zona Incerta Ventral (ZIV) e vice-versa [Veinante e Col., 2000; Barthó e Col., 2002; Deschênes M., 2009]. Estudos neurofisiológicos mostraram que a ZIV age como uma estação intermediária controlando as aferências em direção ao córtex sensitivo de Barrel [Trageser JC e Keller A., 2004; Lavellée P e Col., 2005; Deschênes M., 2009] (Figura 7).

Os estímulos sensoriais vindos do núcleo interpolar rostral espinhal (NIT) do trigêmeo antes de chegarem ao GNTMP sofrem uma ramificação em direção a ZIV [Deschênes M., 2009]. As vias indiretas NIT-ZIV-GNTMP são mais rápidas do que as vias diretas NIT-GNTMP [Deschênes M., 2009] (Figura 7). A ZIV é uma região inibitória (gabaérgica) controlada pelo córtex motor (via corticofugal). A ZIV impede o fluxo de informações (efeito inibitório da deflexão das vibrissas) quando não estimulada pelas vias corticofugais. Quando as vias corticofugais atuam sobre a ZIV impedem esta inibição permitindo agora que as informações nociceptivas oriundas do núcleo interpolar ascendam sem nenhum controle intermediário [Urbain N e Deschênes M., 2007; Deschênes M., 2009] (Figura 7).

As interconecções nociceptivas a partir da estimulação de uma única vibrissa ocorrem extensivamente ao nível dos núcleos trigeminais do tronco cerebral [Jacquin e Col., 1990; Voisin e Col., 2002; Deschênes M., 2009]. Muitos subnúcleos são reciprocamente conectados de forma excitatória ou inibitória, sendo que a maior parte das interconecções ocorre entre o subnúcleo caudal espinhal do trigêmeo com o subnúcleo interpolar espinhal do trigêmeo e o núcleo sensitivo principal do trigêmeo [Deschênes M., 2009]. O núcleo sensitivo principal do trigêmeo recebe aferentes inibitórios gabaérgicos vindos do subnúcleo interpolar espinhal do trigêmeo e aferentes excitatórios glutamatérgicos oriundos do subnúcleo caudal espinhal do trigêmeo [Furuta e Col., 2008; Deschênes M., 2009] (Figura 8). O subnúcleo interpolar espinhal exerce importante efeito inibitório sobre o núcleo sensitivo principal do trigêmeo enquanto o caudal exerce efeito excitatório [Furuta e Col., 2008; Lee e Col., 2008; Deschênes M., 2009].

De acordo com o balanço entre aferentes excitatórios glutamatérgicos oriundos do núcleo caudal e inibitórios gabaérgicos oriundos do núcleo interpolar o núcleo sensitivo principal do trigêmeo sofrera ativação ou não [Jacquin e Col., 1990; Voisin e Col., 2002; Deschênes M., 2009] (Figura 8). Se as aferências excitatórias se sobrepuserem as inibitórias o núcleo sensitivo principal do trigêmeo estimulara o núcleo medial posterior ventral do tálamo e este irá projetar-se de forma excitatória para o córtex somatosensorial (epitélio de Barrel) [Jacquin e Col., 1990; Voisin e Col., 2002; Deschênes M., 2009] (Figura 8). Vias corticofugais colinérgicas oriundas do córtex motor atuam sobre o núcleo interpolar potencializando o efeito inibitório gabaérgico (Figura 8). Os processos inibitórios também podem ocorrer ao nível do núcleo espinhal entre os núcleos interpolar e caudal e vice versa (Figura 8). Vias também colinérgicas ao nível do núcleo do pedúnculo pontino podem exercer ação inibitória sobre o núcleo sensitivo principal do trigêmeo e sobre o núcleo medial posterior ventral do tálamo [Timofeeva e Col., 2005].

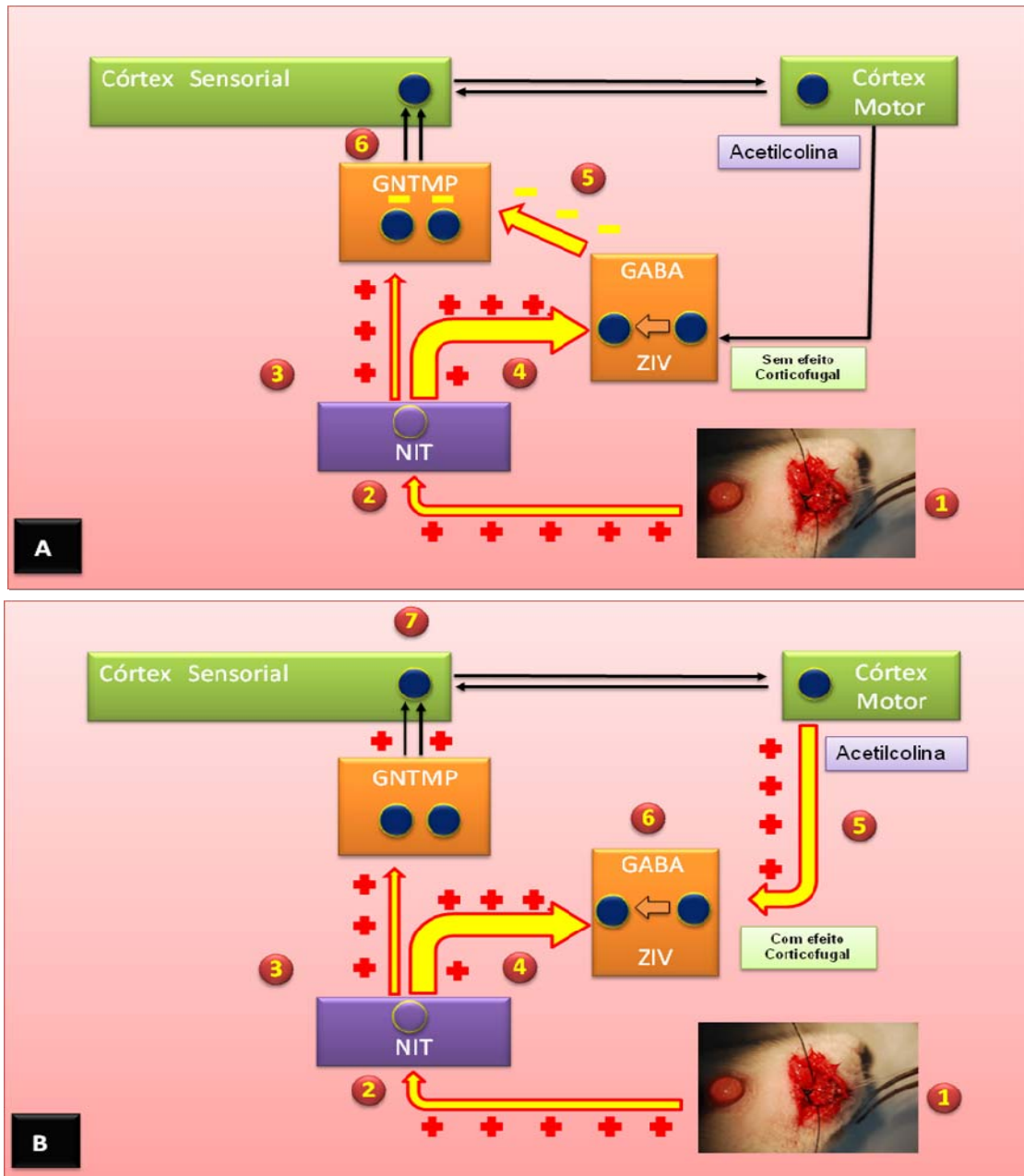


Figura 7. Via leminiscal de excitabilidade cortical a partir da deflecção das vibrissas. **Panel A:** Mecanismos envolvidos na transmissão sináptica sensorial sem o efeito das vias corticofugais motoras. 1- Estimulo sobre as vibrissas; 2- Ativação dos neurônios ao nível do núcleo interlar; 3- Ativação da via NIT-GNTMP; 4- Ativação da via NIT-ZIV-GNTMP; 5- Ação inibitória gabaérgica da ZIV sobre o GNTMP; 6- Ausência de ativação do córtex somatosensorial. **Panel B:** Mecanismos envolvidos na transmissão sináptica sensorial com o efeito das vias corticofugais motoras. 1- Estimulo sobre as vibrissas; 2- Ativação dos neurônios ao nível do núcleo interlar; 3- Ativação da via NIT-GNTMP; 4- Ativação da via NIT-ZIV-GNTMP; 5- Efeito das vias corticofugais do córtex somatosensorial sobre a ZIV; 6- Ausência de ação inibitória da ZIV sobre o GNTMP; 7- Progressão das informações nociceptivas para o córtex somatosensorial. NCT – Núcleo Caudal do Trigêmeo; NIT- núcleo interlar do

1.1.1 NEURALGIA DO TRIGÊMEO (NT).

A neuralgia do trigêmeo pode ser considerada como a pior dor facial já experimentada pelo ser humano [Weigel e Col., 2000]. Em nosso meio, o professor Acir Rachid, renomado clínico, nos ensinou que a neuralgia do trigêmeo era tão desabilitante que foi considerada a principal causa de suicídios nas décadas de 50 e 60 (Informações pessoais). Entretanto estudos recentes com a utilização das novas opções terapêuticas avaliaram o impacto da neuralgia do trigêmeo sobre a qualidade de vida dos pacientes mostrando que após um tratamento clínico adequado a neuralgia do trigêmeo afeta com intensidade moderada a qualidade de vida de seus pacientes [Tölle e Col., 2006].

A dor nativa da neuralgia do trigêmeo, sem influências farmacológicas, caracteriza-se por paroxismos de dor de intensa magnitude, início e término súbito, desencadeada ou não por gatilhos (toque leve dinâmico, falar, alimentar-se, baixas temperaturas, estresse emocional entre outros), localização unilateral (casos bilaterais ocorrem na esclerose múltipla) breve duração, distribuídos em um ou mais ramos do trigêmeo [Merskey H e Bogduk N, 1994]. Alguns pacientes apresentam refratariedade dos pontos e fatores gatilhos após um paroxismo de dor.

A sociedade internacional para o estudo das cefaléias e neuralgias faciais e cranianas classifica a neuralgia do trigêmeo em: 1- Forma clássica e 2- Forma sintomática [Classificação da Sociedade Internacional para os Estudos das Cefaléias e Neuralgias 2004]. Apesar de ambas as formas apresentarem paroxismos de dor com duração de frações de um segundo até dois minutos, na forma sintomática entre os paroxismos de dor o paciente pode apresentar uma dor residual contínua. Uma característica peculiar da forma idiopática é a presença de períodos de remissão intercalados com períodos de recidiva. Os períodos de recidiva vão progressivamente aumentando até o completo desaparecimento dos períodos de remissão [Love S e Coakham HB, 2001].

Dor neuropática como queixa no atendimento médico primário ocorre em 8,2% dos casos, sendo que destes 17% manifestam-se em sua forma crônica [Torrance e Col., 2006]. A neuralgia do trigêmeo é uma dor neuropática com uma incidência anual de 4,7 casos a cada 100 mil habitantes [Katusic e Col., 1991]. Ocorre mais comumente nas mulheres com uma relação de 1.7 com o sexo

masculino. Esta incidência aumenta com o passar da idade. A prevalência de vida da neuralgia do trigêmeo é de 0,7 casos por 1000 habitantes [MacDonald e Col., 2000]. Pacientes sem um tratamento adequado apresentam dores graves em mais de 50% dos casos. A gravidade das dores altera o humor, o relacionamento interpessoal, atividades profissionais, sono e principalmente o prazer em viver [Tolle e Col., 2006].

A apresentação clínica isolada sobre o primeiro ramo do trigêmeo é a forma menos prevalente (4%). A neuralgia do trigêmeo atinge mais o segundo ramo do trigêmeo (17%) e o terceiro ramo do trigêmeo (15%). As associações entre vários ramos tornam esta doença mais importante: segundo e terceiros ramos (32%); primeiro e segundo ramos (14%) os três ramos (17%) [Rozen TD., 2004]. A neuralgia do trigêmeo pode ser idiopática (causas desconhecidas ou compressão do nervo por alças vasculares ao nível da entrada do nervo na ponte) ou sintomática [Classificação Internacional das Cefaléias e Distúrbios 2004]. O diagnóstico etiológico das formas secundárias é extenso e incluem processos expansivos tumorais, infecciosos, infiltrativos, desmielinizantes, genéticos, vasculares e traumáticos [van Kleef e Col., 2009].

Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos com a neuralgia do trigêmeo podem ser explicados por diferentes teorias sendo que mais de 20 foram propostas [Devor M., 2001]. Na forma idiopática o principal achado é a compressão vascular ao nível da entrada da raiz no tronco cerebral (ponte). A compressão vascular sobre a raiz nervosa produz uma perda de mielina (desmielinização axonal) com um aglomerado astrocitário ao redor da lesão, seguidos de graus variados de remielinização [Love S e Coakham HB, 2001]. Estas alterações irão produzir uma geração anormal de impulsos nociceptivos (impulsos ectópicos gerados a partir dos axônios desmielinizados) [Smith CP e McDonald WI, 1982]. Nas formas secundárias a processos compressivos tumorais, infiltrativos e desmielinizante os mecanismos fisiopatológicos estão relacionados com processos compressivos e ou lesões do fluxo axoplasmático dependendo da etiologia relacionada [Love S e Coakham HB, 2001].

O tratamento para neuralgia do trigêmeo consiste de: tratamento farmacológico (medicamentosos via oral) e tratamento intervencionista (procedimentos cirúrgicos). Conforme o consenso da Academia Americana de

Neurologia e da Sociedade de Neurologia da Federação Européia para o tratamento da neuralgia do trigêmeo são considerados drogas de primeira linha [Cruccu e Col., 2008]: carbamazepina (200 à 1200mg) [Campbell e Col., 1966; Davis EH, 1966; Killian JM e Fromm GH, 1968; Nicol CF, 1969]; oxacarbamazepina (600 à 1800mg) [Beydoun A, 2000]. Drogas de segunda escolha incluem: Baclofeno (5 à 10mg) [Fromm e Col., 1984]; lamotrigina 400mg [Zakrzewska e Col., 1997]; pimozide (1 à 4mg) [Lechin e Col., 1989]; tocinide [Lindstrom P e Lindblom U, 1987]. Muitos pacientes não toleram doses mais elevadas destas drogas por produzirem efeitos colaterais como tontura, náuseas e sedação.

O tratamento cirúrgico da NT esta indicado nos casos de refratariedade ao tratamento clínico [Cruccu e Col., 2008]. As opções cirúrgicas incluem: 1- Bloqueio ou destruição distal do nervo trigêmeo [Bittar GT e Graff-Radford SB, 1993; Stajic e Col., 1990]; 2- Rizotomia percutânea química [Hakanson S., 1981] ou mecânica [Mullan S e Lichtor T, 1983]; 3- Cirurgia pela técnica de “Gama Knife” [Fickinger e Col., 2001; Maesawa e Col., 2001; Petit e Col., 2003] e 4- Descompressão microvascular [Piatt JH Jr e Wilkins RH., 1984; Barker e Col., 1996; Broggi e Col., 2000].

O tratamento farmacológico oral atua nos mecanismos fisiopatológicos reduzindo a hiperatividade neural (reduz os focos ectópicos gerados pela lesão), mas não atua na etiologia da doença. O tratamento intervencionista atua na etiologia da doença podendo produzir destruição das estruturas periféricas e ou centrais (dependendo da técnica utilizada). Entre estas duas opções terapêuticas existem os procedimentos de dessensibilização farmacológica (Ver adiante o parágrafo de toxina-botulínica).

1.1.1 NEURALGIA DO TRIGÊMEO (NT) E MODELOS EXPERIMENTAIS.

O desenvolvimento de um modelo experimental a partir da constrição do nervo infra-orbital em animais permitiu um entendimento melhor da fisiopatologia e farmacologia terapêutica na neuralgia do trigêmeo (NT) [Vos e Maciewicz 1991].

Em roedores o nervo infra-orbital é predominantemente sensitivo e corresponde a quase toda divisão maxilar do trigêmeo (é o grande responsável pela inervação das vibrissas, sendo que cada vibrissa é inervada por fibra

única) [Greene EC, 1955; Brodal A, 1981] (Figura 9). Ele é formado por 18 a 25 feixes nervosos, os quais contêm aproximadamente 20.000 fibras mielinizadas e 13.000 fibras não mielinizadas [Jacquin e cols. 1984].

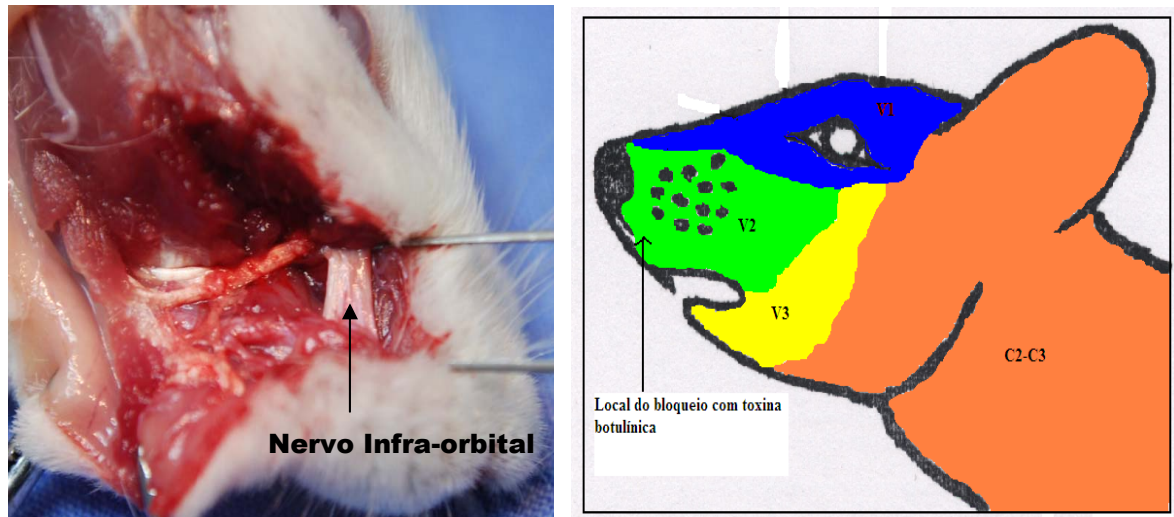


Figura 9 Anatomia do nervo infra-orbital e sua distribuição somatotópica.

Modelos experimentais utilizando constrição crônica do nervo infra-orbital induziram hipernocicepção a estímulos mecânicos, térmicos e químicos (formalina) [Anderson e cols. 1997, Imamura e cols. 1997, Vos e cols. 1994]. Neste modelo os principais achados incluem degeneração parcial do nervo associada com deservação, processo inflamatório perineural e formação de neuroma. Estudos mais complexos relacionados com a fisiopatologia foram principalmente desenvolvidos em modelos de constrição a nervos espinhais [Lekan e cols. 1996, Wiesenfeld-Hallin e Xu 1996, Woolf e cols. 1995]. A principal diferença entre o nervo trigêmeo e os nervos espinhais está relacionada com o “brotamento” de fibras nervosas simpáticas ao redor dos gânglios espinhais, e presença de atividade simpática e parasimpática espontânea, significativamente menor em ramos do nervo trigêmeo (nervo mental) [Benoliel e cols., 2001, Bongenhielm e col., 1999, Grelik e cols., 2005; Tal e Devor, 1992].

1.1.2 - FISIOPATOLOGIA DA DOR NEUROPÁTICA E NEURALGIA DO TRIGÊMEO:

Em condições fisiológicas a eletrogênese do nervo trigêmeo ocorre nas terminações sensoriais da pele e de outros tecidos inervados após uma estimulação sensorial adequada [Devor M, 2006]. Na dor neuropática a eletrogênese (impulsos elétricos) irá originar-se em sítios ectópicos (não fisiológicos) mantendo um estado de hipersensibilização central [Devor M, 2005]. A hiperexcitabilidade da fibra lesada não ocorre por ação sináptica (excesso de sinapses) [Devor M, 2005, ela irá originar-se de um aumento das propriedades eletrogênicas intrínseca da membrana neural [Devor M, 2005]. Dentro desta hiperexcitabilidade da membrana neural os canais de Na^+ ocupam papel importante [Devor M, 2005]. Estes conceitos esclarecem porque na neuralgia do trigêmeo, drogas que reduzem a atividade sináptica (inibidores do glutamato, por exemplo) são pouco efetivas, entretanto drogas que promovem uma estabilidade da membrana neuronal (carbamazepina, por exemplo) são altamente eficazes [Devor M, 2006; Caterrall WA, 1987].

Lesões sobre os nervos periféricos, gânglio e raízes podem gerar a dor neuropática trigeminal (traumáticas, vascular, metabólica, bacteriana, infecções virais, inflamação, autoimune, radiação ionizante, anormalidades genéticas e neurotoxinas) [Devor M, 2006]. A lesão neuronal irá promover uma desmielinização e axoniopatia alterando desta forma o transporte axoplasmático e a atividade metabólica do axônio (axionotomia) [Devor M., 2006]. Estas alterações irão gerar um remodelamento elétrico intrínseco da membrana celular. Como a eletrogenese é uma função dos canais de Na^+ , quando os mesmos estão em repouso os canais se fecham, durante um estímulo periférico os canais de Na^+ abrem permitindo o fluxo deste íon para o interior da célula gerando potenciais elétricos para a despolarização das mesmas [Devor M., 2006]. Para a repolarização das células ocorre um fechamento dos canais de Na^+ e abertura dos canais de K^+ .

A capacidade de uma lesão neuronal trigeminal iniciar um foco ectópico, e mantê-lo até produzir hipersensibilização cortical dependerá da quantidade de canais de Na^+ expressos [Devor M., 2006]. Axionotomia (ou bloqueio do transporte e das funções axonioplasmáticas) induz um acúmulo local de

vesículas axonioplasmáticas carregadas de canais de sódio aumentando a densidade de canais no local da injúria e alterando a este nível as características eletrogênicas da fibra do nervo trigêmeo [Devor M., 2006]. Um processo de desmielinização sem axionotomia pode também induzir um remodelamento da membrana celular [Devor M., 2006]. Em modelos animais e em humanos com dor neuropática crônica, associados com desmielinização ou com axionotomia a expressão aumentada dos canais de Na são os achados predominantes [Kretschmer e Col., 2002]. Outras moléculas geradoras de excitabilidade neuronal podem acumular-se gerando aumento da sensibilidade a estímulos: mecânicos (Von-Frey teste); térmicos (teste do – 20 graus Celsius) e a outros agentes químicos (teste da formalina 2,5%) [Devor M, 2006].

A membrana axonal, em condições normais de mielinização, contém uma quantidade baixa de canais de Na⁺ presumidamente porque a mielina impede esta inserção [Devor M., 2006]. Durante o processo de desmielinização, rebotamento axonal e de formação de novos terminais axoplasmáticos esta supressão é inibida havendo inserção de um grande número dos canais de Na⁺ [Devor M, 2006].

Para que um estímulo térmico (frio) possa gerar um potencial de ação e conseqüente propagação para o sistema nervoso central existe a necessidade que os canais de sódio voltagem dependente sejam ativados [Zimmermann K e Col., 2007]. A cinética destes canais, podem ser rápida (Na_v1.7) ou lenta (Na_v1.8 e Na_v1.9) [Akopian AN e Col., 1996; Brock JA e Col., 1998]. Os canais de Na⁺ com cinética rápida são bloqueados pela tetrodotoxina (TTX) e os canais lentos (Na_v1.8 e Na_v1.9) não sofrem este bloqueio [Akopian AN e Col., 1996]. O Nav1.8 é expresso exclusivamente em neurônios sensoriais (nervo trigêmeo sensorial, por exemplo) com um alto limiar de ativação, sendo o único capaz de gerar potenciais de ação na presença do TTX [Brock JA e Col., 1998; Zimmermann K e Col., 2007]. Em ratos as fibras do tipo C expostas a TTX não respondem a estímulos térmicos (superior a 30⁰C), entretanto mantém resposta a estímulos térmicos (baixas temperaturas) sugerindo que os estímulos térmicos à baixas temperaturas são mediados pelos receptores Na_v1.8 [Blair NT e Bean BP., 2002; Zimmermann K e Col., 2007]. Os receptores de canais de K⁺ (TREK 1, TREK 2 e TRAAK), quando reduzem sua atividade, geram desequilíbrio iônico intracelular

potencializando a eletrogênese na axoniotomia (TREK 1, TREK 2 e TRAAK) [Yamamoto e Col., 2009] .

Potenciais elétricos sensoriais periféricos são integrados ao sistema nervoso central a partir de mecanismos moleculares transitórios induzidos por diferentes estímulos periféricos. Estes mecanismos de integração são também gerados por potenciais receptores transitórios (TRP) [Jhaveri e cols. 2005, Walker e cols. 2003]. De acordo com o agente desencadeador, diferentes receptores transitórios serão ativados: TRPV1 (receptor químico, capsaicina) [Holzer 1991, Hiura, 2000]; endocabinóides e produtos da lipoxigenase [Caterina e Col., 1997; Zygmnt e Col., 1999; Hwang e Col., 2000; Smart e Col., 2000]; bradicinina e fator de crescimento neural [Chuang e Col., 2001] e térmico (frio – 170C) potencial receptor transitório a anquirina-1 (TRPA1) [Davis e Pope 2002; Story e cols., 2003]. O TRPV₁ e TRPA₁ são expressos nas fibras trigeminais de pequeno diâmetro (fibras do tipo C) [Kobayashi e cols., 2005, Story e cols., 2003]. Na neuralgia do trigêmeo o TRPA₁ medeia a hiperalgesia ao frio [Breese e cols., 2005, Jhaveri e cols., 2005, Karai e cols., 2004, Obata e cols., 2004].

A participação dos potenciais receptores transitórios (TRPA1 e TRPV1) na nocicepção trigeminal tem sido comprovada também em outros estudos [McKemy DD e Col., 2002; Nagata K e Col., 2005; Kobayashi K e Col., 2005; Damann N e Col., 2006; Liu L e Col., 2007; Bang S e Col., 2007; Taylor-Clark TE e Col., 2008; Meseguer V e Col., 2008; Bessac BF e Col., 2008; Karashima Y e Col., 2008; Takahashi N e Col., 2008; Roy e Col., 2009; Salas e Col., 2009; Karashima e Col., 2009].

1.2 - TOXINA BOTULÍNICA:

1.2.1 – HISTÓRIA DA TOXINA BOTULÍNICA:

Relatos clínicos do final do século 18 descreveram morte após a utilização de derivados de carne ou salsichas [Grüsser 1986]. Clinicamente estes pacientes apresentavam midríase e paralisia muscular progressiva o que motivou um primeiro diagnóstico como sendo intoxicação por atropina. Em julho de 1802 o reinado de Stuttgart publicou um alerta dos perigos do consumo deste tipo de alimento. Em agosto de 1811 o departamento interno do reino de Württemberg alertou os seus súditos quanto aos riscos destes

alimentos chamando pela primeira vez como “sausage poisoning” atribuindo estes sintomas ao ácido hidrocianico ou ácido prússico.

O médico alemão Justinus Kerner em 1817 relatou o seu primeiro caso de intoxicação alimentar fatal [Kerner 1817]. Em 1820 Kerner após observação de outros casos publicou sua primeira monografia (sausage poisoning) no qual resumizou a observação de 76 casos utilizando pela primeira vez a expressão botulismo [Kerner 1820]. Em 1822 Kerner publicou 155 casos sugerindo que o veneno das salsichas era causado pelo botulismo [Kerner 1822]. A tese apresentava uma descrição apurada dos sintomas musculares e detalhes clínicos dos distúrbios autonômicos, ocorrendo no botulismo: midriase; redução da produção do lacrimejamento; diminuição da produção das glândulas salivares; paralisia da bexiga e do trato gastrointestinal. Kerner após estes estudos concluiu que: 1- o veneno das salsichas desenvolvia-se em salsichas estragadas e em condições anaeróbicas; 2- a toxina atuava sobre os nervos motores e sobre o sistema autonômico; 3- a toxina era forte e letal. No oitavo capítulo de sua monografia [Kerner 1822] ele especulou sobre a utilização desta toxina com o propósito terapêutico (Pequenas doses desta toxina são úteis em situações patológicas de hiperexcitabilidade do sistema nervoso). Por todos estes achados o botulismo foi também conhecido como “Desordem de Kerner”. O termo botulismo (do lat. *botùlus, i /chouriço, morcela, salsicha*) introduzida na metade do século 19 refere-se ao veneno originado da salsicha e não a aparência de uma salsicha que apresenta o bacilo [Torrens 1998].

Em dezembro de 1895, em um pequeno vilarejo Belga (Ellezelles) durante um funeral, presunto defumado foi servido aos convidados. Destes, 34 desenvolveram sintomas como midriase, diplopia, disfagia, disartria e paralisia muscular progressiva. Dez pacientes morreram. O microbiologista Emile Pierre Marie van Ermengem da Universidade de Ghent conduziu a investigação destes casos [Devriese 1999]. Van Ermengem foi o primeiro a correlacionar o envenenamento por salsicha com um microorganismo anaeróbico que foi encontrado no presunto ingerido durante aquele funeral. Van Ermengem chamou esta toxina como “*Bacillus botulinus*” estes achados foram publicados em um jornal alemão de microbiologia em 1897 e republicado para o Inglês em

1979. Este patógeno foi nomeado nesta ocasião de “*Clostridium botulinum*” [van Ermengem 1987].

Em 1919 Georgina Burke identificou dois tipos sorológicos do *Clostridium botulinum* (tipo A e tipo B) [Burke 1919]. Os outros subtipos foram identificados nos próximos anos. Em 1949 Burgen descobriu que a toxina botulínica bloqueava a secreção de acetilcolina na junção neuromuscular [Burgen e cols. 1949]. Em 1992 Giampetro Schiavo e colaboradores descobriram que o tétano e a toxina botulínica são metaloproteases e que possuem ação específica sobre a proteína SNARE [Schiavo e cols. 1992].

1.2.2 MICROBIOLOGIA DA TOXINA BOTULÍNICA:

A neurotoxina botulínica (NTBo) é a mais potente toxina biológica conhecida pelo homem [Smith e cols.,2002]. Ela é responsável por uma grande variedade de doenças associadas à alimentação, conhecidas como botulismo, sendo que a dose letal é de 10^{-9} g/Kg do peso corpóreo [Gill 1982]. A administração de doses terapêuticas tem sido utilizadas para o tratamento de distúrbios neuromusculares incluindo a distonia e espasticidade.

A bactéria gram-positiva, *Clostridium botulinum*, produz sete neurotoxinas designadas como: A, B, C1, D, E, F e G. As toxinas botulínicas são sintetizadas como cadeia simples de polipeptídios com uma massa molecular aproximada de 150 kDa [Aoki 2003]. Quando isoladas em culturas de bactérias as NTBo's são complexos macromoleculares variando o seu peso molecular de 300-kDa até 900-kDa, constituindo-se de moléculas de exotoxina com 150-KDa e o restante de proteínas não toxinas [Brin 1997]. Estas proteínas estão envolvidas dentro do tráfego vesicular e na fusão com alvos de membrana dentro das células. A NTBo-A e a neurotoxina botulínica do tipo E NTBo-E quebram a proteína SNAP-25 [Rosetto e cols. 2002]. A proteína SNAP-25 é fundamental para a formação do complexo SNARE.

O complexo SNARE é uma estrutura protéica celular que conecta vesículas contentoras dos neurotransmissores com a superfície celular e sua subsequente liberação (Figura 10).

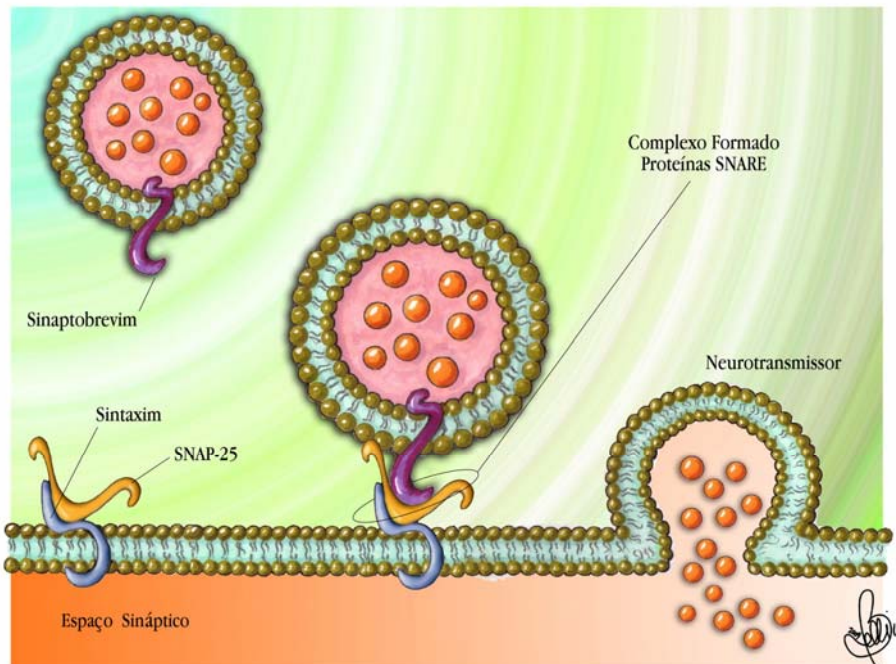


Figura 10 - Formação do complexo SNARE a partir das três proteínas básicas: sinaptobrevim; SNAP-25 e Sintaxim. Formação da exocitose e liberação dos neurotransmissores.
* (Figura realizada pela pintora Beatrice Bellini – Roma – Itália, utilizando informações da literatura médica)

O mecanismo de ação da NTBo sobre a liberação dos neurotransmissores estão relacionados com a alteração da função protéica intracelular atuando sobre três alvos: 1- Proteína Sinaptossomal com peso molecular de 25KDa (SNAP-25); 2- Proteína de membrana associada a vesículas (VAMP) ou também conhecida como sinaptobrevim; 3- Sintaxim. Estas três proteínas associam-se formando um complexo ternário. A proteína SNAP irá ligar-se aos receptores de membrana (SNAREs). O complexo SNARE atua como função essencial dentro da exocitose por conectar as membranas vesiculares à membrana plasmática possibilitando desta maneira a exocitose dos neurotransmissores. A NTBo impede esta formação (Figura 11) [McMahon e cols.1992].

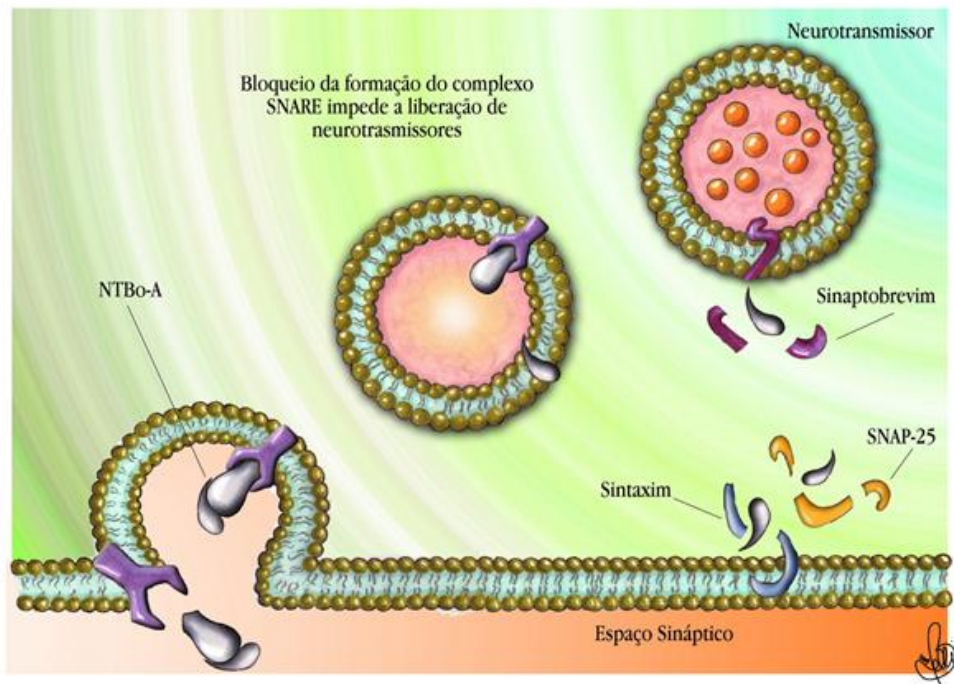


Figura 11 - Interiorização da neurotoxina botulínica e seu efeito inibidor sobre o complexo SNARE incapacitando a liberação dos neurotransmissores.

* (Figura realizada pela pintora Beatrice Bellini – Roma – Italia, utilizando informações da literatura médica)

1.2.3- TOXINA BOTULÍNICA E NEUROTRANSMISSORES:

A neurotoxina botulínica do tipo A (NTBo-A) inibe a secreção excitatória da acetilcolina ao nível dos terminais nervosos motores [Simpson 1981], uma propriedade útil no tratamento de muitas condições patológicas que envolvem uma excessiva contração muscular [Jankovic 2004]. As primeiras observações mostraram que a NTBo-A promovia uma redução na dor em pacientes portadores de distonia muito antes que estes músculos apresentassem qualquer grau de relaxamento sugerindo que a mesma poderia ter efeito sobre outros sítios além dos já relatados ao nível da junção neuromuscular. Além de inibir a liberação da acetilcolina ela pode também inibir a secreção de outros neurotransmissores como a norepinefrina [Bigalke e cols. 1981], substância P [Welch e cols. 2000], Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) [Chuang e cols. 2004, Durham e cols. 2004] e glutamato [Cui e cols. 2004].

1.2.4 – INDICAÇÕES MÉDICAS DA TOXINA BOTULÍNICA:

Os primeiros relatos da utilização da NTBo/A ocorreram em pacientes voluntários sadios e em pacientes portadores de estrabismo em 1977 [Scott 1979]. Foi inicialmente aprovada pelo FDA em 1989 na indicação para blefaroespasma e para estrabismo [Ting e Freiman 2004].

A aplicação da NTBo-A tem sido sugerida no tratamento da rinite alérgica [Kim e cols.1998, Wen e cols.,2004], hiper-hidrose em região axilar, palmar e em sola dos pés [Odderson 1998], prurido em pacientes portadores de líquen simples crônico [Heckmann e cols,2002], blefaroespasma, espasmos hemifaciais, distonia cervical, distonias em extremidades focais superior e inferior, distonia laríngea, tics motores e tremor essencial em extremidade superior [Simpson e cols. 2008]. A NTBo-A mostra boa indicação na espasticidade [Simpson e cols. 2008-B], indicações estéticas [Lowe 2007], gastrointestinais (fissura anal) [Sileri e cols. 2007] obesidade maligna [Garcia-Compean e Maldonado 2008] e urológicas (dissnergia esfinteriana) [Karsenty e cols. 2006].

1.2.5 – O EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA TOXINA BOTULÍNICA.

1.2.5.1 - RECEPTORES VANILÓIDES (TRPV1) E TOXINA BOTULÍNICA

O TRPV1 é um receptor transitório de potencial de canais, cuja estrutura assemelha-se à família dos canais de voltagem dependentes portão potássio e portão nucleotídeo cíclico. O TRPV1 é encontrado nos nociceptores que participam da transdução de estímulos químicos e térmicos nos terminais nervosos sensoriais dentro do tecido periférico [Caterina e Julius 2001].

O TRPV1 está associado com proteínas Syt IX e Snapin que são dois componentes do SNARE exocitose dependente em células excitáveis. Estas interações fazem com que os receptores de TRPV1, que estão localizados dentro de membranas citoplasmáticas, sejam translocadas para a superfície celular, formem canais e promovam alterações iônicas (cálcio dependentes) entre o meio intracelular e extracelular; em decorrência disto os receptores TRPV1 são conhecidos como pockets (bolsos) de transporte citoplasmático [Nakara e cols. 1997, Nakata e cols. 1998] (Figura 12).

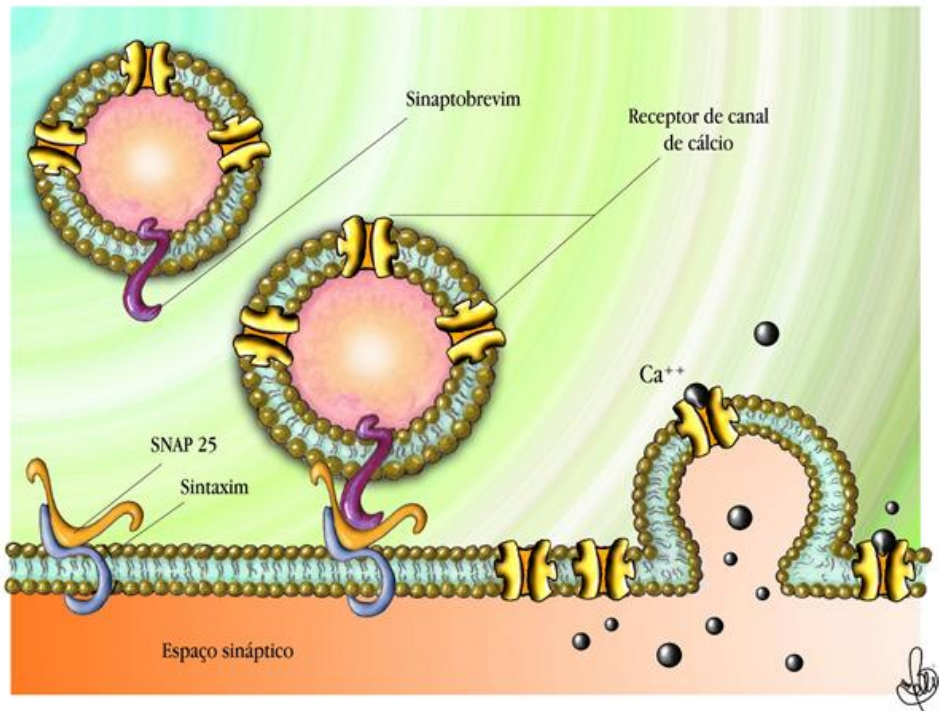


Figura 12 - Mecanismos envolvidos na expressão dos receptores do TRPV1 em resposta a estímulos nociceptivos.

* (Figura realizada pela pintora Beatrice Bellini – Roma – Italia, utilizando informações da literatura médica)

Como o TRPV1 é um receptor de cálcio e tempo dependente, possui um estado refratário de longa duração, no qual os receptores não respondem a estímulos vanilóides e outros estímulos [Julius e Basbaum 2001]. A ação dos canais de TRPV1 é hiper-estimulada por mediadores inflamatórios através da ativação da fosfolipase C, proteína quinase A (PKA) e proteína quinase C (PKC) [Premkumar e Ahern 2000].

O aumento da expressão do TRPV1 dentro dos nociceptores periféricos é importante para manutenção dos estados de hiperalgesia inflamatória [Amaya e cols. 2003, Ji e cols. 2002]. Desta maneira a NTBo-A bloqueia a translocação de membrana dos receptores do TRPV1 induzidas pela PKC impedindo a ativação destes receptores [Palao e cols.,2004] (Figura 13).

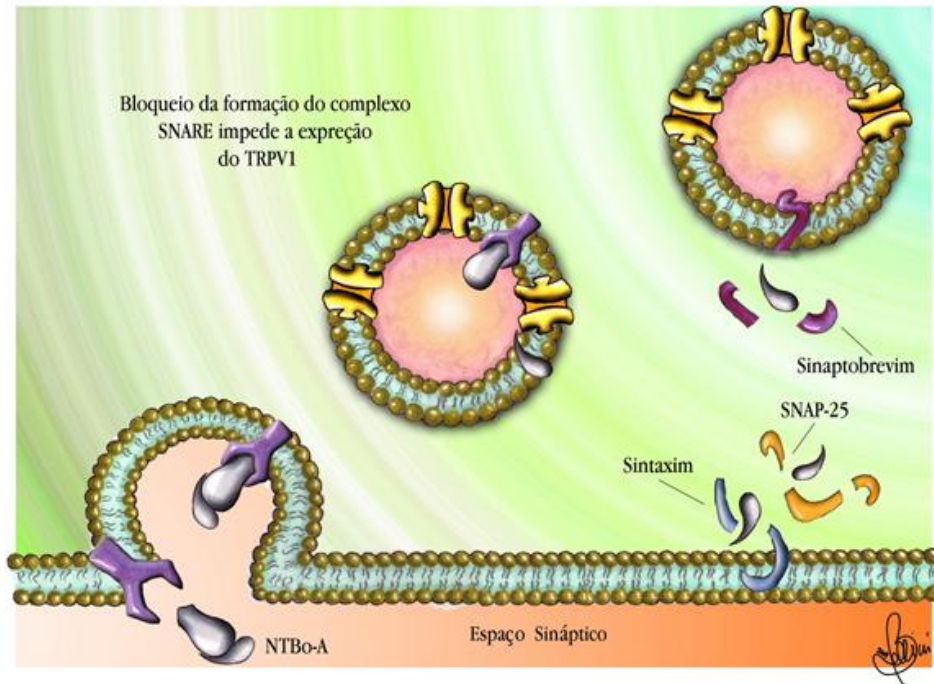


Figura 13 - Ação da NTBo-A sobre a expressão dos receptores TRPV1. O bloqueio da expressão dos receptores TRPV1 impede a sensibilização dos nociceptores periféricos. (Figura realizada pela pintora Beatrice Bellini – Roma – Italia, utilizando informações da literatura médica)

1.2.5.2 - EXPRESSÃO DO TRPV1 NO SISTEMA NOCICEPTIVO TRIGEMINAL.

Lesões experimentais sobre o ramo mandibular do nervo trigêmeo produzem uma expressão do TRPV1. Esta expressão retorna ao normal aproximadamente 60 dias após a injúria inicial [Kim e cols. 2008]. Aplicação de óleo de turpentina sobre a face de ratos reduziu significativamente os limiares de percepção térmica do primeiro até o décimo quarto dia. A expressão dos receptores do TRPV1 no gânglio do trigêmeo e periféricamente foram significativamente maiores desde o primeiro até o 14^o dia pós injúria, sendo o pico no sétimo dia. As fibras mais afetadas foram as de pequeno calibre (desmielinizadas ou fibras do tipo C) e de médio calibre (pouco mielinizadas ou fibras A-delta). As regiões do núcleo caudal mais afetadas foram a lâmina I e

llo. A expressão dos receptores TRPV1 irá voltar ao normal somente 21 dias após [Pei e cols. 2007].

Lesões sobre o nervo lingual (ramo do trigêmeo) mostraram que a expressão dos receptores do TRPV1 encontra-se aumentada periféricamente e normais dentro do gânglio do trigêmeo três dias após. Após três semanas a expressão dos receptores do TRPV1 permanecem elevadas no local da lesão, entretanto, a expressão dentro do gânglio do trigêmeo agora se mostra elevada. Três meses após, tanto a avaliação do sítio da lesão como do gânglio a expressão dos receptores de TRPV1 encontravam-se semelhantes aos controles. O estudo sugere que lesões sobre o nervo promovem um aumento do transporte dos receptores de TRPV1 do corpo celular em direção aos axônios lesados que posteriormente é acompanhado por um aumento na produção do TRPV1 ao nível do corpo celular (gânglio do trigêmeo) [Biggs e cols. 2007].

1.3 - TESTE DA FORMALINA (TF):

1.3.1 – CONCEITOS BÁSICOS.

O teste da formalina (TF) realizado sobre a região orofacial tem por objetivo medir os processos nociceptivos dentro desta região [Clavelou 1989]. A resposta após injeção subcutânea de formalina é bifásica: A- Primeira fase, precoce, fásica ou neurogênica, é uma fase de curta duração (0 a 3 minutos) acompanhada de um período quiescente (sem respostas comportamentais) com duração média de 3-12 minutos; B- Segunda fase, tônica, inflamatória ou tardia, inicia-se após 12 minutos com duração média de 30 minutos (Figura 14). O volume de formalina utilizado é de 50µl em concentração de 2,5%. Para que a formalina atinga o máximo de efeito deve ser injetada dentro do lábio superior, imediatamente lateral ao nariz, local de alta concentração de fibras trigeminais [Raboisson e Dallel 2004] (Figura 6).

Após a inoculação da formalina o animal tenta retirar a cabeça seguida por uma vocalização. Quando o animal retorna ao recipiente de avaliação após

um curto período de 15 a 30 segundos começa a demonstrar episódios sustentados de coçar a face com as patas anteriores e eventualmente até com as patas posteriores. Estes movimentos são realizados pelas patas ipsilaterais e contralaterais. Durante o teste os animais podem inclusive pular com suas patas posteriores. O número de segundos que o animal gasta coçando a área injetada durante a fase I e fase II é definida como o escore nociceptivo.

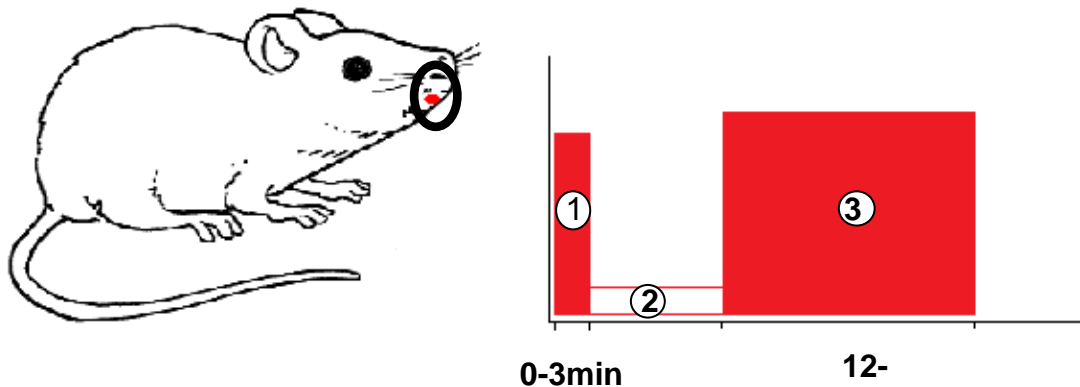


FIGURA 14 - LOCAL DE INJEÇÃO DA FORMALINA E RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS BIFÁSICA DO ANIMAL: 1- FASE I; 2- PERÍODO DE QUIESCÊNCIA; 3- FASE II.

Na tentativa de entender os sintomas clínicos, pesquisadores injetaram sobre si mesmos a formalina observando as seguintes características: Fase I - Dor inicial aguda, em queimação, intensidade entre três a cinco pontos na escala visual analógica de dor, duração de até quatro ou cinco minutos; Fase II – Período assintomático, duração até 12 minutos; Fase III – Dor tipo pulsátil, progressão em sua intensidade até 10 na escala visual analógica da dor, duração de 30 à 60 minutos [Dubuisson e Dennis 1977]. O teste da formalina orofacial representa um modelo de nocicepção cutânea persistente dentro da região trigeminal. Este teste está conectado com uma lesão tecidual, podendo mimetizar em alguns aspectos uma dor aguda pós injúria no ser humano (Figura 15).

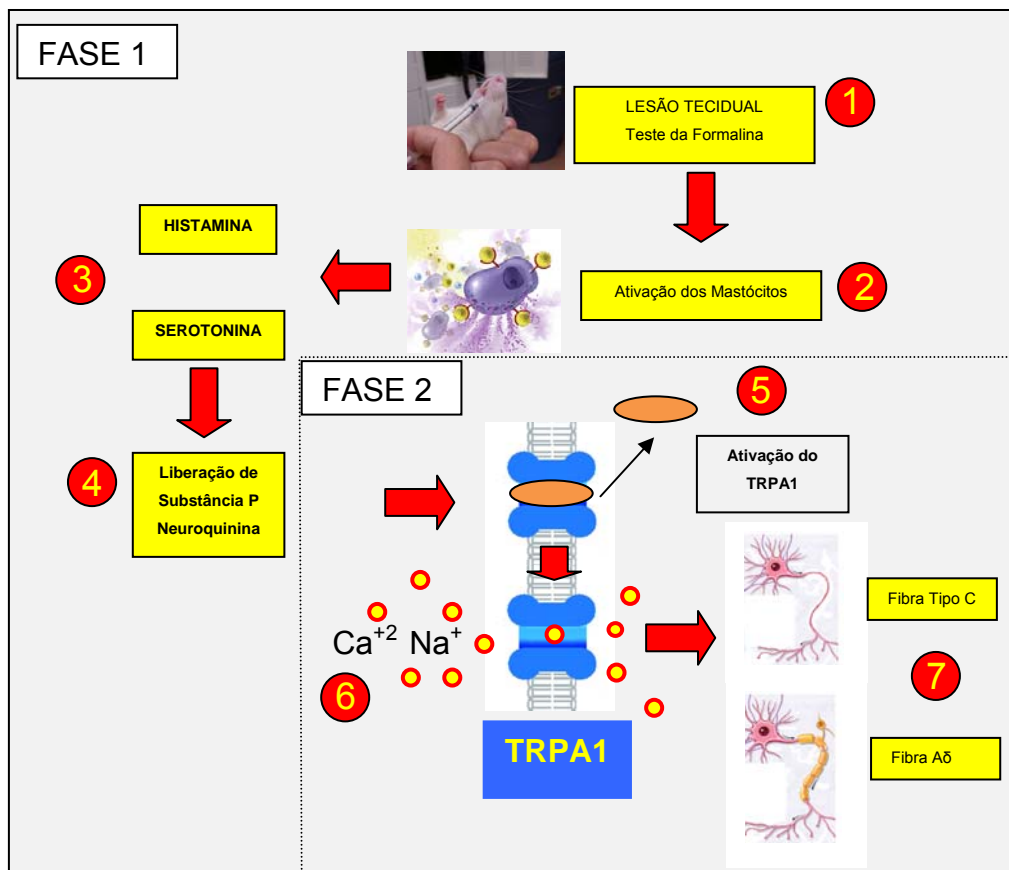


Figura 15 – Teste da formalina: 1- Inoculação da formalina com lesão tecidual; 2- Ativação dos mastócitos; 3- Liberação de histamina e serotonina; 4- Liberação de substância P e neuroquinina; 5- Ativação dos receptores do TRPA1; 6- Influxo de Cálcio e Sódio; 7 – Ativação das fibras do tipo C e A delta.

Este teste é induzido por um estímulo nociceptivo promovendo uma resposta comportamental motora (movimentos de coçar ou lambem o local da injúria). As vias que controlam esta resposta motora são distintas das nociceptivas [Wang e Redgrave 1997]. Uma vez que a nocicepção do animal é avaliada indiretamente através da resposta motora, quando utilizamos este modelo de dor orofacial devemos ter certeza que a droga utilizada não influencia a atividade motora. A nocicepção induzida pela formalina é mediada pela ativação direta dos receptores de TRPA1 [McNamara e cols. 2007] e pela secreção periférica de serotonina e histamina [Parada e cols. 2001] ao nível das fibras Aδ e do tipo C localizadas próximas e distantes do local da inoculação

[Dickenson e Sullivan 1987, Raboisson e cols. 1991, Puig e Sorkin 1995, Clavelou e cols. 1995] (Figura 15).

A estimulação destas fibras produz uma sensibilização central e periférica dos neurônios do corno dorsal da medula espinhal, promovendo a expressão da proteína c-Fos dentro do cordão espinhal [Tjolsen Alberge e cols. 1992]. Ela também produz um aumento da produção da SP, imunoreatividade do CGRP dentro do corno dorsal da medula espinhal [Calcutt e cols. 2000, Holland e Goldstein 1990, Holland e Goldstein 1994, Honor e cols. 1999, Zhang e cols. 1994]. O TF é um modelo de dor inflamatória [Dubuisson e Dennis 1977, Tjolsen e cols. 1992, Wheeler-Aceto e cols. 1991]. A dor produzida pela primeira fase do TF é decorrente da estimulação química sobre os nociceptores periféricos e a segunda fase secundária a hiperestimulação central causada por mediadores inflamatórios (NK, SP, CGRP) produzidos durante a primeira fase ao nível do cordão espinhal (hipersensibilização central) [Cao e cols. 1998, Coderre e cols. 1990, Coderre e cols. 1993, Dickenson e Sullivan 1987, Haley e cols. 1990, Taylor e cols. 1995; Tjolsen e cols. 1992, Wheeler-Aceto e Cowan 1991].

A formalina produz um aumento na concentração da acetilcolina (Ach) motivado pela redução em sua reabsorção [Honda e cols. 2000]. A formalina produz um estímulo nocivo que é transferido para os interneurônios colinérgicos localizados no cordão espinhal via fibras do tipo C [Baber e cols. 1984, Todd e Spike 1993]. A liberação da SP produz também estímulos para a secreção de acetilcolina dentro do cordão espinhal durante a fase II do TF [Yamamoto e Yaksh 1991]. Acetilcolina livre irá atuar sobre receptores muscarínicos pré-sinápticos (M3) das fibras Gabaérgicas induzindo a liberação do ácido gaba aminobutírico (GABA) [Baba e cols. 1998]. O GABA irá ativar os receptores pré-sinápticos (GABA-B) das fibras glutamatérgicas inibindo desta maneira a liberação do glutamato (Glu), neurotransmissor excitatório (algogênico) [Chery e De Konick 2000, Iyadomi e cols. 2000] (Figura 16). Injeção intratecal de inibidores da acetilcolinesterase (neostigmine) aumenta os níveis de Ach circulantes no cordão espinhal, inibindo somente a fase inflamatória do TF [Bouaziz e cols. 1995, Eisenach e Gebhart 1995, Honda e cols. 2000, Naguib e Yaksh 1997]. Outros estudos mostraram que baixas doses de neostigmine podem inibir a fase neurogênica e altas doses podem inibir ambas as fases [Prado e Gonçalves 1997].

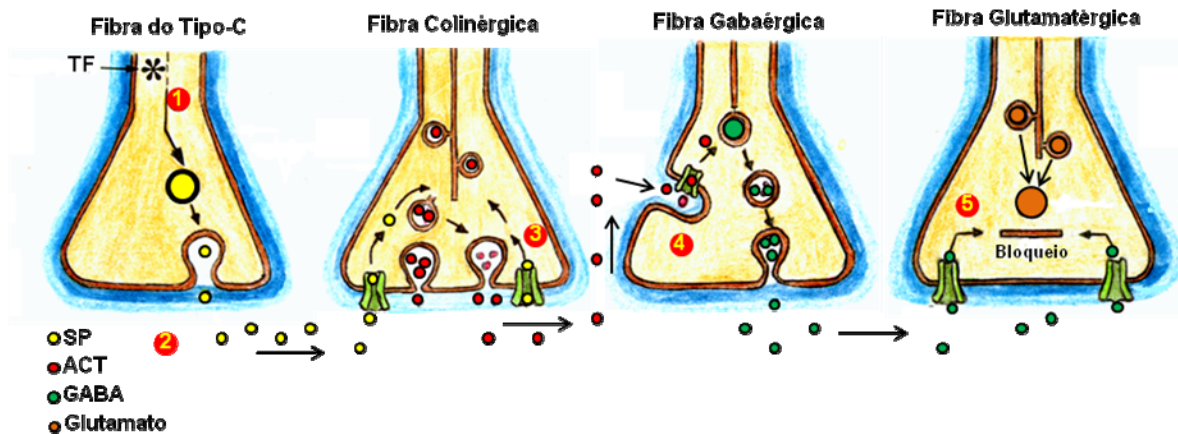


Figura 16 - Mecanismos envolvidos na neuromodulação nociceptiva ao nível do cordão dorsal espinhal: 1- Ativação de nociceptores do tipo C após TF; 2- Liberação da SP; 3-Ativação de interneurônios colinérgicos com subsequente liberação de ACT; 4-Estimulação gabaérgica pela ACT liberando o GABA; 5- Inibição gabaérgica sobre a fibra glutamatérgica inibindo a liberação do glutamato. TF- Teste da formalina, SP-substância P, Ach – acetilcolina; GABA- ácido gamaaminobutírico

A formalina sobre a superfície plantar de ratos também produz uma resposta bifásica em registros neurofisiológicos sobre neurônios do corno dorsal da medula [Chapman e cols. 1994, Dickenson e Sullivan 1987, Pitcher e Henry 2002]. O pico da fase neurogênica ocorre através de uma intensa excitação dos neurônios imediatamente após o TF. Segue-se de interfase caracterizada por uma baixa atividade dos neurônios entre 10 e 20 minutos. Durante a fase inflamatória, uma excitação neuronal reinicia, com pico entre 35 a 45 minutos após TF.

1.3.2- FORMALINA, SUBSTÂNCIA P E ALTERAÇÕES DE SEUS RECEPTORES.

A SP é uma taquiquinina que ativa os receptores de neuroquinina (NK1) com funções inflamatórias e sensoriais. A SP é considerada como uma importante mediadora das informações nociceptivas dentro do sistema nervoso central [McCarson e Krause 1996, Otsuka e Yanagisawa 1987, Pernow 1983]. Terminais nervosos contendo SP foram identificados no corno dorsal da medula [Yashpal e colaboradores 1990; DeKoninck e cols. 1992] bem como receptores específicos para NK1 [Radhakrishnan e Henry 1991]. Bloqueadores dos receptores de NK1 impedem a nocicepção induzida pela formalina [McCarson e Krause 1996, Radhakrishnan e Henry 1991].

Após a aplicação da formalina sobre as patas de ratos observa-se um aumento da expressão do gene dos receptores de NK1 ao nível do cordão dorsal da medula espinhal [McCarson e Krause 1996, Allen e cols. 2003]. Os níveis de RNA mensageiro para o receptor do NK1 estão elevados 24 horas após o teste. Este aumento ocorre pela ativação dos agonistas do NK1 e por um aumento da atividade elétrica dentro da medula espinhal [Allen e cols. 2003].

Antagonistas dos receptores de NK1 bloqueiam a resposta nociceptiva e a expressão do gene do receptor NK1 após o TF [McCarson e Krause 1995, McCarson e Krause 1996, Otsuka 1987, Pernow 1983, Radhakrishnan e Henry 1991].

A formalina também induz alterações nos receptores de serotonina, histamina e TRPA1 [McNamara e cols. 2007]. Estas alterações promovem liberação de substância P com ativação secundária dos receptores para neurocinina. Todas estas alterações irão induzir a fase neurogênica e posteriormente alterações na produção de glutamato, GABA, acetilcolina, CGRP levando a uma hipersensibilização central (figura 7).

1.3.3 – TOXINA BOTULÍNICA E TESTE DA FORMALINA.

Administração subcutânea de NTBo-A inibe a dor inflamatória induzida pela formalina em modelos experimentais [Cui e cols. 2004]. Esta resposta ocorre pela redução na liberação de neurotransmissores periféricos [Cui e cols. 2002]. A expressão da proteína C-fos apresenta importante redução após o tratamento utilizando a NTBo-A quando comparado com grupo controle (solução salina) [Cui e cols. 2004].

Avaliação neurofisiológica com registro extracelular de neurônios de campo receptivo amplo (WDR) do corno dorsal da medula mostraram uma importante redução na excitação neuronal durante a fase inflamatória chegando até uma inibição de até 93% desta atividade após a utilização de NTBo-A 15 ou 30 U/Kg quando comparados com os animais tratados com soro fisiológico [Aoki 2005]. A figura 17 resume os efeitos da NTBo-A sobre o TF.

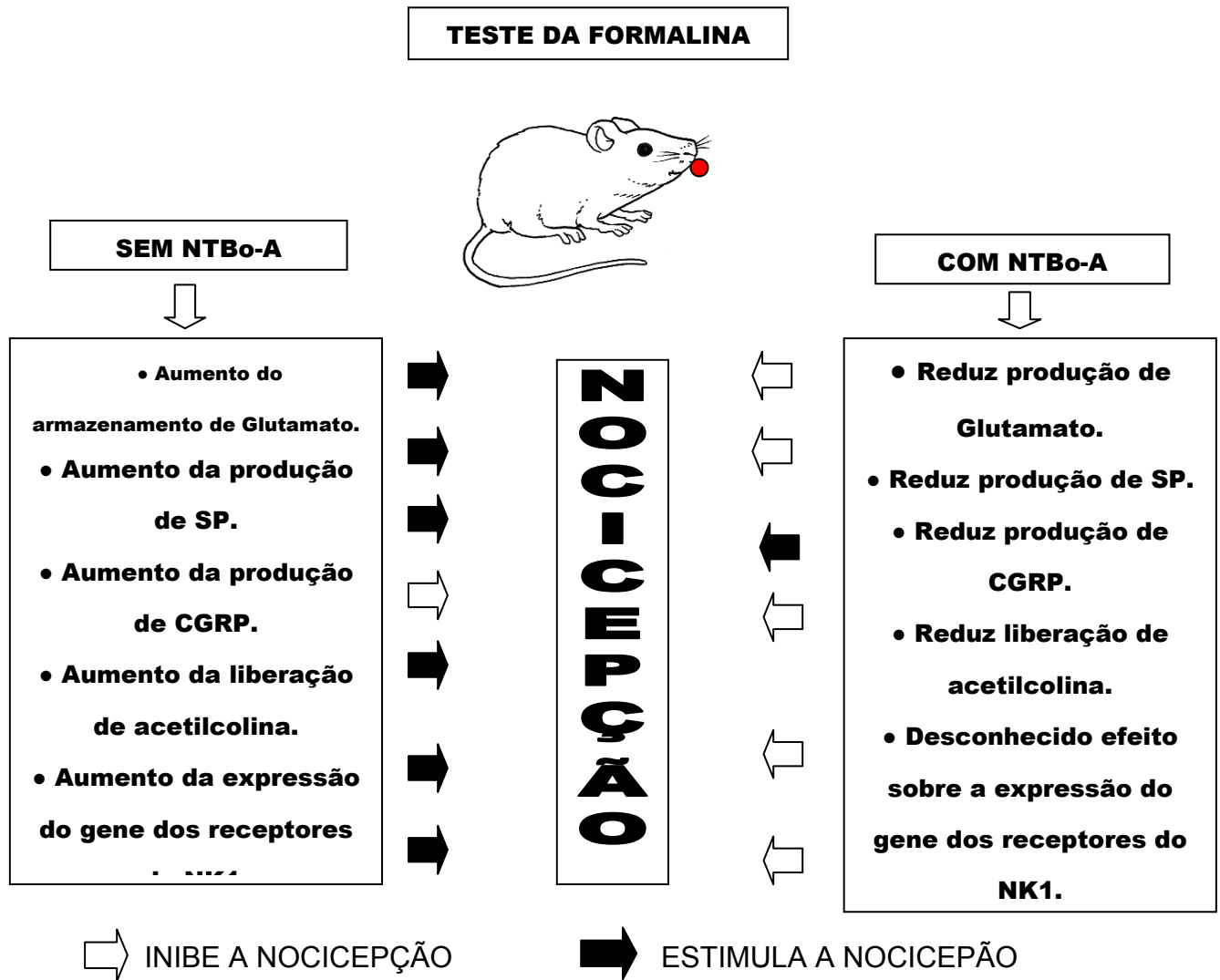


FIGURA 17 - TESTE DA FORMALINA E EFEITO DA NTBo-A. RESUMO DOS PRINCIPAIS MECANISMOS NEUROFISIOLÓGICOS RELACIONADOS AO EFEITO DA NTBo-A SOBRE A NOCICEPÇÃO

1.3.4 – TOXINA BOTULÍNICA – GLUTAMATO E TESTE DA FORMALINA.

A liberação do glutamato estimula localmente os nociceptores através da ativação dos receptores periféricos aferentes [Coggeshall e Carlton 1998]. A aplicação exógena de glutamato induz comportamentos nociceptivos tanto em animais como em seres humanos [Svensson e cols. 2003, Zhou e cols.1996] e secundariamente um aumento no número de receptores dentro dos terminais nociceptivos periféricos [Carlton e Coggeshall 1999]. É provável que a NTBo-A atenua a dor inflamatória no modelo de formalina 2,5% por reduzir a liberação do glutamato [Cui e cols.,2004].

Desde que a segunda fase do TF é mantida por aferências periféricas e ou sensibilização central originadas da fase neurogênica [Abbadie e cols. 1997, Coderre e cols.1990, Dickenson e Sullivan 1987, Puig e Sorkin 1996, Taylor e cols. 1995], é possível atribuir-se o efeito antinociceptivo da NTBo-A como decorrente da capacidade em inibir a sensibilização periférica e indiretamente inibir a sensibilização central [Cui e cols. 2004] .

1.4 – MODELO DE CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRA-ORBITAL

1.4.1 – CONSIDERAÇÕES:

A constrição do nervo infra-orbital foi proposta como um modelo para o estudo da dor neuropática trigeminal [Vos e Maciewicz. 1991]. Estudos demonstraram que animais submetidos a este procedimento apresentavam aumento do tempo de “*grooming*” (fricção) facial espontâneo do 1º ao 15º dia após a cirurgia, seguido de alodinia mecânica bilateral, a qual persistia por pelo menos 130 dias [Vos e cols., 1994].

Estudos eletrofisiológicos demonstraram alterações em núcleos do tálamo e regiões do córtex somatosensorial após estes procedimentos [Benoist e cols. 1999, Vos e cols. 2000]. Em adição, um aumento de aproximadamente 50% no campo receptivo dos neurônios do lado intacto da face também foi observado após a constrição do nervo infra-orbital [Vos e cols. 2000]. Estes achados são interpretados pela projeção do gânglio do trigêmeo para ambos os lados do bulbo e do núcleo do trato espinhal. Desta maneira, estimulação unilateral do gânglio do trigêmeo ativa neurônios tanto no subnúcleo caudal ipsilateral como contralateral [Ingvarlsen e cols. 1997, Jacquin e cols. 1990, Pfaller e Arvidsson 1988].

A constrição do nervo infra-orbital de ratos induz hipernocicepção orofacial bilateral ao calor, embora muito menos proeminente no lado não operado, a qual persiste por até 12 dias após a cirurgia [Imamura e cols.1997]. A hipernocicepção pode, entretanto ocorrer somente de forma unilateral mantendo o restante do padrão [Chichorro e cols. 2006]. A hipernocicepção ao frio ocorre paralelamente ao calor. O emprego de um estímulo térmico frio neste modelo é importante, primeiro porque o frio pode desencadear episódios de dor em pacientes com neuralgia do trigêmeo, e em segundo lugar, porque, embora

não tão comum quanto alodinia mecânica, a hiperalgesia ao frio também é observada nesta condição [Mathews e Scrivani, 2000; Scrivani e cols., 2005].

Em modelos prévios [Vos e Maciewicz 1991], o acesso ao nervo infra-orbital é feito pela órbita, através do afastamento do globo ocular. Modelos de acesso intra-oral [Anderson e cols. 2003, Imamura e cols.1997] e extra-oral [Chichorro e cols. 2006] também foram descritos. Estas duas últimas opções de acesso cirúrgico parecem ser menos invasivas, visto que na primeira delas só foi observada uma redução no ganho de peso dos animais constrictos em relação aos falso-operados nos primeiros dias após a cirurgia, e na segunda nenhuma alteração [Anderson e cols. 2003, Chichorro e cols. 2006, Imamura e cols.1997].

No entanto, diferenças expressivas são observadas quando comparamos a origem do estímulo e o tipo de nervo (espinhal ou trigeminal). Estudos demonstram que ratos começam a apresentar hipernocicepção mecânica ipsilateral quatro dias após constrição do nervo ciático, persistindo por três semanas [Tal e Bennett 1994]. A hipernocicepção ao calor também é precoce neste modelo, porém sua duração é bem mais prolongada (até dois meses) [Bennett e Xie 1988], enquanto que ao frio foi detectada 30 dias após a lesão, persistindo por mais 30 dias [Jasmin e cols.1998]. Estas diferenças reforçam a idéia de que o processamento nociceptivo no sistema trigeminal, devido às suas peculiaridades, pode diferir em diversos aspectos, daquele decorrente da ativação de nervos espinhais.

1.4.2 – FISIOPATOLOGIA DA HIPERNOCICEPÇÃO TÉRMICA:

Existem diversas evidências de que fibras do tipo C constituem as principais vias de transmissão de estímulos térmicos nocivos. A hipernocicepção térmica (ao frio e ao calor) induzida por lesão de nervos periféricos é mediada principalmente por fibras sensíveis a capsaicina [Hao e cols. 1996, Shir e cols.1990].

Existem dois tipos de receptores, presentes nas fibras do tipo C, que são responsáveis pela resposta aos estímulos ao calor e ao frio, TRPV1 e TRPA1 respectivamente. O TRPV1 é o principal mediador da hipernocicepção ao calor, enquanto que o TRPA1 está relacionado com a hiperalgesia ao frio [Bautista e

cols. 2006, Kwan e cols. 2006]. Administração de capsaicina, agonista de receptores TRPV1, causa hipernocicepção ao calor em animais não operados, a qual é abolida tanto pela depleção de fibras C, quanto pela administração de capsazepina [Chichorro e cols. 2006]. A icilina, agonista não seletivo de receptores TRPA1, produz hipernocicepção ao frio em animais não operados, a qual foi prevenida pela depleção de fibras C [Chichorro e cols. 2006]. Embora a icilina não discrimine entre receptores TRPA1 e TRPM8, dados recentes da literatura mostram que apenas os receptores TRPA1 são expressos por fibras sensíveis à capsaicina. Eles contribuem para o desenvolvimento da hipernocicepção em condições de dor inflamatória e neuropática [Katsura e cols. 2006, Obata e cols. 2005]. Os receptores TRPM8 são expressos somente por fibras sensíveis ao mentol [Kühn e cols., 2008]. A capsazepina reduz significativamente a hipernocicepção ao frio e ao calor em animais constrictos [Chichorro e cols. 2006].

Receptores da família TRP, possivelmente TRPV1 e TRPA1, presentes nas fibras do tipo C, medeiam a hipernocicepção térmica no sistema sensorial trigeminal, e sugerem que antagonistas destes receptores apresentam potencial terapêutico. Apesar das evidências de que a capsaicina e a icilina ativam receptores distintos presentes em uma mesma subpopulação de fibras, a injeção de icilina no lábio superior dos animais não induziu hipernocicepção ao calor, assim como a injeção local de capsaicina não induziu hipernocicepção ao frio. De maneira análoga, a coadministração destas substâncias não resultou em potencialização da hipernocicepção ao frio [Chichorro e cols. 2006]. Uma das possibilidades para a ausência de interação entre a capsaicina e a icilina diz respeito às diferenças entre as temperaturas necessárias à sua ativação. Neste sentido, quando o TRPV1 é exposto à capsaicina, o rebaixamento da temperatura causada pelo estímulo frio, para valores abaixo do limiar de ativação, impede que o mesmo seja ativado. De modo análogo, quando o TRPA1 é exposto a icilina, o mesmo é inativado quando a temperatura local é elevada acima do limiar de ativação deste receptor por aplicação de calor radiante. Além disso, estudos “in vitro” demonstraram que a icilina não ativa células transfectadas com receptores TRPV1, enquanto que a capsaicina não ativa células que expressam heterologicamente receptores TRPA1 ou TRPM8 [Story e cols. 2003].

Adicionalmente, a icilina potencializa correntes evocadas pelo frio e causa dessensibilização de receptores TRPM8 [Chuang e cols. 2004]. A dessensibilização dos receptores TRPA1 só foi demonstrada em resposta a exposições repetidas ao frio e ao óleo de mostarda [Story e cols. 2003]. Administrações repetidas de icilina tornam os animais refratários ao frio, o que sugere uma possível dessensibilização do receptor [Chichorro e cols. 2006].

A hipernocicepção a estímulos térmicos, que é mediada por fibras do tipo C, desenvolve-se mais rapidamente e sua redução coincide com o surgimento da hipernocicepção mecânica. Animais cujas fibras do tipo C foram depletadas por capsaicina apresentaram aumento significativo na sensibilidade a estímulos térmicos pouco antes do desenvolvimento da hipernocicepção mecânica. Os mecanismos subjacentes a este fenômeno ainda precisam ser esclarecidos, contudo, pode-se sugerir que ele seja resultado do remodelamento do sistema sensorial, o qual pode envolver alterações fenotípicas dos neurônios, que passariam a expressar receptores de frio e calor, ou a estabelecer novas conexões sinápticas. É possível, que o desaparecimento da hipernocicepção térmica a partir do momento em que os animais constrictos passam a apresentar sensibilidade exacerbada ao estímulo mecânico, seja decorrente de um mecanismo de proteção no qual o animal evita responder à estimulação com frio ou calor com grooming facial, de modo a não estimular mecanicamente a área sensibilizada [Chichorro e cols. 2006].

Outra possibilidade para o decurso temporal não coincidente da hipernocicepção a estímulos mecânicos e térmicos também está relacionada aos tipos de fibras que transmitem estas informações sensoriais. No modelo de dor neuropática por ligação do nervo ciático, foi demonstrado que o número de fibras C é reduzido a um terço do normal, 5 a 14 dias após a cirurgia [Sommer e cols. 1993]. Resultados anteriores mostram que após a constrição do nervo infra-orbital a lesão do nervo induz a perda de fibras do tipo C [Chichorro e cols. 2006]. Imagens obtidas por microscopia confocal do gânglio do trigêmeo no 4º dia após a constrição do nervo infra-orbital mostram redução substancial da imunorreatividade para IB4, marcador de fibras C não peptidérgicas. A perda de fibras C poderia contribuir tanto para a redução da sensibilidade a estímulos

térmicos como para a ausência da resposta de fase neurogênica à formalina, a qual é mediada principalmente por este tipo de fibra [Pajot e cols. 2000].

1.4.3 – PADRÃO COMPORTAMENTAL DO TESTE DO -20⁰C EM ANIMAIS SUBMETIDOS À CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRA-ORBITAL.

A aplicação do spray de tetrafluoretano na face dos animais causa redução imediata da temperatura da superfície cutânea de $29,9 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ para $13,8 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$, a qual, passados 2 min, retorna aos níveis basais. Em ratos submetidos à constrição unilateral do nervo infra-orbital, a aplicação do spray de tetrafluoretano induz hipernocicepção ao frio, que é significativa a partir do 2º dia e persiste até o 12º dia após a cirurgia. Este aumento na responsividade ao frio só é observado no lado ipisilateral à constrição e não é significativamente diferente entre os animais dos grupos falso-operado e intacto em nenhum dos períodos avaliados no lado contralateral [Chichorro e cols. 2006].

1.5 - EVIDENCIAS CLÍNICAS DA UTILIZAÇÃO DA NTBo-A NO CONTROLE DE SÍNDROMES DOLOROSAS

1.5.1- ENXAQUECA (MIGRÂNEA).

Evidências clínicas sugerem que a NTBo-A quando administrada subcutaneamente, é uma droga efetiva e segura no tratamento profilático da migrânea e da cefaléia crônica e diária [Barrientos e Chana 2003, Dodick e cols. 2005, Mathew e cols. 2005, Silberstein e cols. 2000, Silberstein 2005]. A NTBo-A pode ser uma droga ideal no tratamento profilático, quando os pacientes apresentam uma baixa aderência ao tratamento crônico e diário, baixa resposta clínica a outros fármacos ou naqueles que já apresentaram efeitos colaterais.

Estudos de longa duração (até seis meses após o bloqueio) mostraram que a NTBo-A produz uma redução na duração das crises de migrânea melhorando o impacto sobre a qualidade de vida. O mesmo estudo não mostrou uma redução na frequência e na intensidade das crises quando comparados ao grupo placebo [Cady e Schreiber 2008]. A comparação entre NTBo-A e divalproato de sódio mostrou respostas terapêuticas semelhantes.

Os efeitos colaterais observados ao final de nove meses eram menores para o grupo NTBo-A [Blumenfeld e cols. 2008].

A NTBo-A utilizada com aplicações múltiplas (três aplicações intercaladas por períodos de três meses) mostrou que a NTBo-A não demonstra efetividade terapêutica ou efeitos colaterais estatisticamente significativos quando comparados com o grupo placebo (soro fisiológico) [Aurora e cols. 2007]. Metodologias semelhantes mostraram resultados muito próximos, reforçando a pouca efetividade clínica da toxina botulínica quando avaliada 90 dias ou 120 dias após a sua aplicação [Elkind e cols. 2006, Relja e cols. 2007].

Os resultados terapêuticos são distintos. Alguns trabalhos sugerem boa resposta enquanto outros sugerem pouca efetividade [Jakubowski e cols. 2006]. Segundo eles os “bons pacientes” (bons respondedores) são aqueles que apresentam migrânea episódica com dores que se manifestam como pulsáteis de fora para dentro (imploding headaches) enquanto que os maus pacientes (não respondem a toxina) são os que manifestam cefaléia com características pulsáteis de dentro para fora (exploding headaches) [Jakubowski e cols. 2006]. A justificativa dos autores se baseia no fato que cefaléias centríptas se originam de estruturas extracranianas enquanto as cefaléias centrifugas se originam de estruturas intracranianas.

1.5.2 – CEFALÉIA CRÔNICA E DIÁRIA E TOXINA BOTULÍNICA:

Em pacientes portadores de cefaléia crônica e diária (mais de 15 dias com dor de cabeça ao mês, no mínimo três meses) a utilização de NTBo-A mostrou-se efetiva quando comparada ao grupo controle (placebo), quando não associado ao abuso de analgésicos [Freitag e cols. 2008, Menezes e cols. 2007]. Certos dados clínicos parecem ser relevantes: cefaléia unilateral e presença de alodinia [Mathew e cols. 2008]. A utilização da toxina botulínica para o tratamento das cefaléias crônicas e diárias (migrânea crônica e cefaléia do tipo tensional crônica) em seus diversos estudos mostrou resultados divergentes entre satisfatórias e insatisfatórias. Estas discrepâncias são atribuídas principalmente pelas dosagens, locais e tempo de aplicação diferente para cada estudo. Novos estudos sugerem que cefaléia crônica diária, sem abuso de analgésicos

(migrânea crônica) parece mostrar bons resultados após a utilização da NTBo-A [Farinelli e cols. 2006, Freitag 2007].

1.5.3 – TOXINA BOTULÍNICA E OUTRAS SÍNDROMES DOLOROSAS CRÔNICAS:

Pacientes portadores de neuropatias focais associadas à alodinia mecânica após tratamento intradérmico com NTBo-A apresentaram melhora significativa da intensidade da dor e da presença de alodinia [Ranoux e cols.,2008]. Relatos isolados da utilização da NTBo-A na neuralgia pós-herpética [Huete e Bermejo 2008] e dor lombar crônica também mostraram bons resultados [Jabbari 2008].

1.5.4 – TOXINA BOTULÍNICA E NEURALGIA DO TRIGÊMEO:

A NTBo-A mostrou consistência no tratamento da neuralgia do trigêmeo Ela age como um elemento de desativação nociceptiva transitória em síndromes álgicas. Uma vez que os pacientes com neuralgia do trigêmeo apresentaram melhora clínica aproximadamente duas semanas após o bloqueio e permaneceram com esta resposta somente quando mantidas as drogas neuromoduladoras (carbamazepina ou amitriptilina) pudemos sugerir que esta resposta inicial ocorreu por dessensibilização nociceptiva [Piovesan e cols. 2005]. Outros estudos demonstraram resultados semelhantes [Allam e cols. 2005, Boscá-Blasco e cols. 2006, Borodic e Acquadro 2002, Felício e cols. 2007, Micheli e cols. 2002, Türk e cols. 2005, Volcy e cols. 2006, Zuñiga e cols. 2008].

1.6– CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Mais de cem anos já se passaram desde os primeiros relatos do efeito da toxina botulínica. A diferença entre um veneno e um medicamento está em seu manejo. Este princípio básico da medicina pode ser exemplificado quando utilizamos a toxina botulínica. No transcorrer destes anos várias indicações terapêuticas surgiram, sendo adequadamente comprovadas com estudos clínicos controlados. Da mesma forma como aconteceu com a

história da toxina botulínica, a indicação para as síndromes álgicas, também ainda permanece muito confusa.

Achados neuroquímicos comprovam que a toxina botulínica pode agir sobre o tráfego das vesículas intracelulares e sobre o acoplamento ao nível da membrana celular citoplasmática. Vesículas estas, necessárias para a manutenção do transporte de neurotransmissores intracelulares e de receptores de membrana utilizados para a gênese e perpetuação da nocicepção. Do ponto de vista prático, muitas questões ainda permanecem: Quanto tempo a toxina botulínica levará para iniciar seus efeitos antinociceptivos? Qual a duração dos efeitos antinociceptivos? Submeter uma célula a exposição repetitiva da toxina botulínica pode alterar seu comportamento nociceptivo? A toxina botulínica pode atuar sobre a resposta nociceptiva imediata e ou tardia? A toxina botulínica pode alterar um estado de hipernocicepção?

2. OBJETIVOS

- 2.1 Determinar o efeito antinociceptivo (preventivo) da toxina botulínica do tipo-A em um modelo de dor orofacial aguda induzida pela formalina 2.5%.

- 2.2 Determinar o efeito antinociceptivo (analgésico) da toxina botulínica do tipo-A em um modelo de dor orofacial crônica induzida pela constrição do nervo infra-orbital.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – INTRODUÇÃO:

Para este estudo utilizamos um modelo experimental animal, prospectivo, intervencionista, cego, aplicando como droga ativa a toxina botulínica do tipo A (NTBo-A) e como controle solução salina isotônica 0,9% (SSI). O estudo foi dividido em duas fases: Fase 1 – Avaliação do efeito das drogas sobre um modelo de dor aguda gerada pelo teste da formalina (TF); Fase 2 – Avaliação do efeito das drogas sobre um modelo de dor neuropática crônica gerada pelo teste da constrição do nervo infra-orbital (CNIO).

Na Fase 1 avaliou-se escores de dor através do TF; atividade motora através do teste do campo aberto (CA); modelos preditivos de ansiedade, teste do labirinto em cruz elevada (TLCE) e teste do campo claro versus escuro (TCVE). Para a Fase 2 avaliou-se os escores de dor induzida por baixas temperaturas, utilizando-se do Teste do menos 20^o Celsius (-20^oC).

3.2 – ANIMAIS, MICRO AMBIENTE, MACRO AMBIENTE E CONDIÇÕES NUTRICIONAIS:

Ratos do sexo masculino espécime *Rattus norvegicus* da linhagem WISTAR, pesando entre 240 a 340 gramas (fase 1) e 120 a 200 gramas (fase 2) foram dispostos em caixas plásticas (média de quatro animais por caixa) com dimensões de 41x34x12 centímetros. Os animais ficaram acondicionados em biotério situado no Setor de Ciências da Saúde (Jardim Botânico – Universidade Federal do Paraná - UFPR). Os animais foram mantidos em estantes ventiladas. A sala onde os animais foram acondicionados possui ciclo luz-escuridão, regulado por “timer” (12 horas claro versus 12 horas escuridão). Os animais tiveram livre acesso à alimentação através de comedouros suspensos. Para alimentação foi utilizado ração marca NUVILAB CR1 (NUVITAL – Registro Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, número PR – 58033-00103) (Anexo 1). Os animais receberam água de maneira livre durante todo o período do estudo.

O ambiente de acondicionamento dos animais foi mantido com temperatura de 22^oC (utilizando-se de ar condicionado modelo Springer). O fluxo de ar era continuamente renovado através de exaustor de teto, mantendo-

se a umidade relativa do ar entre 50 a 55%. As caixas para o acondicionamento dos animais foram preenchidas com cepilho de pinheiro com uma espessura variando entre quatro a seis centímetros. O cepilho foi esterilizado em autoclave no Biotério do Setor de Ciências Biológicas. Três vezes por semana, todas as caixas eram adequadamente higienizadas e o cepilho substituído.

3.3- ORIGEM E ADMISSÃO DOS ANIMAIS:

Todos os animais deste estudo foram obtidos do Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. As matrizes dos animais pesquisados tinham sua procedência do Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fiocruz (CECAL - Rio de Janeiro).

Os animais quando adentraram ao laboratório foram pesados e avaliados individualmente. A presença de lesões de pele, sangramentos e feridas foram critérios de exclusão. Os animais foram agrupados em séries de quatro animais e acondicionados nos recipientes apropriados. As condições técnicas do biotério atendem as principais normas do programa de ação para biotérios – infra-estrutura de biotérios no Brasil (www.anbio.org.br).

3.4 - FASE 1 – MODELO EXPERIMENTAL DE DOR AGUDA.

3.4.1 - RANDOMIZAÇÃO DOS ANIMAIS:

Os animais foram divididos em dois grupos: Animais tratados com Neurotoxina botulínica do tipo A (NTBo-A) aplicadas de forma subcutânea (n=48) e animais tratados com solução salina isotônica 0,9% (SSI) aplicadas de forma subcutânea (n=47). Os grupos foram subdivididos de acordo com o tempo de realização dos testes de formalina e do campo aberto após o tratamento farmacológico: Subgrupo 24 horas; oito dias; 15 dias; 22 dias; 29 dias e 36 dias.

3.4.2- ETAPAS E MODELO DE ESTUDO.

O estudo teve três períodos de “Run-in” e três períodos de avaliações (Figura 18). O período Run-in 1 teve uma duração de 21 dias, que antecedeu o

primeiro tratamento. O período Run-in 2 teve uma duração de sete dias e antecedeu o segundo tratamento. O período Run-in 3 teve duração de sete dias e antecedeu a eutanásia dos animais. A primeira avaliação ocorreu após o primeiro tratamento farmacológico. Os animais foram divididos em dois grupos conforme a droga utilizada (NTBo-A ou SSI) e subdivididos em seis subgrupos conforme o período de tempo em que os testes comportamentais foram realizados após este tratamento (teste da formalina e teste do campo aberto) (Figura 18). A segunda avaliação foi realizada da mesma forma após o segundo tratamento. A terceira avaliação foi realizada após o período Run-in 3 e imediatamente anterior a eutanásia dos animais. Foram realizados os testes comportamentais de ansiedade (teste do labirinto em cruz elevada e do campo claro versus escuro) (Figura 18).

3.4.3 – Períodos Run-in:

O período Run-in 1 ocorreu como primeira intervenção observacional do estudo, 21 dias antes do início do primeiro tratamento farmacológico, e tinha como objetivo registrar alterações físicas e ou comportamentais dos animais. Este período também foi importante para que os animais se adaptassem ao novo ambiente e atingissem peso corpóreo ideal para o início do estudo (250-300 gramas). O período Run-in 2 tinha como objetivo observar alterações físicas ou outros achados comportamentais (motores ou psicogênicos). Este período teve uma duração de sete dias e iniciou após 35 dias do primeiro tratamento. Avaliamos alterações sistêmicas gerais, lesões de pele, diarreia, hiperemia de conjuntiva e vômitos. Foram também avaliadas alterações sistêmicas motoras, paralisias em grupos musculares e mudança de marcha do animal. A alteração psicogênica avaliada foi a agressividade entre os animais. Considerou-se como padrão de referência para a avaliação da fase Run-in 2 o período Run-in 1. O período Run-in 3 iniciou 35 dias após o segundo tratamento farmacológico e teve uma duração de 7 dias; as mesmas avaliações do período Run-in 2 foram utilizadas, tomando-se como referência os períodos Run-in 1 e 2.

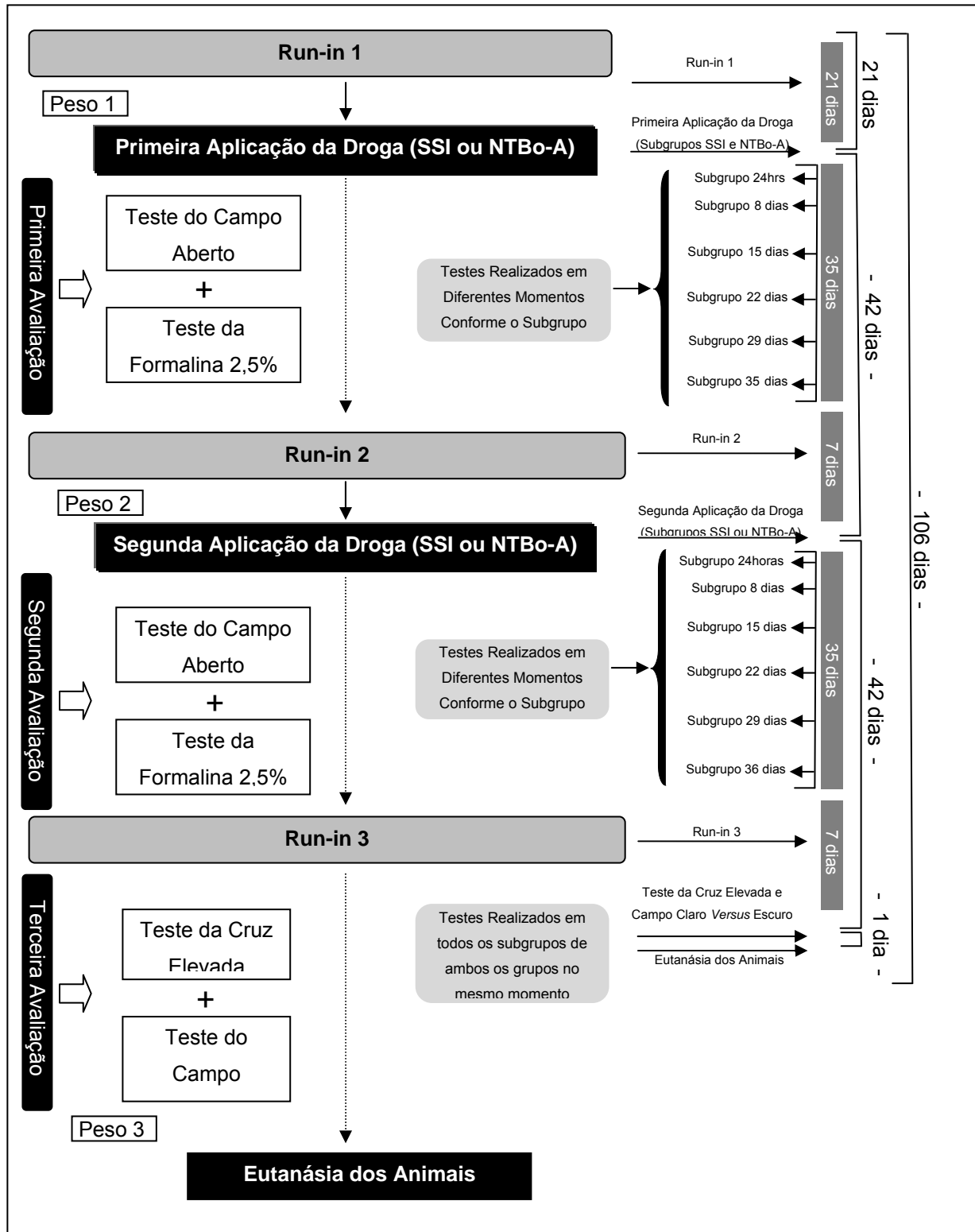


FIGURA 18 - FLUXOGRAMA DO TEMPO E DAS ETAPAS DA PRIMEIRA FASE DO ESTUDO

3.4.4 - DROGAS UTILIZADAS E TÉCNICAS DE INOCULAÇÃO.

3.4.4.1- NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A E SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9%:

Os animais foram submetidos ao tratamento utilizando-se de SSI designada como droga controle e NTBo-A (Botox®) designada como droga ativa. As drogas foram administradas sobre a região do lábio superior direito, local de inervação do segundo ramo do nervo trigêmeo (Figuras 9 e 14). Para o tratamento os animais foram imobilizados (fisicamente) pela preensão posterior, o qual expôs de maneira tecnicamente satisfatória a região labial do animal (Figura 19). Utilizamos seringa/agulha de insulina marca BD “ultrafine 30G”, com oito milímetros de comprimento (5/16”) e um calibre de 0,3mm (Figura 19).

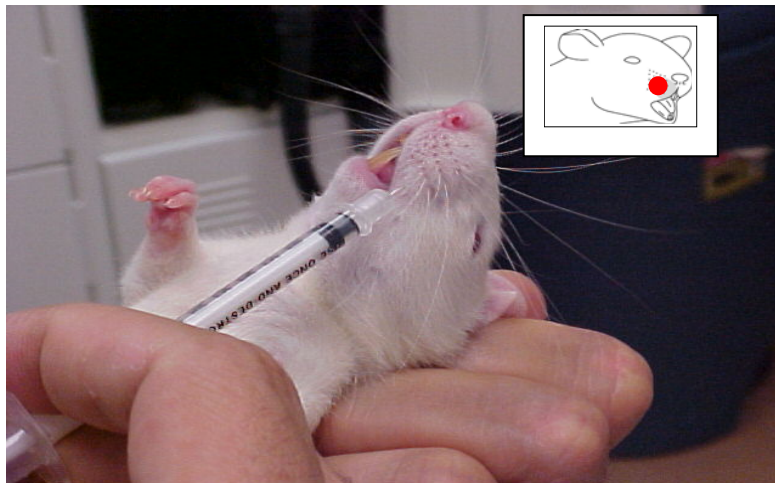


FIGURA 19 - TÉCNICA PARA IMOBILIZAÇÃO DO ANIMAL E LOCAL DA INOCULAÇÃO DA DROGA

A NTBo-A utilizada foi o Botox® (Allergan, Inc. Irvine, CA – USA). Frascos de NTBo-A contendo 100 unidades foram reconstituídas utilizando-se para isto solução salina 0.9%, 2 ml (50U/mouse por ml). Os frascos de Botox® foram transportados até o local do estudo em temperatura de -15°C . No laboratório os frascos foram acondicionados em freezer com temperatura média de -10°C . A reconstituição foi realizada no ambiente do estudo, cerca de uma hora antes das aplicações. Todas as doses de NTBo-A foram administradas de forma subcutânea e em bolus contendo 15 u/kg de peso com volume de 30 μl por Kg de peso.

Para o grupo controle utilizamos SSI (cloreto de sódio 0,9%) da marca Isofarma frascos com 10ml, lote 181543 e validade julho de 2010. A SSI foi administrada em bolus de 30 μ l por Kg de peso, subcutânea.

Os grupos e subgrupos receberam uma segunda dose de NTBo-A ou SSI quarenta e três dias após a primeira aplicação. Os métodos de administração a forma e a dosagem foram iguais à primeira aplicação. O grupo que utilizou NTBo-A continuou recebendo NTBo-A e da mesma forma para o grupo SSI. As dosagens foram corrigidas conforme o novo peso corpóreo. O lado utilizado para a segunda aplicação foi o mesmo do primeiro. As aplicações foram realizadas o mais próximo possível do padrão estabelecido (lábio superior direito – alguns milímetros próximo à narina).

3.4.4.2 - FORMALINA 2,5%:

A formalina 2,5% (FO) 40 μ l foi injetada sobre o lábio superior direito dos animais, sobre o mesmo local do tratamento farmacológico. Para a injeção da FO utilizamos seringas de 0.5 ml com agulhas 30G, comprimento oito milímetros (5/16”) e calibre de 0,3 mm, marca BD Ultra-Fine II. A FO 2.5% foi preparada a partir da formaldeído, marca Sigma F-1635, na concentração de 38%. Para o preparo, o formaldeído 38% 0,66 ml foi diluído em 9,34ml de água destilada, perfazendo o volume final de 10 ml.

3.4.5 – AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DO PESO:

Todos os animais foram acompanhados quanto à variação do peso durante três momentos do estudo (Figura 18): Minutos antes do primeiro bloqueio (peso 1); minutos antes do segundo bloqueio (peso 2) e ao final do estudo, minutos antes da eutanásia (peso 3). Avaliou-se o ganho de peso após o primeiro bloqueio (peso 2 menos o peso 1) e após o segundo bloqueio (peso 3 menos o peso 2 e peso 3 menos o peso 1). A variação de peso foi utilizada como uma análise indireta do efeito da NTBo-A ou da SSI 0,9% sobre a musculatura mastigatória dos animais. Os resultados foram apresentados em valores absolutos e em porcentagens de ganho de peso.

3.4.6 – COMPORTAMENTO MOTOR E ATIVIDADE EXPLORATÓRIA (TESTE DO CAMPO ABERTO):

O teste de campo aberto (TCA) avalia a habilidade motora incluindo-se a sua integridade e o comportamento exploratório espontâneo dos animais. Como foi descrito, o TF, é um teste comportamental que depende, além de outras funções corticais, da integridade motora do animal. A NTBo-A pode afetar a atividade motora destes animais. Para descartar a influência motora da NTBo-A sobre o TF todos os animais foram submetidos ao TCA 30 minutos antes do TF.

A área do teste foi constituída por um círculo de 97 cm de diâmetro. As paredes eram igualmente circulares com 32,5cm de altura em alumínio (Figura 20). A arena está situada sobre um piso de madeira pintada em cor branca. Ela é dividida em três círculos concêntricos. O círculo menor possui um diâmetro de 23 cm, o segundo círculo com 61 cm e o último 98 cm. Cada círculo foi subdividido internamente em áreas de igual tamanho. O número de áreas dentro do círculo interno, intermediário e o externo são respectivamente: um; seis e doze unidades. Uma lâmpada branca com potência de 100 Watts foi disposta 48 cm acima do piso da arena. Todo o dispositivo foi envolvido por um tecido transparente que impede que o animal presencie o observador externo (Figura 20).

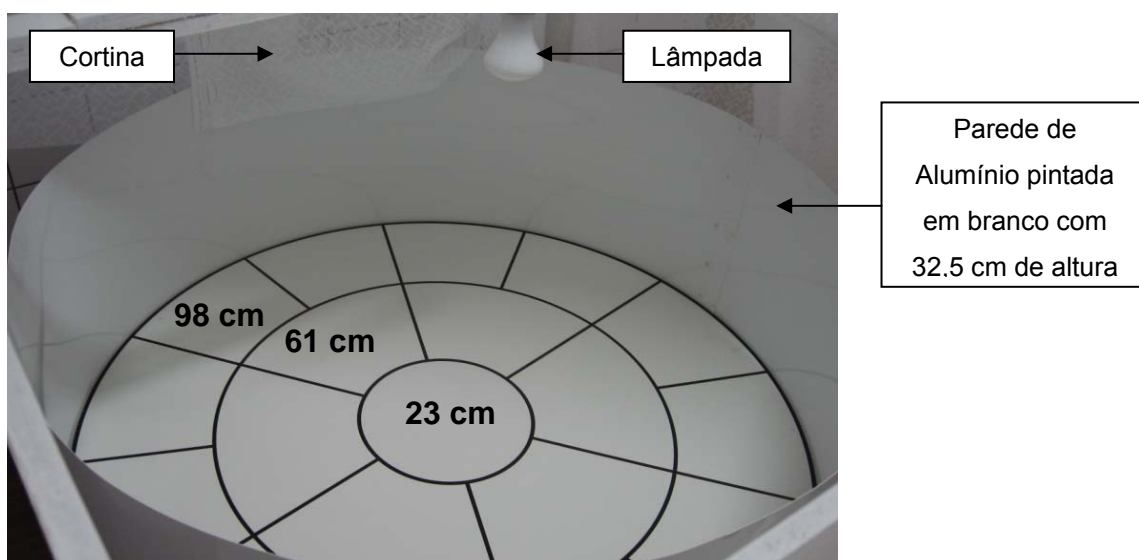


FIGURA 20 - APARATO PARA AVALIAÇÃO DO TESTE DO CAMPO ABERTO, DISTRIBUIÇÃO DA ARENA E DIÂMETROS

3.4.6.1 – PARÂMETROS AVALIADOS NO TESTE DO CAMPO ABERTO:

O teste constitui-se em observar o comportamento do animal por um período de cinco minutos após ser colocado no círculo central. Antes de serem admitidos na arena de estudo os animais ficaram cerca de 10 minutos adaptando-se ao ambiente da sala de estudo (nas mesmas caixas de acondicionamento que são mantidos no biotério) ofertando-se água e comida durante este período. No teste o animal é privado de alimento e de qualquer líquido. Avaliamos:

- 1- Latência para iniciar os movimentos: Tempo em segundos que o animal despende para retirar-se completamente do círculo central (Figura 21-A).
- 2- Frequência de locomoção: Número de casas (unidades) na arena que o animal se desloca (Figura 21-B).
- 3- Frequência de levantamento: Número de vezes que o animal levanta-se ficando sobre suas duas patas posteriores (Figura 21-C).
- 4- Imobilidade: Tempo em segundos de imobilidade (Figura 21-D).

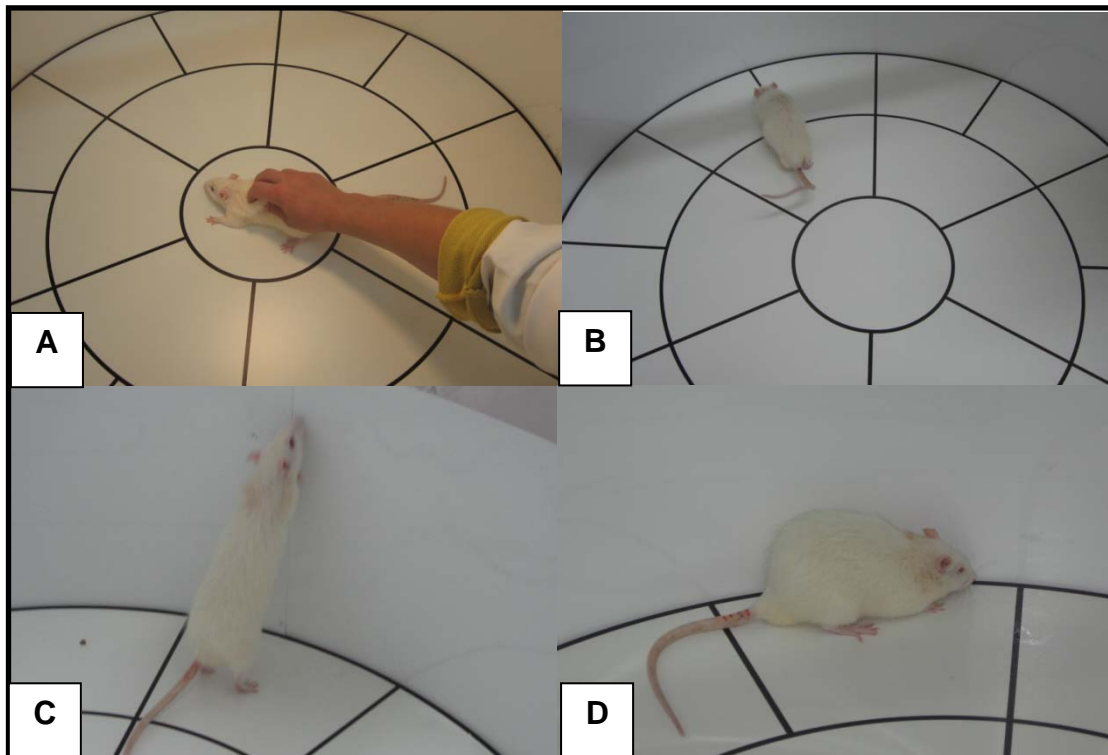


FIGURA 21 - TESTE DO CAMPO ABERTO: A- LATÊNCIA PARA O INÍCIO DOS MOVIMENTOS; B- FREQUÊNCIA DE LOCOMOÇÃO; C FREQUÊNCIA DE LEVANTAMENTOS; D- IMOBILIDADE

Ao final do teste o animal é retirado e recolocado em sua caixa, transferindo-se para uma segunda sala onde irá realizar o TF. A cada novo exame o piso e as paredes foram higienizados com álcool 5% para evitar a influência dos odores sobre os animais. Aguarda-se um período de 50 minutos para novo teste.

O TCA foi realizado aproximadamente 30 minutos antes do TF. Por motivos técnicos em um mesmo dia são realizados somente oito testes, sendo quatro do grupo NTBo-A e quatro do grupo SSI. Os avaliadores realizaram os testes de forma “cega”

3.4.7- TESTE DA FORMALINA 2,5% (TF):

Antes de iniciar o TF os animais foram pesados (ajuste da dose de formalina) e acondicionados no local do teste durante um período de 10 minutos, com temperatura ambiente de 22^o C, silêncio absoluto, no período das nove horas da manhã até as cinco horas da tarde. O ambiente do teste é constituído por um recipiente de vidro, transparente em todos os seus lados com um orifício superior onde ocorrem as trocas de gases. Externamente na região posterior do vidro e nas laterais são colocados três espelhos: um espelho paralelo ao observador e os outros distribuídos com uma angulação de 15 graus ao primeiro. O examinador posicionado a frente do recipiente de vidro e dos espelhos tem uma visão global do comportamento de fricção facial do animal (mecanismos de fricção da pata sobre a face e movimentos de lamber) (Figura 22). O ambiente do estudo é forrado com papel craft (40 por 40 cm) a fim de manter a higienização. O papel é substituído e o vidro higienizado com álcool 5% a cada novo exame. O intervalo entre os testes é de 30 minutos (Figura 22).

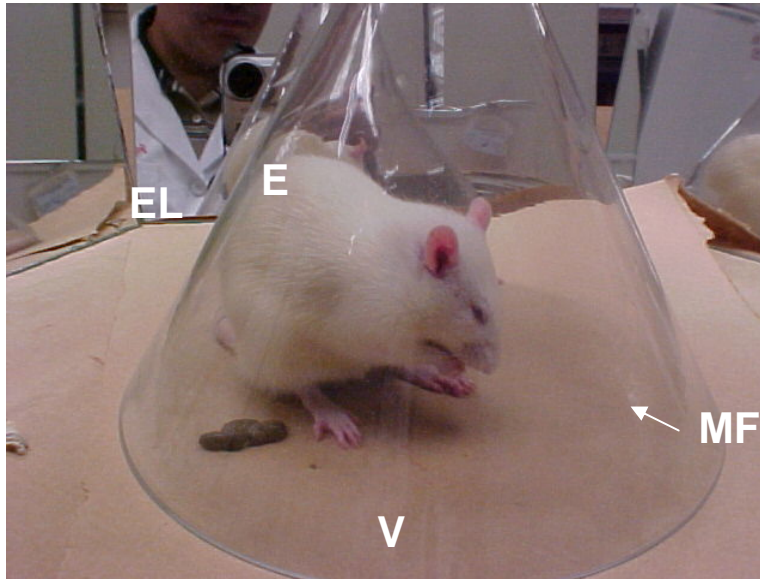


FIGURA 22 - TESTE DA FORMALINA 2.5%. (EL) ESPELHOS LATERAIS; (EP) – ESPELHO POSTERIOR; (V) - VIDRO DE ACONDICIONAMENTO DO ANIMAL; (MF) – MOVIMENTOS DE FRICÇÃO DAS PATAS ANTERIORES SOBRE O ROSTO

3.4.7.1 – TÉCNICA PARA APLICAÇÃO DA FORMALINA 2,5% (FO).

A FO na dose de 40µl foi injetada sobre o lábio superior esquerdo dos animais, aproximadamente sobre o mesmo local onde foi injetado a NTBo-A e ou a SSI. Para a injeção da FO utilizamos seringas de 0.5 ml com agulhas 30G curta, comprimento oito milímetros (5/16”) e calibre de 0,3 mm, marca BD Ultra-Fine II. Após a injeção da FO o animal é novamente recolocado no vidro iniciando a fase de avaliação comportamental ao teste de FO.

3.4.7.2 – PARÂMETROS AVALIADOS DURANTE O TESTE DA FORMALINA (TF):

O TF é um teste comportamental onde avaliamos o tempo despendido pelo animal (em segundos) coçando com suas patas, ou lambendo a região onde foi aplicado a FO. Este teste é dividido em dez blocos de três minutos, totalizando trinta minutos de avaliação. O primeiro bloco (primeiros três minutos) constituiu a fase I, neurogênica, precoce ou fase fásica. A fase entre o quarto bloco até o décimo bloco (12 até 30 minutos) constituiu a fase II, inflamatória, tardia ou fase tônica.

Desta maneira considera-se como fase I o tempo de fricção ou tempo despendido lambendo a região de inoculação da FO nos três primeiros minutos e fase II o tempo despendido em segundos no período entre 12 até 30 minutos (Figura 14 e 22). O período compreendido entre 3 minutos até 12 minutos é considerado como período de quiescência.

Os animais após estes testes são mantidos isolados por mais 60 minutos com oferta livre de água e alimentos. Após este período de readaptação são novamente colocados dentro do biotério.

3.4.8 – TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADA.

O teste avalia o conflito entre a exploração de uma área nova e o comportamento de “evitamento” de achados aversivos. É um método rápido e sensível para avaliar o efeito ansiolítico ou ansiogênico de certas drogas sobre animais pesquisados [Handley SL e Mithani S 1984]. Mesmo não sendo um teste específico para a avaliação de atividade motora este teste fez parte do protocolo de estudo porque durante os resultados iniciais de campo aberto o grupo NTBo-A apresentou altos valores de latência para o início dos movimentos em alguns subgrupos. Como sabemos altos valores na latência durante o teste de campo aberto, sugerem um maior grau de ansiedade.

O aparato consistia de uma cruz elevada (50 cm acima do nível do solo), composto por dois braços abertos e dois braços fechados. Todo o aparelho é pintado de cor preta para evitar interferências visuais sobre os resultados. Os braços apresentam 10 cm de largura e são construídos em madeira; 2- O braço aberto apresenta 50cm de comprimento sem paredes laterais; 3- O braço fechado apresenta 50cm de comprimento com paredes laterais de 40cm de altura; ao final dos lados dos braços fechados uma terceira parede fechava os mesmos (Figura 23).

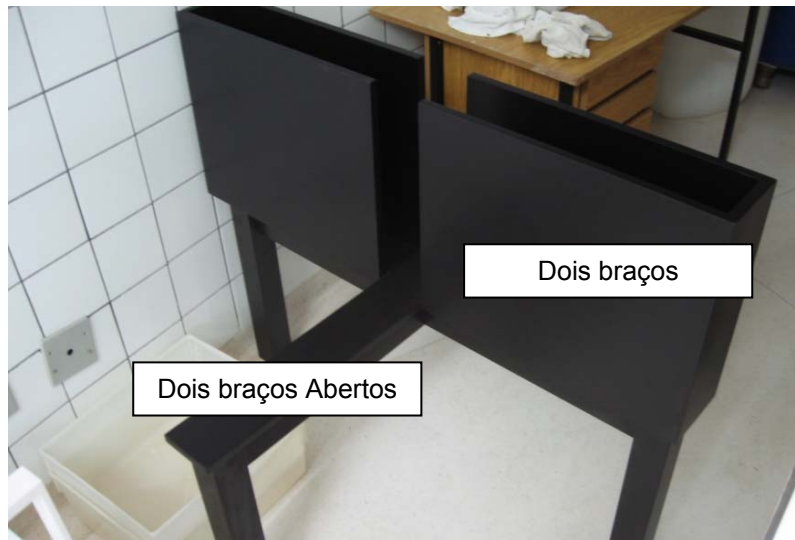


FIGURA 23 - TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADA

Acima do aparato é posicionada uma lâmpada de luz vermelha com 60 watts de potência (Figura 24-A). Uma hora antes do início do teste os animais são colocados na sala para adaptação com o ambiente. A sala mantém-se em silêncio, todas as fontes luminosas são inutilizadas e somente a luz vermelha é mantida acesa. O animal é disposto no centro do aparato com sua face voltada para o lado aberto. O período total de observação do animal é de 5min. Durante o exame avaliamos as seguintes variáveis [Rodgers e col., 1997]:

- 1- Latência para início dos movimentos: Avalia-se o tempo despendido pelo animal até sair completamente do campo neutro (área de conflito) entrando em um dos braços. Os resultados são fornecidos em unidades de segundo (Figura 24-A).
- 2- Porcentagem de entradas no braço aberto: Avalia-se o número de entradas no campo aberto multiplica-se por 100 e divide-se pelo número total de entradas em ambos os braços (aberto e fechado). O resultado é dado em porcentagem de entradas (Figura 24-B).
- 3- Porcentagem de entradas no braço fechado: Avalia-se o número de entradas no braço fechado multiplica-se por 100 e divide-se pelo número total de entradas em ambos os braços (aberto e fechado). O resultado é fornecido em porcentagem de entradas (Figura 24-C).

- 4- Porcentagem de tempo no braço aberto: Avalia-se o tempo despendido no braço aberto em segundos. Após multiplica-se por 100 e divide-se por 300. O resultado é fornecido em porcentagem de tempo despendida no braço aberto (Figura 24-D).
- 5- Porcentagem de tempo no braço fechado: Avalia-se o tempo despendido no braço fechado em segundos, multiplica-se por 100 e divide-se por 300. O resultado é fornecido em porcentagem de tempo despendida no braço fechado (Figura 24-E).
- 6- Porcentagem de tempo no campo central: Avalia-se o tempo despendido no campo neutro em segundos, multiplica-se por 100 e divide-se por 300. O resultado é fornecido em porcentagem de tempo despendida no campo central.

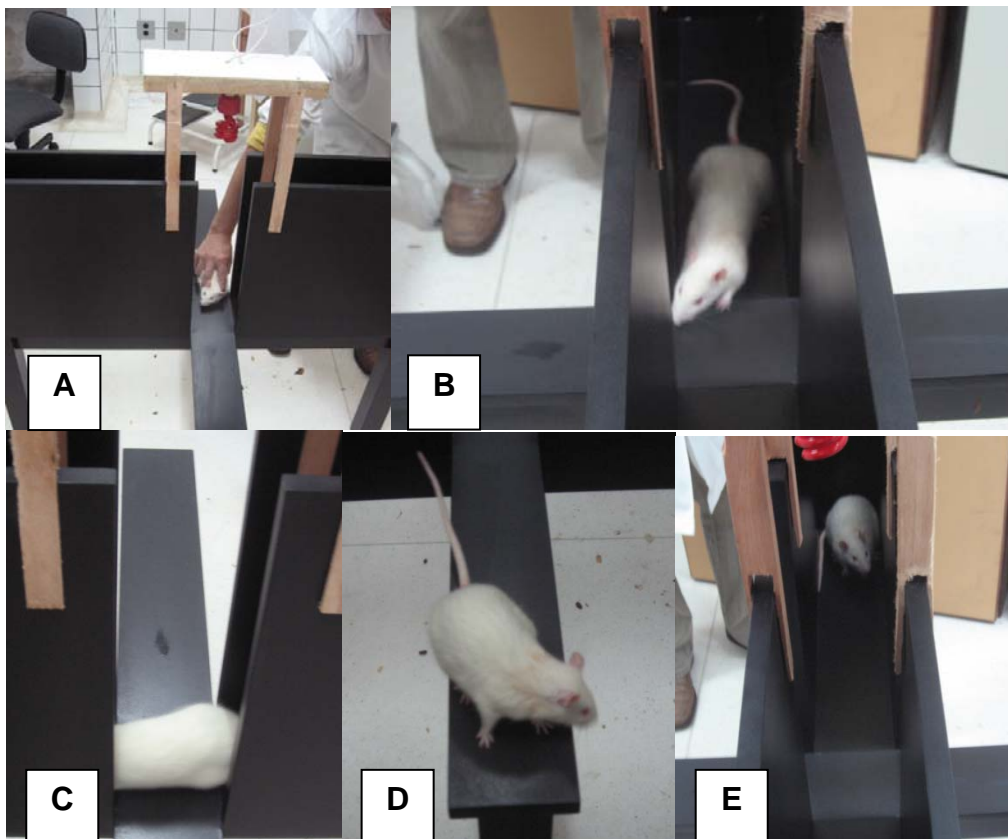


FIGURA 24 - TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADA: A- LATÊNCIA PARA INÍCIO DOS MOVIMENTOS; B- PORCENTAGEM DE ENTRADAS NO BRAÇO ABERTO; C- PORCENTAGEM DE ENTRADAS NO BRAÇO FECHADO; D- PORCENTAGEM DE TEMPO NO BRAÇO ABERTO; E- PORCENTAGEM DE TEMPO NO BRAÇO FECHADO

Após cada experimento a plataforma é lavada com álcool 5% para tirar o odor dos animais do teste anterior. Aguardam-se em média 10 minutos até novo teste.

3.4.9 – TESTE DA EXPLORAÇÃO DO CAMPO CLARO VERSUS ESCURO:

O teste tem por objetivo avaliar um conflito entre a tendência em explorar um ambiente novo e ao mesmo tempo evitar áreas iluminadas (parte aberta do dispositivo a ser estudado). Drogas ansiolíticas aumentam o número de transição entre o compartimento claro e escuro e as drogas não ansiolíticas não interferem nesta tendência. Por este motivo atribui-se a este teste um método de avaliação da ansiedade dos animais. O número de transições entre os dois espaços correlaciona-se com o comportamento exploratório do animal não tendo relação com a atividade motora [Crawley JN e col., 2001; Crawley JN e Goodwin FK 1980]. Mesmo não avaliando atividade motora, estes testes fizeram parte do protocolo de estudo porque durante os resultados iniciais de campo aberto o grupo NTBo-A apresentou altos valores de latência para o início dos movimentos. Como sabemos altos valores na latência durante o teste de campo aberto, sugerem um maior grau de ansiedade. Para a realização do teste os animais foram mantidos por um período de 60 minutos no ambiente do teste para adaptação em silêncio absoluto temperatura de 21⁰ Celsius, com livre acesso à água e alimentos.

Para a realização do teste utilizamos aparato previamente validado [Crawley JN e Goodwin FK 1980; Hascoët M e Bourin M 1998], que consistia de um pequeno compartimento escuro (um terço do seu tamanho total) com um compartimento claro (dois terços). O compartimento claro é formado por uma área iluminada por uma lâmpada branca com potência igual a 60 Watts (400 lux). O acesso era possível através de uma abertura entre os compartimentos. O aparato apresentava as seguintes dimensões: altura 30 cm; largura 27 cm; comprimento do compartimento escuro 18 cm; comprimento do compartimento claro 27 cm. A abertura entre os compartimentos apresenta uma altura de 7,5 cm e 7,5 cm de largura (Figura 25). O menor compartimento é pintado de preto e o maior em branco. O compartimento claro é aberto em sua porção superior o que permite a visualização dos movimentos de transição entre os compartimentos.

A lâmpada fica localizada 30 cm acima do assoalho do compartimento claro. O compartimento escuro é fechado em sua porção superior, por uma tampa retrátil e é pintado na cor preta (Figura 25).

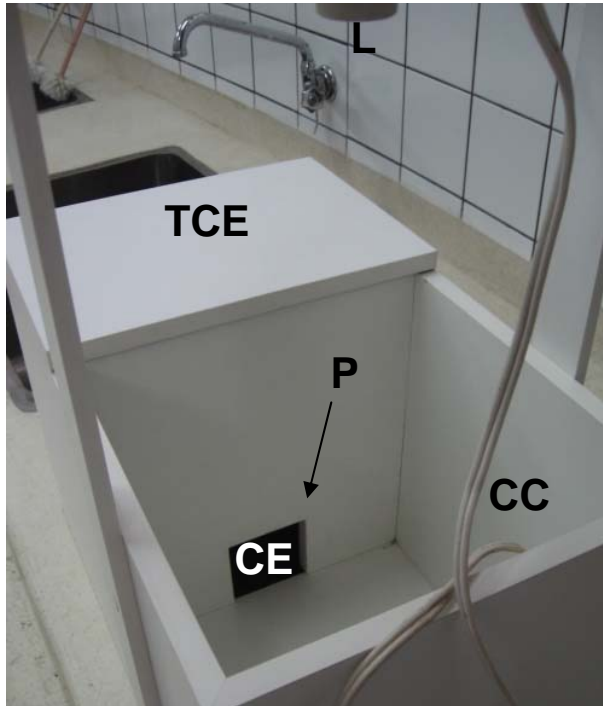


FIGURA 25 - TESTE DO CAMPO CLARO VERSUS ESCURO: (CC)- CAMPO CLARO; (CE) CAMPO ESCURO; (P) – PASSAGEM ENTRE CAMPO CLARO E CAMPO ESCURO; (L) – LÂMPADA; (TCE) – TAMPA DO CAMPO ESCURO.

Para o início do teste o animal é disposto no campo aberto (branco) voltado para a abertura de transição entre os dois campos. O teste realiza-se em um período de cinco minutos, avaliando-se os seguintes parâmetros:

- 1- Latência para entrada no campo escuro: Tempo que o animal despende até adentrar completamente o campo escuro. Os resultados foram fornecidos em unidades de segundos. (Figura 26-A).
- 2- Número de transições: É o número de vezes que o animal adentra parte do corpo ou todo o corpo em direção a um diferente campo. Os resultados são avaliados em unidades (Figura 26-B).
- 3- Tempo despendido em cada campo: É o tempo que o animal despende em cada campo (tempo no fechado “escuro” e tempo no campo aberto “claro”). Os resultados são fornecidos em unidades de segundos.

Após o término do teste o animal é retirado e é realizada uma desinfecção do local (com álcool 5%), removendo-se restos de urina e fezes.

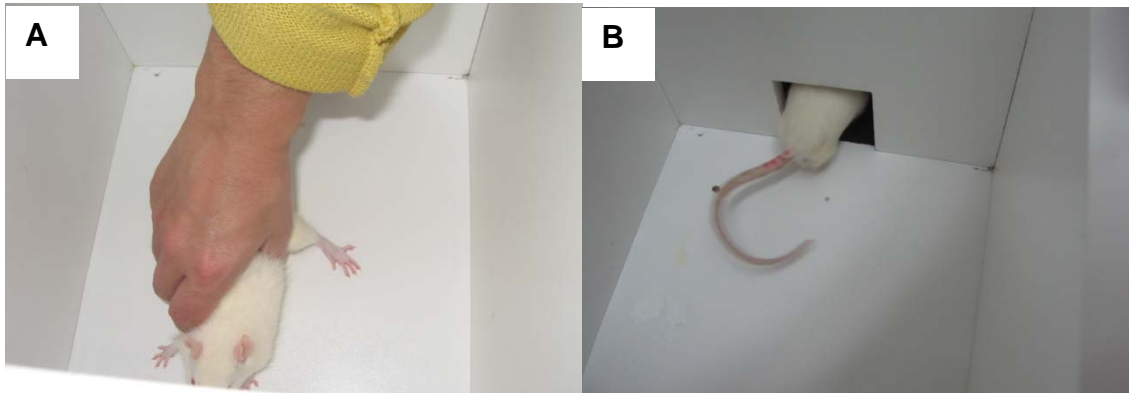


FIGURA 26 - TESTE DO CAMPO CLARO VERSUS ESCURO. A- LATÊNCIA PARA A ENTRADA NO CAMPO ESCURO. B- NÚMERO DE ENTRADAS NO CAMPO ESCURO

3.4.10 – EFEITOS COLATERAIS:

Os eventuais efeitos colaterais da fase 1 durante os períodos Run-in 2 e 3 foram descritos. Os grupos musculares cervicais avaliados, sua origem, inserção, funções, inervação sensitiva e inervação motora foram descritas (Anexo 2).

3.4.11 - EUTANÁSIA:

Ao final do estudo todos os animais sofreram eutanásia utilizando-se de deslocamento cervical.

3.4.12 – TESTES ESTATÍSTICOS:

Considerou-se que cada rato correspondia a uma unidade, com as séries de ratos de todos os subgrupos constituindo amostras independentes entre os grupos. A hipótese a ser comprovada é a diferença entre elas. Utilizamos testes paramétricos para os subgrupos pareados do tipo t de Student. Para os subgrupos não pareados utilizamos testes não paramétricos do tipo Mann Whitney. Para todos os testes, as diferenças entre as médias eram consideradas estatisticamente significativas quando eram obtidos valores de “p” menores que 0.05 ($p < 0.05$) [Colton 1974].

3.5 - FASE 2 – MODELO EXPERIMENTAL DE DOR CRÔNICA, CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRA-ORBITAL:

3.5.1 - RANDOMIZAÇÃO DOS ANIMAIS:

Os animais foram divididos em quatro grupos: Grupo 1 - animais submetidos à amarra do nervo infra-orbital e tratados com NTBo-A; Grupo 2 - animais submetidos a amarra do nervo infra-orbital e tratados com SSI 0,9%; Grupo 3 – animais submetidos a exposição do nervo infra-orbital e tratados com NTBo-A (Falso-operados) e Grupo 4 – animais submetidos a exposição do nervo infra-orbital e tratados com SSI 0,9% (Falso-operados). Os animais foram alocados nos grupos aleatoriamente.

3.5.2 – ETAPAS E MODELO DE ESTUDO:

O estudo foi composto por um período Run-in e por três testes comportamentais para avaliação da nocicepção facial (Teste do -20°C). O período Run-in teve uma duração de 21 dias, sendo utilizados para análise inicial dos animais estudados adaptação ambiental e ajuste de peso corpóreo para o início dos primeiros testes. Após esta fase todos os animais foram submetidos ao teste basal do -20°C , também denominado de determinação basal nociceptiva dos animais a estímulos frios (-20°C) ou ainda *grooming* facial. Os animais que nesta fase apresentassem escores menores do que 4 segundos ou maiores do que 14 segundos foram excluídos do estudo. Animais com menos que quatro segundos geralmente não sofrerão sensibilização e os com mais do que 14 segundos já se encontram em um estado de hipersensibilização. Os animais foram então alocados em dois grupos: grupo submetido à amarra do nervo infra-orbital e grupo submetido à exposição do nervo infra-orbital (falso-operado) (Figura 27). Ambos os grupos quatro e seis dias após a cirurgia foram submetidos a novo teste do menos 20°C . Os animais, grupo constricto que não aumentaram seus escores nociceptivos no teste do -20°C em no mínimo 45% dos seus valores basais foram também excluídos. Utilizou-se 45% como valor padrão de hipersensibilização

nociceptiva. No grupo falso-operado o teste menos 20⁰C foi realizado, entretanto não houve exclusões durante esta fase. No sexto dia após a cirurgia os animais incluídos de ambos os grupos foram tratados com NTBo-A e SSI de forma aleatória, subdividindo estes grupos (Figura 27):

Após o tratamento os animais em seus grupos e subgrupos, foram avaliados quanto ao efeito da droga com teste do -20⁰C em diferentes momentos 6 horas; 24 horas; 48 horas; 72 horas e 96 horas após o tratamento (Figura 27).

3.5.3 - DETERMINAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO TÉRMICO (TESTE DO – 20⁰C).

Para a realização do Teste do -20⁰C os animais foram previamente habituados nas caixas de observação por aproximadamente 30 min. As caixas foram confeccionadas na cor branca e apresentavam uma dimensão de 30cmx34cmx30cm respectivamente de largura, comprimento e altura. Um spray de tetrafluoretano foi aplicado, por cerca de 1 segundo, na região inervada pelo nervo infra-orbital (sobre a área de inserção das vibrissas). Imediatamente após a aplicação, o tempo despendido pelos animais executando movimentos de limpeza (i.e. *grooming*) facial bilateral foi registrado durante 2 minutos (Figura 28). Os animais foram submetidos a duas baterias de testes (intervalo de 10 minutos) e a média destes resultados e que caracterizou o limiar nociceptivo térmico (frio) dos animais durante cada bateria de testes.

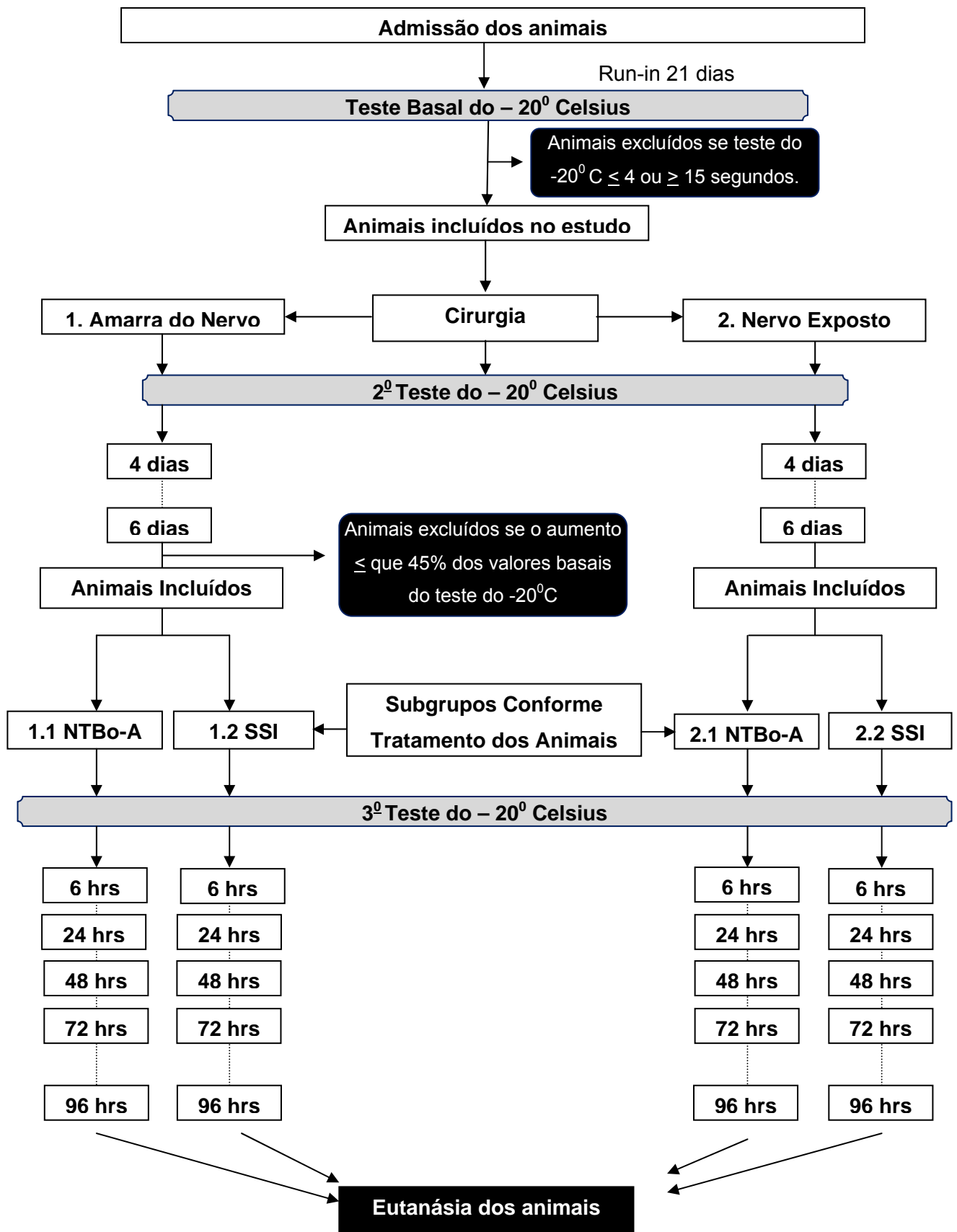


FIGURA 27 - FLUXOGRAMA DOS TESTES REALIZADOS NA FASE II.

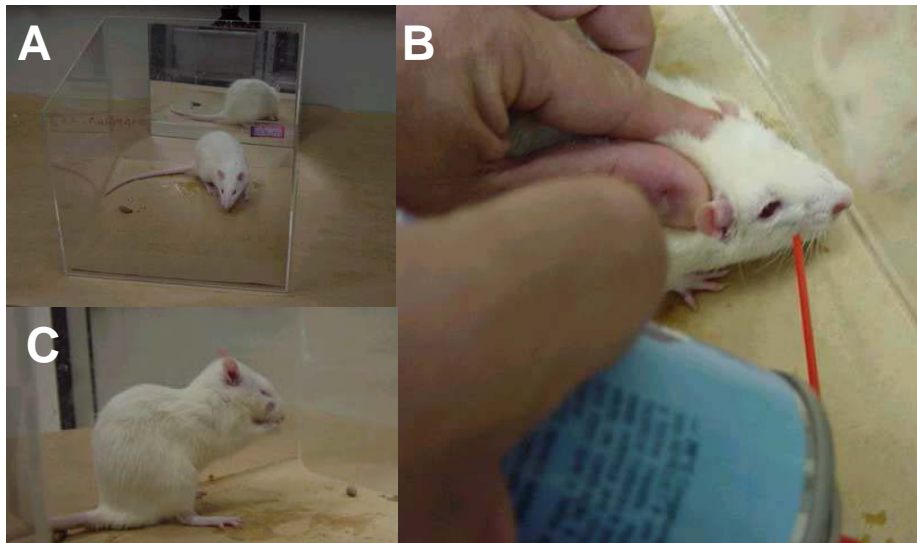


Figura 28 - Teste da estimulação térmica ao frio. A- Habituação do animal no dispositivo; B- Aplicação do tetrafluoretano -20°C ; C- Comportamento de limpeza facial do animal (*grooming*). Figura gentilmente cedida pelo Farmacologista Eduardo Manoel Pereira (Tese de Mestrado em Farmacologia).

3.5.4 – ANESTESIA DOS ANIMAIS:

Os animais que apresentavam limiares de percepção térmica desejável para o estudo (≥ 4 graus e ≤ 14 graus Celsius) foram submetidos à anestesia intraperitoneal objetivando a intervenção cirúrgica, que foi amarra do nervo ou exposição do nervo. Os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (Vetanarcol[®]) e xilazina (Coopazine[®]) (50 e 10 mg/kg, respectivamente, intraperitoneal).

3.5.5 – ESTUDO DA ANATOMIA DO NERVO INFRA-ORBITAL:

Dissecções da região facial foram realizadas em cinco animais com o objetivo do aprendizado da anatomia do animal. Foi dissecado e identificado a emergência do nervo infra-orbital (NIO), destacando suas relações com o nervo facial. Para a identificação do nervo foi realizado uma incisão cirúrgica na pele abaixo do olho direito, três milímetros posterior ao início das vibrissas. Após identificou-se os músculos elevador do lábio superior e masseter superficial anterior que foram rebatidos para que a porção rostral do NIO fosse exposta (Figura 29).

Anatomicamente o nervo é largo, pouco espesso com uma angulação anteroposterior de quase 35 graus dirigindo-se em sentido ao encontro das vibrissas. O NIO é mais profundo do que o nervo facial, que tem sentido oposto, e mais espesso e menos largo (Figura 29). O NIO emerge do crânio através do forâmen infra-orbital deslocando-se em direção as vibrissas acima da fissura infra-orbitária (Figura 29).

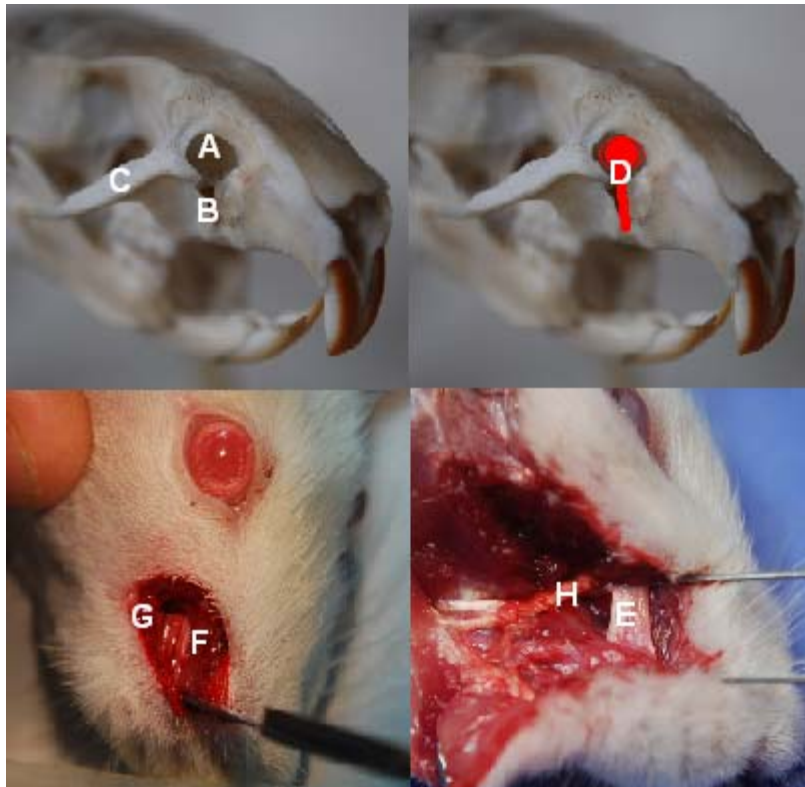


Figura 29 - Anatomia do nervo infra-orbital: A – Forâmen infra-orbital; B – Fissura infra-orbital; C – Arco zigomático; D – Emergência do Nervo infra-orbital; E – Nervo infra-orbital; F – Músculo Elevador do Lábio Superior; G – Músculo Masseter Superficial Anterior; H – Nervo facial.

3.5.6 – EXPOSIÇÃO DO NERVO INFRA-ORBITAL (NIO):

Os animais após serem anestesiados foram dispostos lateralmente sobre a mesa cirúrgica com sua face lateral direita exposta para o cirurgião. As vibrissas dos animais foram fixadas com fita adesiva sobre a superfície da mesa cirúrgica (Figura 30-A). Tricotomia sobre o leito cirúrgico foi realizada, sem agressões sobre as vibrissas (Figura 30-B). A incisão cirúrgica foi

realizada (descrita acima). Durante todo o procedimento cirúrgico o leito operatório é embebido com soro fisiológico 0,9%.

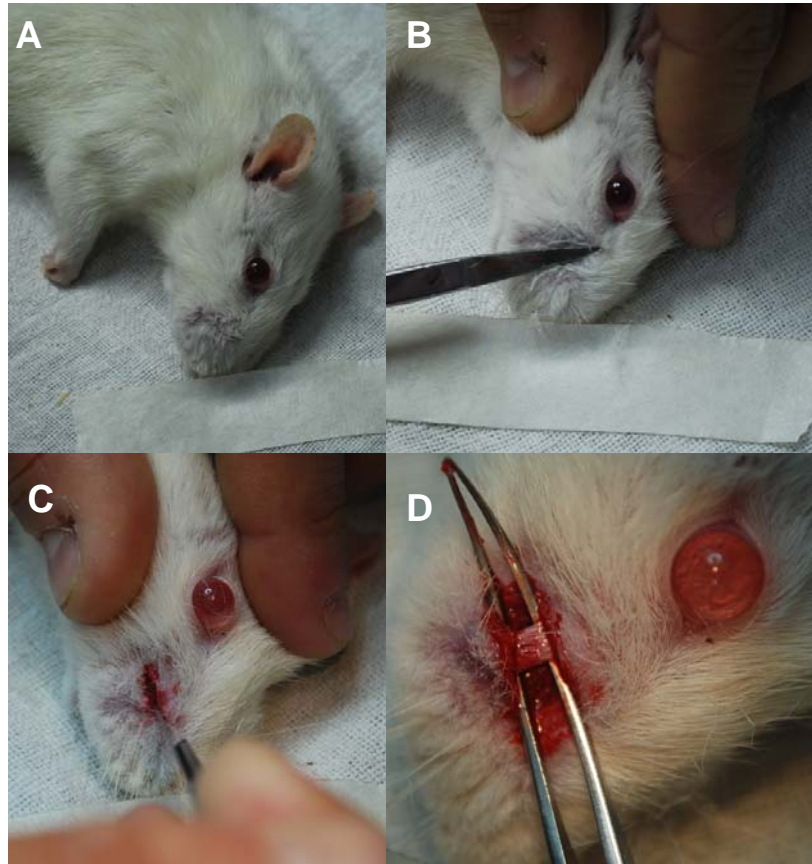


FIGURA 30 - FASES PARA A EXPOSIÇÃO DO NERVO INFRA-ORBITAL: A – FIXAÇÃO DO ANIMAL; B- TRICOTOMIA SOBRE O LEITO CIRÚRGICO; C- INCISÃO CIRÚRGICA; D – EXPOSIÇÃO DO NERVO INFRA-ORBITAL

3.5.7 – CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRA-ORBITAL (NIO):

A constrição do NIO foi realizada seguindo protocolos previamente validados [Chichorro e col., 2006]. Após o NIO ser adequadamente exposto (Figura 30A-D e 31A) foi submetido a duas amarras frouxas, separadas por dois milímetros, com fio de seda 4.0 ao redor do feixe nervoso (Figura 31 A-C). A pele e tecidos adjacentes foram suturados com o mesmo tipo de fio (Figura 31 D). Os animais do grupo falso-operados foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém o feixe nervoso não foi constricto somente exposto. Ao término da cirurgia os animais foram mantidos em sala aquecida até completa recuperação da anestesia.

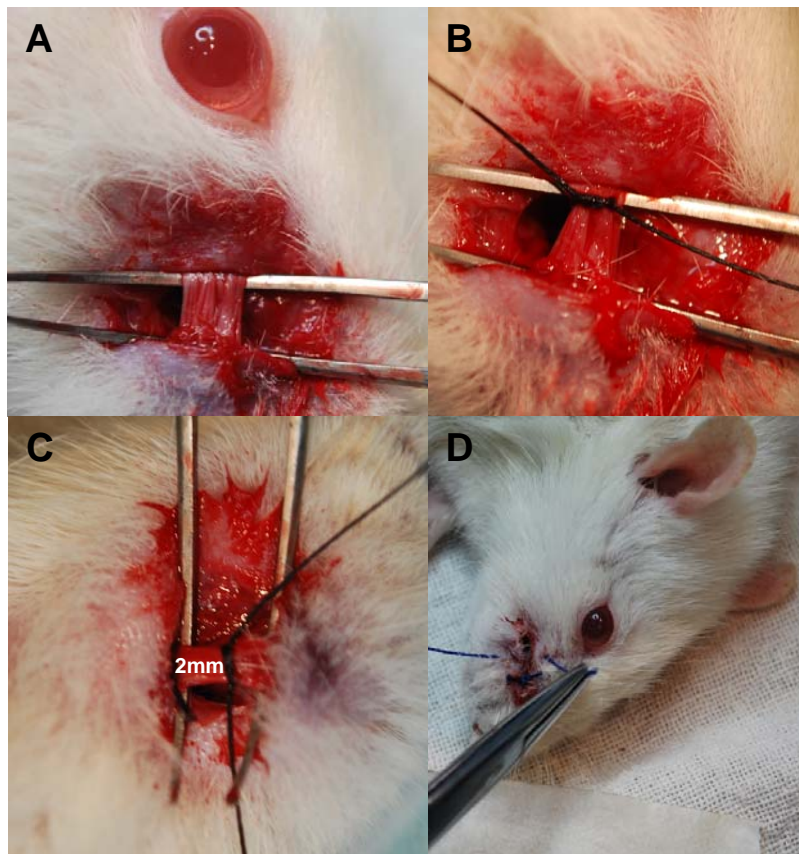


Figura 31 - Constrição do nervo infra-orbital: A – Exposição do nervo; B – Primeira amarra sobre o nervo infra-orbital; C – Segunda amarra sobre o nervo infra-orbital; D – Fechamento dos planos superficiais.

3.5.8 – AVALIAÇÃO DA HIPERNOCICEPÇÃO AO FRIO (TESTE DO -20°C):

Para avaliação do decurso temporal da hipernocicepção ao frio a estimulação foi realizada no lado ipsilateral a cirurgia. Foi considerado como hipernocicepção os animais que aumentaram os seus escores acima de 45% dos seus valores basais. Os animais falso-operados também foram avaliados nesta ocasião. Neste grupo não foram descartados os animais que não sofreram hipernocicepção, uma vez que a ausência deste fenômeno era esperada.

3.5.9 – RANDOMIZAÇÃO DOS ANIMAIS APÓS HIPERNOCICEPÇÃO:

Os animais com hipernocicepção secundária ao procedimento de amarra cirúrgica e os falso-operados foram alocados aleatoriamente em dois subgrupos: Subgrupo 1 – animais tratados com NTBo-A; Subgrupo 2 – animais tratados com SSI.

As drogas foram aplicadas sobre o local das cirurgias. Para aplicação utilizamos seringa/agulha de insulina marca BD ultrafine 30G, com oito milímetros de comprimento (5/16”) e um calibre de 0,3mm (30G). As doses de NTBo-A foram de 15 unidades por Kg de peso com volume de 30µl/Kg ou SSI 30µl/Kg.

3.5.10 – TESTE DO – 20⁰C APÓS O TRATAMENTO FARMACOLÓGICO:

Após aplicação das drogas foram realizados novos testes do – 20⁰C conforme protocolo anterior: seis; 24; 48; 72 e 96 horas após o tratamento (Figura 27).

3.5.11 – TESTES ESTATÍSTICOS:

Considerou-se que cada rato correspondia a uma unidade, com as séries de ratos para os grupos constituindo amostras independentes entre eles. A hipótese a ser comprovada é a diferença entre elas.

Todos os grupos e subgrupos foram submetidos ao teste de Komogoron-Smirnov para a determinação da homogeneidade dos dados. Foram utilizados teste de Análise de Variância Multivariável para medidas repetidas (ANOVA de medidas repetidas seguidas do teste de Scheffe). Foram também aplicados os testes de ANOVA de medidas repetidas seguidas dos testes de Tukey e Bonferroni. Como os resultados foram semelhantes, somente os testes de Scheffe foram descritos.

Para todos os testes, as diferenças entre as médias eram consideradas estatisticamente significativas quando eram obtidos valores de “p” menores que 0.05 ($p < 0.05$) [Colton 1974].

3.6 – COMITÊ DE ÉTICA EM ANIMAIS:

O estudo foi registrado no BANPESQ (Anexo 3). Submetido ao comitê de ética em animais do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (Anexo 4). Todos os procedimentos sobre os animais foram realizados conforme os guias internacionais sobre ética na utilização de animais e, esforços foram feitos para minimizar o sofrimento e o número de animais utilizados. Todos os experimentos aderiram aos guias do Comitê para Pesquisa e Ética em Animais da IASP (Associação Internacional de Estudos para Dor) [Pain 1983].

4. RESULTADOS

4.1 – PRIMEIRA FASE DO ESTUDO:

Os resultados dos testes aplicados foram descritos em tabelas e gráficos. Foram incluídos 95 animais (48 no grupo NTBo-A e 47 no grupo SSI). No grupo SSI, subgrupo 29 dias somente sete animais foram incluídos. Todos os outros grupos receberam oito animais por subgrupo. Foram avaliados: variação de peso; número de unidades e volume da droga injetada; teste do campo aberto; teste da formalina; teste da cruz elevada; teste do campo aberto versus o campo escuro e avaliação de eventuais efeitos colaterais.

4.1.1 – PESO.

4.1.1.1 – AVALIAÇÃO DO PESO NOS DIFERENTES MOMENTOS DO ESTUDO.

O peso dos animais antes do primeiro bloqueio “tempo zero” (peso 1), antes do segundo bloqueio “tempo 42 dias” (peso 2) e ao final do estudo “tempo 84 dias” (peso 3) foram descritos (Anexo 5 para NTBo-A) e (Anexo 6 para SSI). A variação de peso no transcorrer do estudo foi avaliada individualmente para cada grupo e subgrupo (Anexo 7 para NTBo-A) e (Anexo 8 para SSI). O peso médio 1,2 e 3 para os grupo NTBo-A e grupo SSI foram descritos (Anexo 9). A análise estatística demonstrou que os dois grupos apresentavam pesos semelhantes no início, 42 dias e ao final do estudo (Anexo 9).

4.1.1.2 – PORCENTAGEM DE VARIAÇÃO DE PESO NOS DIFERENTES MOMENTOS.

Para a análise estatística do ganho de peso, calculamos a porcentagem de ganho de peso de cada animal em relação ao seu peso anterior: porcentagem de ganho de peso antes do segundo bloqueio (T2-T1); porcentagem de ganho de peso ao final do estudo (T3-T2) e (T3-T1). Os valores são descritos no Anexo 9 para ambos os grupos. A variação da porcentagem de ganho de peso nos diferentes momentos mostrou que os animais ganharam peso à medida que o estudo foi sendo conduzido de forma semelhante (Anexo 7 e 8).

4.1.2 – UNIDADES E VOLUME DE FÁRMACOS ADMINISTRADOS.

Administrou-se 15 unidades de NTBo-A por Kg/peso durante o primeiro e segundo tratamentos (Anexos 10 e 11). O volume aplicado em ambos os grupos foi de 30µl por Kg/peso de NTBo-A ou de SSI (Anexos 10 e 11). A análise estatística mostrou volumes semelhantes em ambos os grupos para todos os momentos (Anexo 12).

4.1.3 – TESTE DO CAMPO ABERTO (TCA).

Os valores descritivos da latência, número de casas andadas, número de levantamentos do animal e tempo de imobilidade após o primeiro e segundo tratamentos foram descritos (Anexos 13 e 15 para NTBo-A e Anexos 14 e 16 para SSI).

4.1.3.1- LATÊNCIA:

4.1.3.1.1 - LATÊNCIA APÓS O PRIMEIRO BLOQUEIO:

A latência média para o início dos movimentos no subgrupo 24 horas foi de $20,63 \pm 14,4$ segundos para o grupo NTBo-A e de $6,38 \pm 11,08$ segundos para o grupo SSI. A análise mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p=0,044$). As comparações para os outros subgrupos foram semelhantes. (Anexo 17 e Gráfico 1).

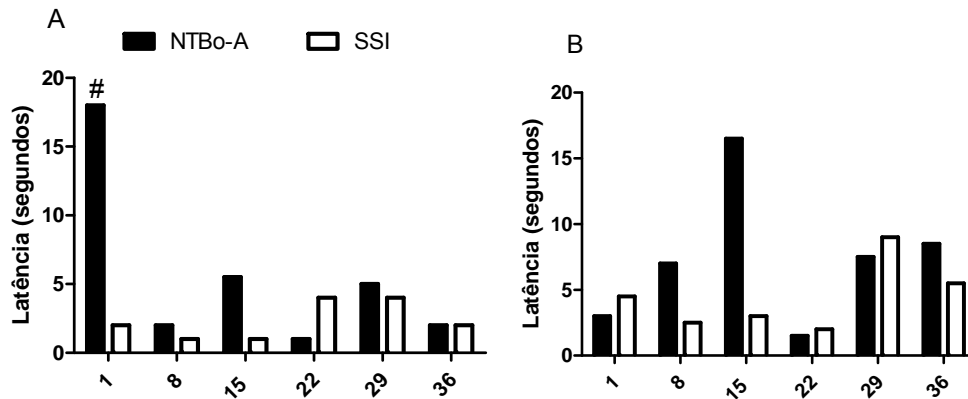


Gráfico 1 - Latência para início dos movimentos dentro do campo aberto. Após primeiro tratamento (painel A) após segundo tratamento (painel B). Tempo (1) 24 horas após tratamento, (8) oito dias após tratamento, (15) quinze dias após tratamento, (22) vinte e dois dias após tratamento, (29) vinte e nove dias após tratamento, (36) trinta e seis dias após tratamento. Cerquilha denota um $P < 0,05$ entre o grupo NTBo-A e SSI (Utilizados os testes de t-Student e de Mann-Whitney para o subgrupo 29 dias).

4.1.3.1.2 - LATÊNCIA APÓS O SEGUNDO BLOQUEIO:

A latência média para o início dos movimentos nos diferentes subgrupos para os grupos NTBo-A e SSI foram semelhantes (Anexo 18 e Gráfico 3).

4.1.3.2 - NÚMERO DE CASAS ANDADAS.

O número de casas andadas foi semelhante entre os subgrupos dos grupos NTBo-A e SSI após o primeiro tratamento (Anexo 19) e após o segundo tratamento (Anexo 20).

4.1.3.3 - NÚMERO DE LEVANTAMENTOS:

O número de levantamentos após primeiro e segundos tratamentos foram semelhante entre os grupos NTBo-A e SSI nos diferentes subgrupos (Anexo 21 e 22 respectivamente).

4.1.3.4 - TEMPO DE IMOBILIDADE:

O tempo de imobilidade dos subgrupos para os grupos NTBo-A e SSI foram semelhantes após primeiro (Anexo 23) e após segundo tratamentos (Anexo 24).

4.1.3.5 – VARIAÇÃO DO CAMPO ABERTO DURANTE O PRIMEIRO VERSUS O SEGUNDO **Bloqueios:**

Durante o estudo avaliamos o padrão de resposta dos animais ao TCA, comparando os seus resultados antes do primeiro TF com os resultados antes do segundo TF. Os resultados mostraram que a latência para o início dos movimentos foi semelhante em ambos os grupos e seus subgrupos (Anexo 25). No quesito número de casas andadas, observamos que o comportamento dos animais no primeiro e no segundo momento foi bem distinto, exceto para o subgrupo 36 dias onde os comportamentos foram semelhantes em ambos os grupos (Anexo 26 e Gráfico 2). No quesito número de levantamentos e tempo de imobilidade os resultados foram muito variáveis nos diferentes subgrupos dos grupos NTBo-A e SSI (Anexo 27 e Gráfico 3 e Anexo 28 e Gráfico 4).

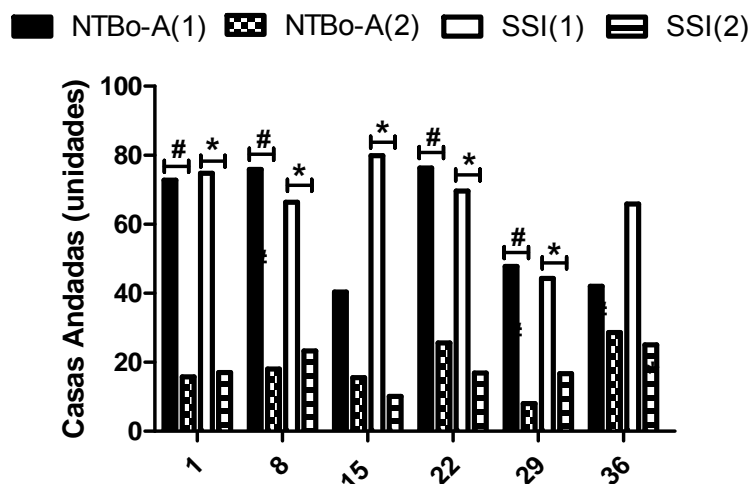


Gráfico 2 - Teste do Campo Aberto – Número de casas andadas antes do primeiro tratamento versus antes do segundo tratamento. Tempo (1) 24 horas após tratamento, (8) oito dias após tratamento, (15) quinze dias após tratamento, (22) vinte e dois dias após tratamento, (29) vinte e nove dias após tratamento, (36) trinta e seis dias após tratamento. Cerquilha denota um $P < 0,05$ para o grupo NTBo-A antes do primeiro tratamento versus antes do segundo tratamento. Asterisco denota um $P < 0,05$ para o grupo SSI antes do primeiro tratamento versus antes do segundo tratamento (Utilizados o teste de t-Student). NTBo-A(1)- neurotoxina botulínica do tipo-A antes do primeiro tratamento, NTBo-A(2) neurotoxina botulínica do tipo-A antes do segundo tratamento, SSI (1) solução salina isotônica antes do primeiro tratamento, SSI (2) solução salina isotônica antes do segundo tratamento.

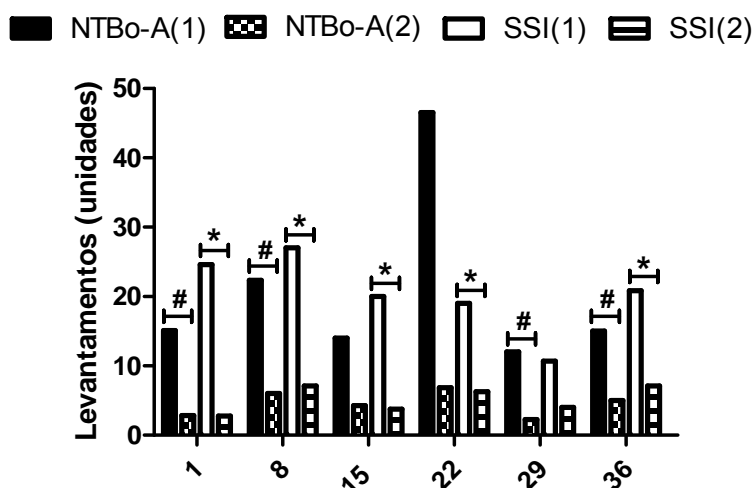


Gráfico 3 - Teste do Campo Aberto – Levantamentos antes do primeiro tratamento versus antes do segundo tratamento. Tempo (1) 24 horas após tratamento, (8) oito dias após tratamento, (15) quinze dias após tratamento, (22) vinte e dois dias após tratamento, (29) vinte e nove dias após tratamento, (36) trinta e seis dias após tratamento. Cerquilha denota um $P < 0,05$ para o grupo NTBo-A antes do primeiro tratamento versus antes do segundo tratamento. Asterisco denota um $P < 0,05$ para o grupo SSI antes do primeiro tratamento versus antes do segundo tratamento (Utilizados o teste de t-Student). NTBo-A(1)- neurotoxina botulínica do tipo-A antes do primeiro tratamento, NTBo-A(2) neurotoxina botulínica do tipo-A antes do segundo tratamento, SSI (1) solução salina isotônica antes do primeiro tratamento, SSI (2) solução salina isotônica antes do segundo tratamento.

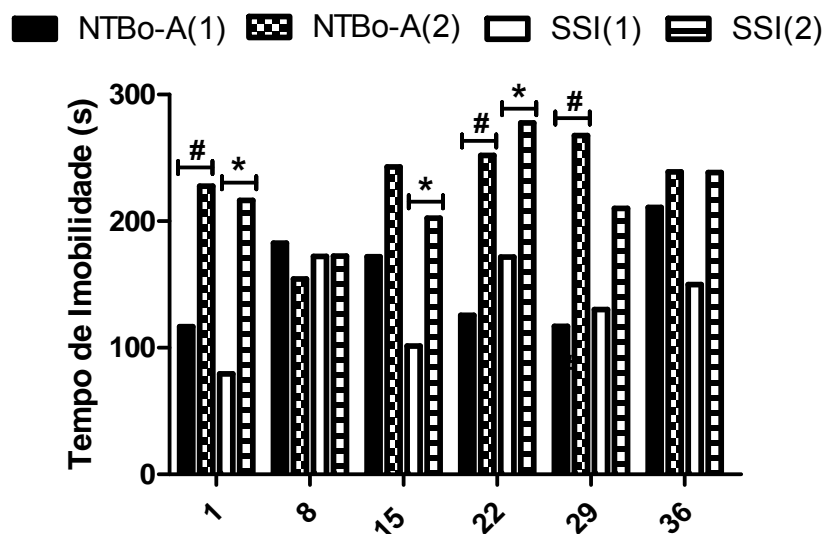


Gráfico 4 - Teste do Campo Aberto – Tempo de Imobilidade antes do primeiro tratamento versus antes do segundo tratamento. Tempo (1) 24 horas após tratamento, (8) oito dias após tratamento, (15) quinze dias após tratamento, (22) vinte e dois dias após tratamento, (29) vinte e nove dias após tratamento, (36) trinta e seis dias após tratamento. Cerquilha denota um $P < 0,05$ para o grupo NTBo-A antes do primeiro tratamento versus antes do segundo tratamento. Asterisco denota um $P < 0,05$ para o grupo SSI antes do primeiro tratamento versus antes do segundo tratamento (Utilizados o teste de t-Student). NTBo-A(1)- neurotoxina botulínica do tipo-A antes do primeiro tratamento, NTBo-A(2) neurotoxina botulínica do tipo-A antes do segundo tratamento, SSI (1) solução salina isotônica antes do primeiro tratamento, SSI (2) solução salina isotônica antes do segundo tratamento.

4.1.3.6 – ANÁLISE GERAL DOS RESULTADOS DO CAMPO ABERTO:

Em resumo o TCA mostrou que os animais tratados com NTBo-A e avaliados 24 horas após o primeiro tratamento apresentavam uma maior latência para o início dos movimentos que os animais tratados com SSI. Todas as outras comparações não foram significativas. A análise intra-grupo e intra-subgrupos após primeiro versus segundo tratamentos em quase todas as variáveis foram estatisticamente significativas.

4.1.4 – TESTE DA FORMALINA 2.5% (TF).

4.1.4.1 – ANÁLISE DESCRITIVA DO TF APÓS O PRIMEIRO E SEGUNDO TRATAMENTOS:

Os resultados obtidos durante o TF para o grupo NTBo-A em seus diferentes subgrupos foram descritos (Anexo 29) após o primeiro e (Anexo 30) após o segundo tratamentos. Para o grupo SSI os resultados foram descritos

(Anexo 31) após o primeiro e (Anexo 32) após o segundo tratamentos. Os resultados foram também apresentados conforme as etapas do TF (fase neurogênica e fase inflamatória). Os valores médios também foram descritos após o primeiro (Anexo 33) e após o segundo tratamentos (Anexo 34).

4.1.4.2 – ANÁLISE ESTATÍSTICA COMPARATIVA DO TF 2.5% - FASE NEUROGÊNICA.

Após o primeiro (Anexo 35) e segundo (Anexo 36) tratamentos nos dois grupos e em seus diferentes subgrupos não houve diferenças de comportamento para fase neurogênica entre os animais estudados (Tabela 35 e 36).

4.1.4.3 – ANÁLISE DO TESTE DA FORMALINA 2.5% - FASE INFLAMATÓRIA.

O grupo NTBo-A após o primeiro tratamento, subgrupo oito dias, apresentou menores escores do que o grupo SSI ($p=0,011$) (Anexo 37- Gráfico 5). Todos os outros subgrupos após o primeiro tratamento e após o segundo tratamento foram estatisticamente semelhantes (Anexo 37, 38 e Gráfico 5).

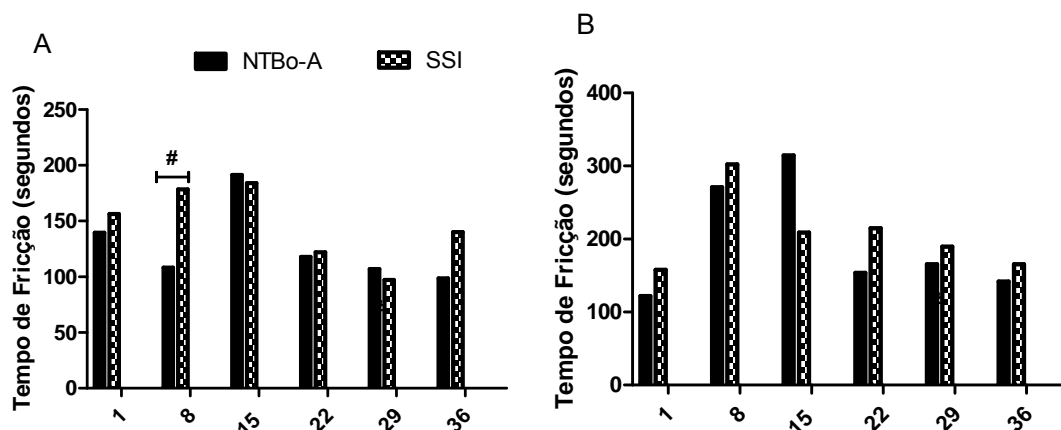


GRÁFICO 5 - TESTE DA FORMALINA 2,5% – FASE INFLAMATÓRIA. TEMPO (1) 24 HORAS APÓS TRATAMENTO, (8) OITO DIAS APÓS TRATAMENTO, (15) QUINZE DIAS APÓS TRATAMENTO, (22) VINTE E DOIS DIAS APÓS TRATAMENTO, (29) VINTE E NOVE DIAS APÓS TRATAMENTO, (36) TRINTA E SEIS DIAS APÓS TRATAMENTO. CERQUILHA DENOTA UM $P < 0,05$ NA COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A (NTBo-A) E SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA (SSI) (UTILIZADOS O TESTE DE T-STUDENT). PAINEL A TESTES APÓS O PRIMEIRO TRATAMENTO, PAINEL B TESTES APÓS O SEGUNDO TRATAMENTO.

4.1.4.4 – ANÁLISE GERAL DOS RESULTADOS DO TESTE DA FORMALINA 2,5%.

Em resumo o TF mostrou que os animais tratados com NTBo-A e avaliados 8 dias após o seu primeiro tratamento farmacológico demonstraram menores escores para dor na fase inflamatória quando comparados com o mesmo subgrupo do grupo SSI. Todas as outras comparações em todos os outros subgrupos após primeiro e segundo tratamentos farmacológicos para a fase inflamatória e neurogênica não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

4.1.5 – TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADA (TLCE).

4.1.5.1 – RESULTADOS DESCRITIVOS.

O TLCE foi realizado em único momento ao das avaliações dos testes de formalina 2,5%. Os resultados da latência para o início dos movimentos; número de entradas no braço aberto; número de entradas no braço fechado; número total de entradas (braço aberto mais braço fechado); tempo

despendido no braço fechado; tempo despendido no braço aberto e tempo no campo neutro para o grupo NTBo-A foram descritos (Anexo 39) e para o grupo SSI (Anexo 40).

A porcentagem de entradas no braço aberto (%EBA), porcentagem de entradas no braço fechado (%EBF), porcentagem de tempo no braço aberto (%TBA), porcentagem de tempo no braço fechado (% TBF), porcentagem de tempo no campo neutro (% TCN.) e número de quedas (NQ) para o grupo NTBo-A foram descritas (Anexo 41) e para o grupo SSI (Anexo 42).

4.1.5.2 – ANÁLISE COMPARATIVA DO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADA:

4.1.5.2.1 - LATÊNCIA:

Nos diferentes subgrupos não se observou diferenças na latência para o início dos movimentos entre os grupos NTBo-A e SSI (Anexo 43).

4.1.5.2.2 - PORCENTAGEM DE ENTRADAS NO BRAÇO ABERTO (%EBA):

Não registramos diferenças entre os subgrupos de ambos os grupos estudados (Anexo 44).

4.1.5.2.3 - PORCENTAGEM DE ENTRADAS NO BRAÇO FECHADO (%EBF):

Nos diferentes subgrupos não se observou diferenças na %EBF entre os grupos NTBo-A e SSI (Anexo 45).

4.1.5.2.4 - PORCENTAGEM DE TEMPO NO BRAÇO ABERTO (%TBA):

A % TBA no subgrupo 24 horas foi menor para o grupo NTBo-A do que o grupo SSI ($p=0,043$) (Anexo 46 e Gráfico 6). No subgrupo 29 dias a %TBA foi maior no grupo NTBo-A do que o grupo SSI ($p=0,006$) (Anexo 46 e Gráfico 6).

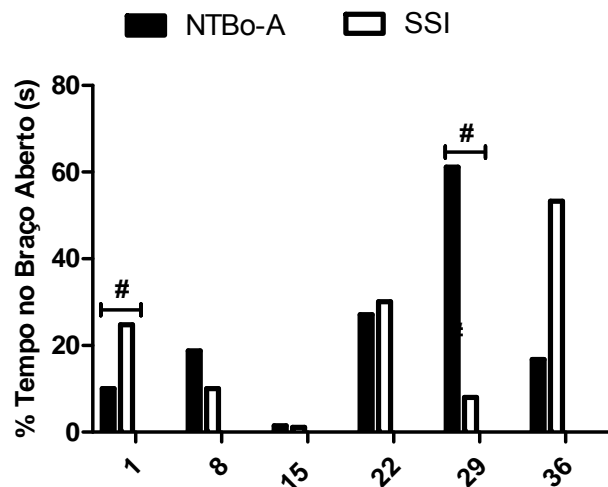


Gráfico 6 - Teste do Labirinto em Cruz Elevada – % de Tempo no Braço Aberto. Tempo (1) 24 horas após tratamento, (8) oito dias após tratamento, (15) quinze dias após tratamento, (22) vinte e dois dias após tratamento, (29) vinte e nove dias após tratamento, (36) trinta e seis dias após tratamento. Cerquilha denota um $P < 0,05$ na comparação entre o grupo Neurotoxina botulínica do tipo-A (NTBo-A) e solução salina isotônica (SSI) (Utilizados o teste de t-Student e de Mann-Whitney para o subgrupo 29 dias).

4.1.5.2.5 - PORCENTAGEM DE TEMPO NO BRAÇO FECHADO (%TBF):

Nos diferentes subgrupos não se observou diferenças na % TBF entre os grupos NTBo-A e SSI (Anexo 47).

4.1.5.2.6 - PORCENTAGEM DE TEMPO NO CAMPO NEUTRO “CENTRAL” (%TCN):

A porcentagem de tempo despendido dentro do campo neutro foi maior no subgrupo 24 horas do grupo NTBo-A do que o grupo SSI ($p=0,045$) (Anexo 48 e Gráfico 7). Em todos os outros subgrupos não houve diferenças entre os grupos (Anexo 48 e Gráfico 7).

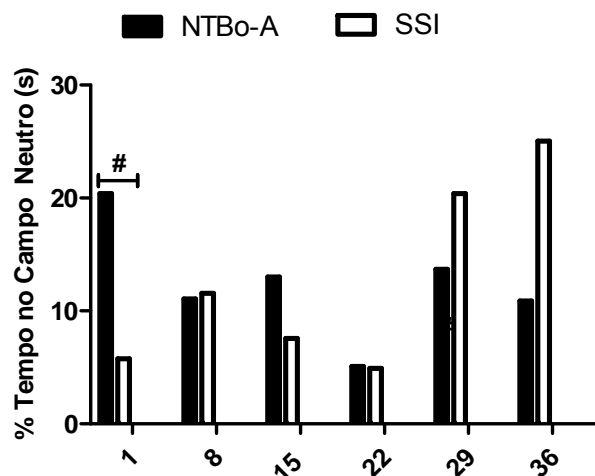


GRÁFICO 7 - TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADA – % DE TEMPO NO CAMPO NEUTRO. TEMPO (1) 24 HORAS APÓS TRATAMENTO, (8) OITO DIAS APÓS TRATAMENTO, (15) QUINZE DIAS APÓS TRATAMENTO, (22) VINTE E DOIS DIAS APÓS TRATAMENTO, (29) VINTE E NOVE DIAS APÓS TRATAMENTO, (36) TRINTA E SEIS DIAS APÓS TRATAMENTO. CERQUILHA DENOTA UM $P < 0,05$ NA COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A (NTBo-A) E SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA (SSI) (UTILIZADOS O TESTE DE T-STUDENT E DE MANN-WHITNEY PARA O SUBGRUPO 29 DIAS).

4.1.5.2.7 - NÚMERO DE QUEDAS (NQ):

O número de quedas para o subgrupo 15 dias foi menor no grupo NTBo-A do que o grupo SSI ($p=0,041$) (Anexo 49). Para os demais subgrupos não houve diferenças (Anexo 49).

4.1.5.3 - ANÁLISE GLOBAL DO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADA:

A análise global somando-se todos os animais dos subgrupos do grupo NTBo-A ($n=48$) e do grupo SSI ($n=47$) mostrou que não existem diferenças estatisticamente significativas entre todas as variáveis estudadas entre os grupos NTBo-A e SSI (Anexo 50).

4.1.5.4 - ANÁLISE GERAL DOS RESULTADOS DO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADA (TCE):

Em resumo o TLCE mostrou que os animais tratados com NTBo-A e avaliados 24 horas após o segundo tratamento apresentavam uma menor porcentagem de tempo no braço aberto e uma maior porcentagem de tempo no

campo neutro. Os animais avaliados 29 dias após o segundo tratamento com NTBo-A apresentavam uma maior porcentagem de tempo no braço aberto.

Os animais avaliados após 15 dias com NTBo-A apresentavam um menor número de quedas. Todas as outras avaliações não foram estatisticamente significativas.

4.1.6 – TESTE DO CAMPO CLARO VERSUS ESCURO (TCCVE)

4.1.6.1 – RESULTADOS DESCRITIVOS:

Os parâmetros de latência, número de transições entre os dois campos, tempo despendido dentro do campo escuro e o tempo despendido dentro do campo claro para o grupo NTBo-A e SSI foram descritos (Anexos 51 e 52) respectivamente.

4.1.6.2 – ANÁLISE COMPARATIVA DO TCCVE.

4.1.6.2.1- LATÊNCIA:

Nos diferentes subgrupos não se observou diferenças na latência entre os grupos NTBo-A e SSI (Anexo 53).

4.1.6.2.2- NÚMERO DE ENTRADAS NO CAMPO ESCURO:

Nos diferentes subgrupos não se observou diferenças no número de entradas no campo escuro entre os grupos NTBo-A e SSI (Anexo 54).

4.1.6.2.3 - TEMPO DESPENDIDO DENTRO DO CAMPO ESCURO (TCE):

Nos diferentes subgrupos não se observou diferenças no TCE entre os grupos NTBo-A e SSI (Anexo 55).

4.1.6.2.4 TEMPO DESPENDIDO DENTRO DO CAMPO CLARO (TCC):

Nos diferentes subgrupos não se observou diferenças no TCC entre os grupos NTBo-A e SSI (Anexo 56).

4.1.6.3 - AVALIAÇÃO DESCRITIVA E COMPARATIVA GLOBAL DO TESTE DO CAMPO CLARO VERSUS ESCURO:

A avaliação global (em todas as suas variáveis) para todos os animais do grupo NTBo-A (n=48) e todos os animais do grupo SSI (n=47), foram semelhantes entre si e descritos (Anexo 57).

4.1.6.4 - ANÁLISE GERAL DOS RESULTADOS DO TESTE DA CAMPO CLARO VERSUS ESCURO (TCCE):

Em resumo o TCCE não mostrou nenhuma diferença estatística em todas as variáveis para todos os grupos e subgrupos estudados.

4.2 – SEGUNDA FASE DO ESTUDO:

Os resultados dos testes aplicados foram descritos em tabelas e gráficos. Foram incluídos 89 animais. Foram inicialmente realizados testes comportamentais para determinar o limiar de nocicepção térmica ao frio (LNT) utilizando-se do teste de menos vinte graus Celsius (-20⁰C). Esta fase foi chamada de fase nocicepção térmica basal (NTB). Os animais que preenchem os critérios foram alocados para a segunda etapa desta fase que era o procedimento cirúrgico para exposição do nervo ou para amarra do nervo.

4.2.1 – TESTE DO -20⁰C, FASE BASAL DO ESTUDO:

4.2.1.1 – RANDOMIZAÇÃO:

Oitenta e nove animais foram alocados para o estudo. Cinquenta animais foram excluídos na fase NTB (quarenta e oito animais com escores menores que 4 segundos e dois por apresentares escores maiores que 15 segundos) (Anexos 58 e 59). Dos 39 animais restantes, vinte e quatro foram selecionados para serem submetidos ao procedimento de amarra do nervo e quinze para o procedimento de exposição do nervo.

4.2.2 – ANÁLISE DESCRITIVA DO PESO:

Os animais foram pesados no momento do teste basal, seis e dez dias após o procedimento cirúrgico (Anexo 60). As mudanças de peso a partir do início do estudo foram descritas em gramas e em porcentagem (Anexo 61). A análise estatística mostrou que em todos os momentos e em todos os grupos não ocorreram diferenças significativas no peso dos animais sugerindo que as diferentes drogas e os diferentes procedimentos cirúrgicos não produziram interferência sobre o peso dos animais (Anexo 62).

4.2.3 – VOLUME E UNIDADES DE NTBo-A APLICADA NOS ANIMAIS:

O volume de solução salina isotônica 0,9% e de NTBo-A bem como a quantidade de unidades de NTBo-A aplicados nos animais foram descritos (Anexo 28).

4.2.4 – RANDOMIZAÇÃO APÓS A CIRURGIA:

Dos 24 animais submetidos à amarra do nervo infra-orbital oito foram excluídos porque não apresentarem sensibilização superior a 45% dos seus escores basais. Dos dezesseis animais, oito foram alocados para o grupo tratado com NTBo-A (Grupo 1) e oito para o grupo tratado com SSI (Grupo 2). Dos quinze animais submetidos à exposição do nervo sete foram alocados para o grupo tratado com NTBo-A (Grupo 3) e oito para o grupo tratados com SSI (Grupo 4) (Anexo 58 e 59).

4.2.5 – HIPERNOCICEPÇÃO TÉRMICA:

Os limiares nociceptivos em seus diferentes momentos e para todos os grupos foram descritas em anexos conforme os grupos estudados: grupo 1 (Anexo 63); grupo 2 (Anexo 64); grupo 3 (Anexo 65) e grupo 4 (Anexo 66). A análise estatística comparativa mostrou que no sexto dia após a cirurgia os animais submetidos à amarra do nervo (Grupos 1 e 2) encontravam-se com hipernocicepção quando comparados com o grupo controle (Grupos 3 e 4) (Anexo 66). Seis horas após a aplicação de NTBo-A esta hipersensibilização foi totalmente revertida tornando-se semelhante aos controles não hipersensibilizados previamente (Gráfico 8). O efeito antinociceptivo da NTBo-A permaneceu presente durante as avaliações de 24 horas, 48 horas e até 72

horas (Anexo 66 e Gráfico 8). O efeito analgésico da NTBo-A perde consistência após o quarto dia de tratamento, quando então readquire um estado de hipernocicepção (Anexo 67 e Gráficos 8).

● Constrito + NTBo-A ▼ Falso Operado + SSI
 ■ Constrito + SSI ▲ Falso Operado + NTBo-A

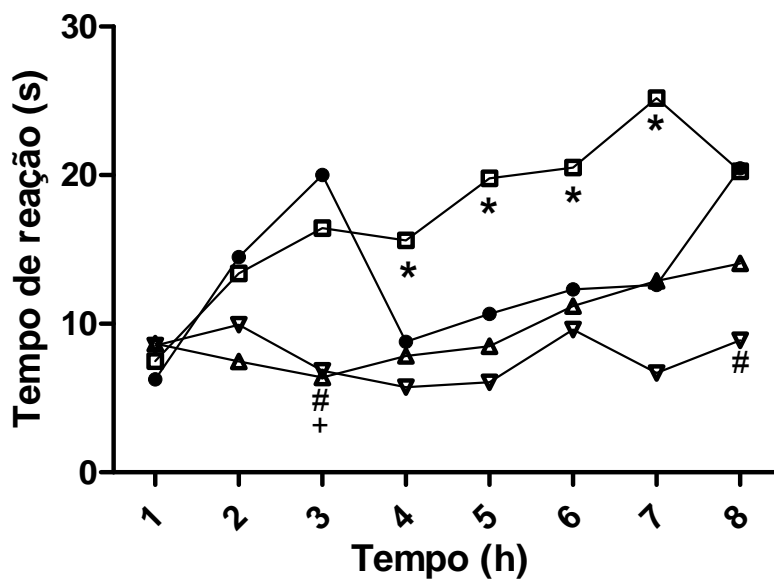


Gráfico 8 – Efeito de todos os tratamentos sobre o nervo infra-orbital na hipernocicepção ao frio (-20°C) em animais submetidos à constrição do nervo infra-orbital. No 6^o dia após a cirurgia, os animais operados e falso operados foram tratados com NTBo-A ou SSI (15 unidades/kg). Os tempos 1 (basal), 2 (48 horas após cirurgia), 3 (96 horas após cirurgia), 4 (6 horas após tratamento), 5 (24 horas após tratamento), 6 (48 horas após tratamento), 7 (72 horas após tratamento), 8 (96 horas após tratamento). Os valores representam média do tempo de reação ante a aplicação do estímulo frio (n=8 animais exceto o grupo falso operado e tratado com NTBo-A com 7 animais). Asteriscos, cerquilhas e cruz denotam $P < 0,05$ em relação ao grupo operado (constrito) e tratado com NTBo-A. Utilizado ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Scheffe. (Neurotoxina botulínica do tipo A), SSI (Solução salina isotônica 0,9%).

4.4 - EFEITOS COLATERAIS:

4.4.1 - FASE I DO ESTUDO:

Dos 48 animais do grupo NTBo-A um animal apresentou paralisia muscular cervical, caracterizando-se por desvio cefálico para a direita (flexão lateral para a direita) 29 dias após o segundo tratamento (Figura 23).



Figura 2 - Animal com Efeito Colateral - Desvio lateral da cabeça para o lado direito. A análise da marcha mostrou pequena dificuldade para flexão dorsal e ventral do membro anterior direito. A exploração anatômica do músculo cervical mostrou presença de fasciculações sobre os músculos acromiotrapézio e clavotrapézio (Anexo 2). Dos 47 animais do grupo SSI nenhum animal demonstrou efeitos colaterais motores durante a análise de marcha (durante o teste de campo aberto).

4.4.2 - FASE II DO ESTUDO:

Nenhuma alteração comportamental ou motora foi registrada.

5. DISCUSSÃO

5.1 – Efeito Antinociceptivo da NTBo-A:

O estudo mostrou que a neurotoxina botulínica do tipo-A apresentou efeito sobre um modelo de dor aguda e sobre um modelo de dor crônica. Sobre o modelo de dor aguda a NTBo-A age como profilático, e sobre o modelo de dor crônica atua como analgésico.

5.1.1 – Efeito antinociceptivo profilático da NTBo-A “evidências clínicas”:

As evidências clínicas do efeito profilático da NTBo-A são muito limitadas e com resultados conflitantes. A utilização de NTBo-A sobre as formas de migrânea episódicas tem se mostrado pouco efetivas [Elkind e col. 2006, Relja e col 2007]. A NTBo-A utilizada com aplicações múltiplas (três aplicações intercaladas por períodos de até três meses) mostrou que a NTBo-A não demonstra efetividade profilática terapêutica ou efeitos colaterais estatisticamente significativos quando comparados com o grupo placebo (soro fisiológico) [Aurora e col., 2007].

Outros trabalhos sugerem boa resposta enquanto podem oscilar com pouca efetividade no transcorrer dos estudos [Jakubowski e col., 2006]. Segundo estudos recentes os “bons pacientes para tratamento profilático” são aqueles que apresentam migrânea episódica com dores que se manifestam como pulsáteis de fora para dentro (imploding headache) enquanto que os maus pacientes (que não respondem a NTBo-A) são os que manifestam cefaléia com características pulsáteis de dentro para fora (exploding headaches) [Jakubowski e col., 2006]. A justificativa dos autores se baseia no fato que as cefaléias centríptas se originam de estruturas extracranianas enquanto as cefaléia centrifugas se originam de estruturas intracranianas.

5.1.2- Efeito antinociceptivo profilático da NTBo-A “evidências pré-clínicas”:

Em um estudo pré-clínico objetivando avaliar o efeito antinociceptivo da NTBo-A foi injetado como tratamento preventivo nas patas de ratos (dosagens de 3.5, 7, 15 e 30 U/Kg de peso). A NTBo-A inibiu o efeito da injeção de formalina na fase II (inflamatória) do teste da formalina não tendo efeito sobre a fase I (fase neurogênica). Os efeitos foram observados a partir de 5 horas e tiveram uma duração de até 12 dias após o tratamento. A produção local de

glutamato também foi inibida nas dosagens de 3.5, 7 e 15 U/Kg de peso. O estudo demonstrou que a NTBo-A tem efeito profilático sobre um modelo de dor aguda induzida pela formalina [Cui e col., 2004].

Animais pré-tratados com NTBo-A (3.5, 15 e 30/Kg de peso) dentro da superfície subplantar dos animais foram anestesiados 24 horas após com o intuito de isolar neurônio sensitivo ao nível do segmento lombar. O neurônio de amplo alcance foi identificado após sua resposta a estímulos inócuos e a estímulos dolorosos. Uma injeção de 50µl de formalina 5% foi administrada sobre a pata dos animais. A injeção de formalina produzia uma resposta bifásica compatível com a resposta bifásica do teste da formalina (observação clínica). Nos animais pré-tratados com formalina a fase inflamatória foi inibida (e fase neurogênica sem efeito). A inibição é dose-dependente, sendo que a dose mais efetiva foi de 15 e 30 U/Kg de peso [Aoki KR 2005].

5.1.3- Efeito antinociceptivo profilático da NTBo-A “correlação clínico laboratorial”:

Os resultados mostraram que a NTBo-A foi capaz de inibir o comportamento de dor durante a fase inflamatória no subgrupo 8 dias após o primeiro tratamento. Em todos os outros momentos o efeito antinociceptivo não ocorreu. A fase neurogênica não foi afetada em nenhum momento e em nenhum subgrupo.

Estes resultados podem ser justificados pela capacidade que a NTBo-A apresenta em bloquear transitoriamente a expressão vesicular intracelular dos receptores vanilóides (TRVP1 e TRPA1) e da liberação dos neurotransmissores (SP, NKA, CGRP e Glutamato) tendo seu pico de efeito após sete dias [Caterina e Julius 2001]. O aumento da expressão dos receptores vanilóides dentro dos nociceptores periféricos é importante para manutenção dos estados de hiperalgesia inflamatória (Fase inflamatória do teste da formalina) após estímulos neurogênicos [Ji e col.,2002; Amaya e col.,2003]. A inibição destes receptores não permitirá a expressão da nocicepção mesmo que exista uma agressão neural. O efeito da NTBo-A é mais observado como um agente capaz de inibir ou prevenir a sensibilização periférica em modelos

de dor inflamatória com hipersensibilização (como é o caso do teste da formalina 2,5%) [Wang e Redgrave 1997].

Os nossos resultados mostraram que o comportamento de dor neurogênica não foi afetado, como descrito na literatura, mas a sensibilização periférica e central decorrente deste estímulo neurogênico foi influenciada no subgrupo 8 dias, período máximo da ação destas drogas sobre os receptores vanilóides e outros neurotransmissores [Amaya e col. 2003, Ji e col 2002]. Os resultados não se replicaram após o segundo bloqueio sugerindo que bloqueios repetidos não os potencializam. O fator de desequilíbrio na maturidade dos animais deve ser relevante nas respostas motoras. A falta de resposta do segundo bloqueio pode também representar uma característica fisiológica do organismo após a primeira exposição à droga.

Os resultados observados na literatura e os encontrados em nosso estudo mostram que o efeito profilático antinociceptivo da NTBo-A apresenta efeito temporário o que dificulta muito sua indicação terapêutica.

5.2 – Efeito Analgésico da NTBo-A

5.2.1- Efeito antinociceptivo analgésico da NTBO-A “evidências clínicas”:

Estudos investigando o efeito analgésico direto da NTBo-A em seres humanos portadores de neuropatia focal e alodinia mecânica secundária a neuralgia pós-herpética, trauma ou pós-cirúrgico mostraram que a administração da NTBo-A intra-dermica produzia um alívio dos sintomas de duas até 14 semanas após sua aplicação. As doses utilizadas variaram de 20 até 190 unidades. Os resultados mostraram uma redução da dor, da área de alodinia e também dos limiares de percepção ao frio [Ranoux e col., 2008]. O estudo mostrou que os pacientes que preservaram a sensibilidade térmica antes do tratamento com NTBo-A apresentavam uma melhor resposta terapêutica possivelmente por que o efeito analgésico esta relacionada com os receptores TRPV1 [Morenilla-Palao e col., 2004].

Pacientes portadores de polineuropatia diabética (com eletroneuromiografia alterada) tratados com NTBo-A intradérmicas apresentaram melhora clínica após 4,8 e 12 semanas [Yuan e col., 2009].

Pacientes com migrânea crônica foram avaliados em um estudo multicêntrico (somente Estados Unidos), fase 3 denominado Preempt. Foram submetidos a múltiplos tratamentos (tratamentos a cada 12 semanas) utilizando NTBo-A em estudo duplo-cego placebo controlado utilizando 155 à 195 unidades de NTBo-A. O tratamento mostrou-se ser efetivo 24 semanas após o tratamento com redução do número de crises de cefaléia e com redução dos escores no Teste do Impacto da Cefaléia (HIT-6) e uma melhor qualidade de vida (MQoL). O estudo finalmente mostra que repetidos tratamentos mostrou ser seguro e bem tolerado [Aurora e col 2009]. No estudo Preempt 2, pacientes com migrânea crônica foram avaliados em um estudo multicêntrico (66 centros do Estados Unidos e da Europa), durante a fase 3, foram submetidos a múltiplos tratamentos (tratamentos a cada 12 semanas) utilizando NTBo-A em estudo duplo-cego placebo controlado utilizando 155 à 195 unidades de NTBo-A. Observou-se uma redução na freqüência da cefaléia, na intensidade e na duração quando comparado com o grupo solução salina. A NTBo-A é efetiva no tratamento reduzindo o número de crises e aumentando igualmente a HIT-6 e a qualidade de vida dos pacientes submetidos ao tratamento [Dodick e col., 2009]. A utilização da NTBo-A sobre as formas crônicas de migrânea mostraram resultados positivos no controle da dor [Farinelli e col. 2006, Freitag 2007]. A utilização da NTBo-A sobre síndromes dolorosas com efeito nociceptivo crônico, como nas neuropatias periféricas e neuralgia pós-herpética mostraram também efeito antinociceptivo transitório [Ranoux e col. 2008, Huete e Bermejo 2008].

A administração subcutânea de NTBo-A (média de 22.5 unidades) em pacientes submetidos a aplicação de capsaicina intradérmica sobre o território do trigêmeo (antes do tratamento com NTBo-A, um, três e sete dias após o tratamento com NTBo-A) em um estudo duplo-cego placebo controlado demonstrou profunda alterações clínicas quando comparados com o grupo controle (tratamento com solução salina) [Gazerani e col., 2008]. A NTBo-A foi capaz de reduzir a neuralgia trigeminal induzida pela capsaicina além de reduzir o fluxo sanguíneo e a temperatura da pele. Estes efeitos são máximos três e sete dias após o tratamento. A NTBo-A aumenta os limiares de percepção térmica e não altera os limiares de percepção aos estímulos de

pressão ou elétricos. Os achados sugerem uma influência sobre as fibras do tipo-C e principalmente sobre os receptores TRPV1.

Nós recentemente publicamos o efeito terapêutico analgésico da NTBo-A sobre pacientes portadores de cefaléia primária em punhaladas. De fisiopatologia ainda desconhecida a hipersensibilização trigeminal parece ser o substrato das dores nesta cefaléia. Os pacientes foram submetidos ao tratamento com NTBo-A 12 unidades intra-dérmica em diferentes pontos conforme a localização da dor. A melhora clínica foi observada sete dias após o tratamento e manteve-se por até 60 dias [Piovesan e col. 2010].

Na neuralgia do trigêmeo mostramos em um estudo aberto que pacientes refratários a tratamentos farmacológicos e cirúrgicos, quando submetidos ao tratamento com NTBo-A mostraram controle dos sintomas dolorosos dentro dos primeiros dias. A resposta clínica foi satisfatória na primeira semana e teve uma duração média de 60 dias [Piovesan e col., 2005]. Outros estudos também confirmaram que a NTBo-A possui um efeito terapêutico sobre a neuropatia trigeminal. Bloqueio com NTBo-A 20-50 unidades sobre o território do nervo trigêmeo produz alívio dos sintomas dolorosos nos primeiro dias após o bloqueio e mantém a resposta clínica por até 60 dias [Zúñiga e col., 2008].

5.2.2- Efeito antinociceptivo analgésico da NTBo-A “evidências pré-clínicas”:

Estudos avaliando a secreção vesicular do gânglio do trigêmeo (FM4-64) e alodinia tátil após a constrição do nervo infra-orbital mostraram que os animais submetidos ao tratamento com NTBo-A intradérmica reduziram a produção do FM4-64 e a área de alodinia mecânica 11 dias após o tratamento [Kitamura e col., 2009]. O mesmo estudo demonstrou que a secreção vesicular do FM4-64 dos neurônios do gânglio do trigêmeo começa a ser alterada cerca de 3 horas após seu tratamento (tempo necessário para a incubação da toxina botulínica) – a NTBo-A é internalizada no neurônio por uma vesícula endocítica e translocada até atuar sobre o SNAP-25. A inibição que se inicia três horas após atinge sua máxima efetividade 24 horas após para a substância P [Welch e col., 2000] e CGRP [Meng e col 2007].

Neurônios isolados do gânglio do trigêmeo e previamente tratados com NTBo-A foram expostos a capsaicina em um estudo cego placebo controlado (previamente tratados com solução salina isotônica). As células pré-tratadas com NTBo-A não expressaram CGRP quando comparadas com o grupo controle que apresentou uma elevada expressão do mesmo neurotransmissor. O estudo mostra que a NTBo-A é capaz de inibir a expressão do CGRP tendo um espaço promissor no tratamento das síndromes dolorosas crônicas [Meng e col., 2009].

Animais submetidos a constrição do nervo L5-L6 (neuropatia lombar) e pré-tratados com NTBo-A (10, 20, 30 e 40 U/Kg de peso) produziram uma redução da alodinia mecânica e ao frio nas dosagens de 10 e 20U/Kg. As dosagens de 30 e 40U/Kg apresentaram importante efeito motor não sendo possível avaliação clínica dos animais [Park e col., 2006].

5.2.3 - Efeito antinociceptivo analgésico da NTBo-A “correlação clínico laboratorial”:

Os nossos resultados mostraram que os animais submetidos à constrição do nervo infra-orbital apresentaram hipernocicepção seis dias após a cirurgia. Os animais que foram tratados com NTBo-A reverteram completamente este estado de hipernocicepção já na primeira avaliação (6 horas) e mantiveram este efeito nas avaliações de 24, 48 e 72 horas após o tratamento. A hipernocicepção dos animais submetidos à constrição do nervo (amarra do nervo) e tratados com NTBo-A retornaram após 96 horas de seus tratamento, demonstrando que o efeito antinociceptivo ocorre até 72 horas após a sua aplicação.

Os nossos achados corroboram com uma correlação clínico-laboratorial da literatura. A NTBo-A possui um efeito analgésico que em modelos experimentais inicia-se 3 horas após sua exposição sobre células neurais, tendo seu pico de ação dentro de 24 horas. O efeito analgésico inicial parece estar relacionado com o bloqueio do tráfego vesicular e exposição vesicular sobre a membrana celular de vesículas contendo SP, CGRP, glutamato e principalmente receptores vanilóides (TRPA1 e TRPV1). Nossos resultados

também confirmam que a NTBo-A é um potente analgésico com efeito transitório.

5.3 EFEITO MOTOR DA NTBo-A NA FASE 1.

5.3.1 - Teste do Campo Aberto.

A avaliação do efeito da NTBo-A sobre a atividade motora dos animais é fundamental uma vez que a análise do teste de formalina depende da integridade motora do animal. Na literatura não encontramos nenhum estudo mostrando o efeito da NTBo-A sobre os parâmetros avaliados durante o teste do campo aberto.

A latência para o início dos movimentos não é um marcador para atividade motora, mas avalia o grau de ansiedade que os animais apresentam quando expostos ao campo aberto. Os nossos resultados, mesmo que limítrofes, mostraram que a latência do grupo NTBo-A subgrupo 24 horas após o primeiro bloqueio foram estatisticamente maiores que o grupo controle SSI sugerindo um maior grau de ansiedade neste subgrupo. O único relato da utilização da NTBo-A em pacientes com algum distúrbio de ansiedade é na hiper-hidrose cutânea [Connor e col.,2006]. Evidências sugerem que o aumento dos níveis de acetilcolina intracerebrais (hipocampais) reduz o grau de ansiedade e vice-versa [Degroot e Treit 2002]. A NTBo-A também pode reduzir os níveis circulantes de acetilcolina ao nível da junção neuromuscular, promovendo um maior grau de ansiedade [Simpson 1981]. Após este dado pouco consistente nossos animais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevada (teste específico para análise do grau de ansiedade) a fim de reavaliar esta eventual tendência da NTBo-A em induzir ansiedade.

Pacientes com distúrbios de hiperatividade muscular, como é o caso da distônia cervical, frequentemente relatam distúrbios generalizados de ansiedade. Sua relação de agravo ou melhora após a utilização da NTBo-A não foi investigada até o presente momento [Swope D e Barbano R., 2008]. Estudos recentes que avaliaram a qualidade de vida de pacientes portadores de distonia cervical mostraram que após o tratamento com NTBo-A as escalas de depressão e ansiedade reduziram em quase três vezes os valores de referência prévios ao tratamento com a NTBo-A. Entretanto estes resultados estiveram diretamente relacionados com a melhora dos movimentos distônicos

[Skogseid e col.,2007]. Na literatura não encontramos trabalhos que tenham mensurado a ansiedade em outras doenças ou situações que utilizaram a NTBo-A.

5.4 – VARIAÇÃO DOS RESULTADOS DO CAMPO ABERTO NO PRIMEIRO E SEGUNDO MOMENTOS DO ESTUDO DURANTE A FASE 1.

O estudo mostrou que a latência dos animais foi homogênea em ambos os grupos e subgrupos durante a evolução do estudo. Entretanto o número de casas andadas no campo aberto, o número de levantamentos e o tempo de imobilidade não mostrou ser homogêneo. Observamos que na grande maioria dos subgrupos e em ambos os grupos estes quesitos sofreram alterações significativas quando comparados com o período após o primeiro tratamento, com o período após o segundo tratamento. Como estas alterações ocorreram no grupo NTBo-A e SSI de forma relativamente homogênea sugere que estas alterações não tiveram relação com a droga estudada (NTBo-A). Concluímos que os animais após o primeiro tratamento e após o segundo tratamento do ponto de vista da atividade motora não podem ser totalmente considerados homogêneos. Se os grupos não foram totalmente homogêneos do ponto de vista motor, entre os dois períodos, acredita-se que a influência sobre o teste da formalina também ocorra.

Os animais estudados (*Rattus norvegicus*) geralmente nascem com um peso de 5 à 6 gramas, sendo que o peso do macho adulto oscila entre 300 até 800 gramas, sua longevidade atinge 3 à 4 anos. O peso médio dos animais que foram alocados nas primeiras etapas da fase 1 do estudo não configuram os mesmos como animais adultos. Nas etapas finais da fase 1 o peso dos animais já pode ser classificado como de animais adultos. A ausência de homogeneidade nos resultados entre os grupos e subgrupos na etapa após o primeiro tratamento e após o segundo tratamento pode ser, entre outros fatores, justificado pelo fato de estarmos trabalhando com animais em períodos evolutivos diferentes, um grupo no período pré-adulto e outro no período adulto (uma vez que apresentam pesos diferentes). Na literatura não encontramos descrições da influência da idade dos animais nos resultados do campo aberto. Entretanto sabemos que esta transição esta relacionada com alterações

hormonais que direta ou indiretamente podem alterar o comportamento motor e de dor [Site do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal: www.cobea.org.br].

5.5- TESTES DE AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL A ANSIEDADE.

Estas avaliações foram motivadas porque durante os testes do campo aberto a latência para o início dos movimentos foi maior no grupo NTBo-A. O teste do labirinto em cruz elevada foi aplicado em associação com o teste do campo claro versus o campo escuro para determinar um efeito ansiolítico/ansiogênico da NTBo-A.

5.5.1 – Teste do Labirinto em Cruz Elevada.

O subgrupo 24 horas do grupo SSI apresentou uma maior porcentagem de permanência no braço aberto do que o grupo NTBo-A. O subgrupo 29 dias do grupo NTBo-A apresentou uma maior porcentagem de permanência no braço aberto do que o grupo SSI. Esses achados provavelmente ocorreram porque a NTBo-A é um potente inibidor da expressão dos receptores vanilóides (TRPV1 e TRPA1) e dos neurotransmissores (acetilcolina, SP, NKA, CGRP e glutamato). O bloqueio transitório de receptores vanilóides (TRPV1) ao nível do córtex pré-frontal inibe o comportamento de ansiedade (aumenta o tempo de exposição e exploração do braço aberto no teste da cruz elevada) sugerindo que o bloqueio destes receptores produz um efeito ansiolítico [Aguiar e col. 2009]. Os nossos resultados são divergentes entre si uma vez que o subgrupo 24 horas apresenta um maior grau de ansiedade para NTBo-A enquanto o subgrupo 29 dias uma maior ansiedade para o grupo SSI. A porcentagem média de tempo de permanência no campo neutro é maior no grupo NTBo-A do que no grupo SSI para o subgrupo 24 horas sugerindo também maior grau de ansiedade deste subgrupo. Estes dados divergentes da NTBo-A podem estar relacionadas com o tempo necessário para esta droga agir ao nível cerebral produzindo efeitos ansiolíticos e ansiogênicos. Agregados aos achados de campo aberto que sugerem uma maior grau de ansiedade no subgrupo 24 horas do grupo NTBo-A podemos inferir que este subgrupo do grupo NTBo-A apresenta maiores graus de ansiedade do que o grupo SSI.

Outro fator que pode estar relacionado é o efeito das drogas aplicadas sobre o segundo ramo do trigêmeo que afetará necessariamente o comportamento fisiológico das vibrissas. A tigmotaxia é uma ataxia do animal gerada pela alteração das vibrissas e que pode estar envolvida nestas respostas durante o teste do labirinto em cruz elevada.

5.6 - EFEITOS COLATERAIS DA NTBo-A.

A paralisia motora apresentada pelo animal do grupo NTBo-A subgrupo 29 dias após o segundo bloqueio ocorreu sobre os músculos clavotrapézio, acromiotrapézio e esternomastoideo. Paralisia motora é o principal efeito clínico desejável da toxina botulínica uma vez que ela inibe a liberação da acetilcolina na placa motora [Aoki 2002]. Estudos recentes utilizando-se de estimulação elétrica sobre os músculos submetidos ao tratamento com NTBo-A evidenciam uma redução dos potenciais de ação motora que iniciam três dias após o bloqueio e alcançam seu pico máximo de inibição em 7 à 14 dias [Rha DW e col. 2008]. O animal do nosso estudo apresentava desvio cefálico para a direita 20 dias após o segundo bloqueio (lateralizando a cabeça para a direita).

O animal estudado não recebeu NTBo-A sobre os músculos afetados descritos anteriormente, ou tampouco sobre qualquer terminação nervosa oriunda de C2-C5 ou ramos do nervo espinal acessório. Entretanto os efeitos da NTBoA (paralisia muscular) ocorreram ipsilaterais ao lado do bloqueio sobre V2. Estes achados podem ser justificados pela presença de mecanismos de convergência trigeminocervical sensitivo-motora.

A convergência trigeminocervical tem sido descrita há vários anos [Kerr 1961]; trata-se de uma confluência de informações nociceptivas trigeminais e cervicais que terminam sobre uma mesma população celular ao nível do núcleo caudal do trigêmeo [Goadsby e Hoskin 1997].

A presença deste efeito colateral motor, mesmo que de forma isolado sugere a presença de um mecanismo de convergência trigeminocervical do tipo sensitivo-motor.

6. CONCLUSÕES

6.1 - A NTBo-A apresenta efeito antinociceptivo profilático sobre um modelo de dor orofacial aguda induzida pela formalina 2.5%.

- O efeito da NTBo-A inicia-se a partir de 8 dias após o primeiro tratamento, não prolongando-se a partir deste período ou durante o segundo tratamento.
- O efeito antinociceptivo ocorre exclusivamente sobre a fase inflamatória.

6.2 – A NTBo-A apresenta efeito antinociceptivo analgésico sobre um modelo de dor orofacial crônica induzida pela constrição do nervo infra-orbital. Após seis horas de tratamento a NTBo-A bloqueia a hipernocicepção mantendo-se por mais 72 horas.

7. REFERÊNCIAS

- 01- Abbadie C, Taylor BK, Peterson MA, Basbaum AI. Differential contribution of the two phases of the formalin test to the pattern of c-fos expression in the rat spinal cord: studies with remifentanil and lidocaine. *Pain* 1997;69:101-110.
- 02- Adams, CBT. Microvascular compression: an alternative view and hypothesis. *J. Neurosurg* 1989;70:1-12.
- 03- Aguiar DC, Terzian AL, Guimarães FS, Moreira FA. Anxiolytic-like effects induced by blockade of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels in the medial prefrontal cortex of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2009;205:217-225.
- 04- Akopian AN, Sivilotti L, Wood JN. A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature* 1996;379:257-262.
- 05- Allam N, Brasil-Neto JP, Brown G, Tomaz C. Injections of botulinum toxin type-a produce pain alleviation in intractable trigeminal neuralgia. *Clin J Pain* 2005;21:182-184.
- 06- Allen AL, Cortright DN, McCarson KE. Formalin or adjuvant induced peripheral inflammation increases neurokinin-1 receptor gene expression in the mouse. *Brain Research* 2003;961:147-152.
- 07- Amaya F, Oh-hashi K, Naruse Y, Iijima N, Ueda M, et.al. Local inflammation increases vanilloid receptor 1 expression within distinct subgroups of DRG neurons. *Brain Res* 2003;963:190-196.
- 08- Anand U, Otto WR, Facer P, Zebda N, Selmer I, et al. TRPA1 receptor localization in the human peripheral nervous system and functional studies in cultured human and rat sensory neurons. *Neurosci Lett* 2008;438:221-227.
- 09- Anderson LC, Vakoula A, Veinote R. Inflammatory hypersensitivity in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Arch. Oral Biol* 2003;48:161-169.
- 10- Aoki KR. Basic aspects of botulinum toxin: physiology and pharmacology of therapeutic botulinum neurotoxins. *Curr Probl Dermatol* 2002;30:107-116.
- 11- Aoki KR. Evidence for antinociceptive activity of botulinum toxin type A in pain management. *Headache* 2003;43(Suppl1):S9-S15.
- 12- Aoki KR. Review of a proposed mechanism for the antinociceptive action of botulinum toxin type A. *NeuroToxicology* 2005;26:785-793.

- 13- Aurora SK, Gawel M, Brandes JL, Pokta S, Vanderburgh AM, BOTOX North American Episodic Migraine Study Group. *Headache* 2007;47:489-499.
- 14- Aurora SK, Winner P, Freeman MC, SPierings EL, Heiring J, et al. Botulinum neurotoxin type A for treatment of chronic migraine: pooled analyses of the PREEMPT clinical program 32-week open-label phase. *Cephalalgia* 2009;29(Suppl-1):7-8.
- 15- Baba H, Kohno T, Okamoto M, Goldstein PA, Shimoji K, et al. Muscarinic facilitation of GABA release in substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn. *Journal of Physiology* 1998;508:83-93.
- 16- Baber RP, Phelps PE, Houser CR, Grawford GD, Salvaterra PM, et al. The morphology and distribution of neurons containing choline acetyltransferase in the adult rat spinal cord: an immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 1984;229:329-346.
- 17- Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, et al. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 2004;41:849-857.
- 18- Bang S, Kim KY, Yoo S, Kim YG, Hwang SW. Transient receptor potential A1 mediates acetaldehyde-evoked pain sensation. *Eur J Neurosci* 2007;26:2516-2523.
- 19- Barker FG 2nd, Jannetta PJ, Bissonette DJ, Larkis MV, Jho HD. The long-term outcome of microvascular decompression for trigeminal neuralgia. *N Engl J Med* 1996;334:1077-1083.
- 20- Barrientos N, Chana P. Botulinum toxin type A in prophylactic treatment of migraine headaches: A preliminary study. *J Headache Pain* 2003;4:146-151.
- 21- Barthó P, Freund TF, Acsády L. Selective GABAergic innervations of thalamic nuclei from zona incerta. *Eur J Neurosci* 2002;16:999-1014.
- 22- Bausbam AI, Jessell TM. In: Principles of neuroscience. Editores Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Mc Graw-Hill, New York, 2000:472-491.
- 23- Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, et al. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 2006;124:1269-1282.

- 24- Bennet DL, Franekh JS, Priestley JV, McMahon SB. NGF but not NT-3 or BDNF prevents the A β -fiber sprouting into lamina II of the spinal cord that occurs following axotomy. *Molecular and Cellular Neuroscience* 1996;8:211-220.
- 25- Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988;33:87-107.
- 26- Benoist JM, Gautron M, Guilbaud G. Experimental model of trigeminal pain in the rat by constriction of one infra-orbital nerve: changes in neuronal activities in the somatosensory cortices corresponding to the infra-orbital nerve. *Exp Brain Res* 1999;126:383-398.
- 27- Benoliel R, Eliav E, Tal M. No sympathetic nerve sprouting in rat trigeminal ganglion following painful and non-painful infraorbital nerve neuropathy. *Neurosci Lett* 2001;297:151-154.
- 28- Bergouignan, M. Anti-Epileptic Drugs in the Treatment of Essential Trigeminal Neuralgia. *Presse Med* 1970;78:1832-1834.
- 29- Bessac BF, Sivula M, von Hehn CA, Escalera J, Cohn L, et al. TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. *J Clin Invest* 2008;118:1899-1910.
- 30- Beydoun A. Safety and efficacy of oxcarbazepine: results of randomized, double-blind trials. *Pharmacotherapy* 2000;20:152-158.
- 31- Bigalke H, Heller I, Bizzini B, Habermann E. Tetanus toxin and botulinum A toxin inhibit release and uptake of various transmitters, as studied with particulate preparations from rat brain and spinal cord. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1981;316:244-251.
- 32- Biggio G, Concas A, Corda MG, Giorgi O, Sanna E, et al. GABAergic and dopaminergic transmission in the rat cerebral cortex: effect of stress, anxiolytic and anxiogenic drugs. *Pharmacol Ther* 1990;48:121-142.
- 33- Biggs JE, Yates JM, Loescher AR, Clayton NM, Boissonade FM, et al. Changes in vanilloid receptor 1 (TRPV1) expression following lingual nerve injury. *Eur J Pain* 2007;11:192-201.
- 34- Bittar GT, Graff-Radford SB. The effects of streptomycin/lidocaine block on trigeminal neuralgia: a double blind crossover placebo controlled study. *Headache* 1993;33:155-160.

- 35- Blair NT, Bean BP. Roles of tetrodotoxin (TTX)-sensitive Na⁺ current, TTX-resistant Na⁺ current, and Ca²⁺ current in the action potentials of nociceptive sensory neurons. *J Neurosci* 2002;22:10277-10290.
- 36- Blumenfeld AM, Schim JD, Chippendale TJ. Botulinum toxin type A and divalproex sodium for prophylactic treatment of episodic or chronic migraine. *Headache* 2008;48:210-220.
- 37- Bohotin C, Scholsem M, Multon S. Vagus nerve stimulation in awake rats reduces formalin-induced nociceptive behavior and fos-immunoreactivity in trigeminal nucleus caudalis. *Pain* 2003;101:3-12.
- 38- Bongenhielm U, Boissonade FM, Westermark A, Robinson PP, Fried K. Sympathetic nerve sprouting fails to occur in the trigeminal ganglion after peripheral nerve injury in the rat. *Pain* 1999;82:283-288.
- 39- Borodic GE, Acquadro MA. The use of botulinum toxin for the treatment of chronic facial pain. *J Pain* 2002;3:21-27.
- 40- Boscá-Blasco ME, Burguera – Hernandez JA, Roig – Morata S, Martínez-Torres I. Painful tic convulsif and botulinum toxin. *Ver Neurol* 2006;42:729-732.
- 41- Bossut DF, Whitsel EA, Maixner W. A parametric analysis of the effects of cardiopulmonary vagal electrostimulation on the digastrics reflex in cats. *Brain Res* 1992;579:253-260.
- 42- Bossut DF, Maixner W. Effects of cardiac vagal afferent electrostimulation on the responses of trigeminal and trigeminothalamic neurons to noxious orofacial stimulation. *Pain* 1996;65:101-109.
- 43- Bouaziz H, tong C, Eisenach JC. Post-operative analgesia from intrathecal neostigmine in sheep. *Anesth Analg* 1995;80:1140-1144.
- 44- Bowsher D. Dynamic mechanical allodynia in neuropathic pain. *Pain* 2005;116:164-165
- 45- Breese NM, George AC, Pauers LE, Stucky CL. Peripheral inflammation selectively increases TRPV1 function in IB4-positive sensory neurons from adult mouse. *Pain* 2005;115:37-49.
- 46- Brin MF. Botulinum toxin: chemistry, pharmacology, toxicity, and immunology. *Muscle Nerve Suppl* 1997;6:S146-S148.

- 47- Brock JA, McLachlan EM, Belmonte C. Tetrodotoxin-resistant impulses in single nociceptor nerve terminals in guinea-pig cornea. *J Physiol (Lond)* 1998;512:211-217.
- 48- Brodal A. *Neurological anatomy in relation to clinical medicine*, 3 ed., Oxford University Press, New York, 1981.
- 49- Broggi G, Ferroli P, Franzini A, Servello D, Dones I. Microvascular decompression for trigeminal neuralgia: comments on a series of 250 cases, including 10 patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;68:59-64.
- 50- Burchiel KJ. Carbamazepine inhibits spontaneous activity in experimental neuromas. *Exp Neurol* 1988;102:249-253.
- 51- Burgen A, Dickens F, Zatman L. The action of botulinum toxin on the neuromuscular junction. *J Physiol* 1949;109:10-24.
- 52- Burke GS. The occurrence of bacillus botulinus in nature. *J Bacteriol* 1919;4:541-553.
- 53- Cady R, Schreiber C. Botulinum toxin type A as migraine preventive treatment in patients previously failing oral prophylactic treatment due to compliance issues. *Headache* 2008;48:900-913.
- 54- Cai X. A new trip to sense pain: TRPA1 channel as a target for novel analgesics. *Expert Rev Neurother* 2008;8:1675-1681.
- 55- Calcutt NA, Stiller C, Gustafsson H, Malmberg AB. Elevated substance-P-like immunoreactivity levels in spinal dialysates during the formalin test in normal and diabetic rats. *Brain Res* 2000;856:20-27.
- 56- Calvin WH, Loeser JD, Howe JF. A neurophysiological theory for the pain mechanism of tic douloureux. *Pain* 1977;3:147-154.
- 57- Cameron AA, Leah JD, Snow PJ. The electrophysiological and morphological characteristics of feline dorsal root ganglion cells. *Brain Res* 1986;362:1-6.
- 58- Cameron AA, Clier KD, Dougherty PM, Garrison CJ, Willis WD, Carlton SM. Time course of degenerative and regenerative changes in the dorsal horn in a rat model of peripheral neuropathy. *The Journal of Comparative Neurology*, 1997;379:428-442.

- 59- Campbell FG, Graham JG, Zikha KJ. Clinical trial of carbamazepine (tegetol) in trigeminal neuralgia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1966;29:265-267.
- 60- Cao YQ, Mantyh PW, Carlson EJ, Gillespie AM, Epstein CJ, et al. Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature* 1998;392:390-394.
- 61- Carasso RL, Yehuda S, Streifler M. Clomipramine and amitriptyline in the treatment of severe pain. *Int J Neurosci* 1979;9:191-194.
- 62- Carlton SM, Coggeshall RE. Inflammation-induced changes in peripheral glutamate receptor populations. *Brain Res* 1999;820:63-70.
- 63-Carrazana E, Mikoshiba I. Rationale and evidence for the use of oxcarbazepine in neuropathic pain. *J Pain Symptom Manage* 2003; 25:S31-S35.
- 64-Catterall WA. Common modes of drug action on Na⁺ channels: local anaesthetics, antiarrhythmics and anticonvulsants. *Trends Pharmacol Sci* 1987;8:57-65.
- 65- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997;389:816-824.
- 66- Caterina MJ, Julius D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci* 2001;24:487-517.
- 67- Chapman V, Haley JE, Dickenson AH. Electrophysiologic analysis of preemptive effects of spinal opioids on *N*-methyl-D-aspartate receptor-mediated events. *Anesthesiology* 1994;81:1429-1435.
- 68- Chen Y, Devor M. Ectopic mechanosensitivity in injured sensory axons arises from the site of spontaneous electrogenesis. *Eur J Pain* 1998;2:165-178.
- 69- Chery N, De Koninck Y. GABAB receptors are the first target of released GABA at lamina I inhibitory synapses in the adult rat spinal cord. *Journal of Neurophysiology* 2000;84:1006-1011.
- 70- Cheshire WP Jr. Defining the role for gabapentin in the treatment of trigeminal neuralgia: a retrospective study. *J Pain* 2002;3:137-142.
- 71- Chiang CY, Dostrovsky JO, Sessle BJ. Periaqueductal gray matter and nucleus raphe magnus involvement in anterior pretectal nucleus-induced inhibition of jaw-opening reflex in rats. *Brain Res* 1991;544:71-78.

- 72- Chichorro JG, Zampronio AR, Souza GEP, Rae GA. Orofacial cold hyperalgesia due to infraorbital nerve constriction injury in rats: Reversal by endothelin receptor antagonists but not non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Pain* 2006;123:64-74.
- 73- Choi WH, Song CW, Kim YB. Skeletal muscle atrophy induced by intramuscular repeated dose of botulinum toxin type A in rats. *Drug Chem Toxicol* 2007;30:217-227.
- 74- Christensen D, Idanpaan-Heikkila JJ, Guilbaud G, Kayser V. The antinociceptive effect of combined systemic administration of morphine and the glycine/NMDA receptor antagonist, (+)-HA966 in a rat model of peripheral neuropathy. *Br J Pharmacol* 1998;125:1641-1650.
- 75- Christensen D, Gautron M, Guilbaud G, Kayser V. Effect of gabapentin and lamotrigine on mechanical allodynia-like behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Pain* 2001; 93:147-153.
- 76- Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AL, Chao MV, Julius D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature* 2001;411: 957-962.
- 77- Chuang YC, Yohimura N, Huang CC, Chiang PH, Chancellor MB. Intravesical botulinum toxin an administration produces analgesia against acetic acid induced bladder pain responses in rats. *J Urol* 2004;172:1529-1532.
- 78- Clapham DE, Montell C, Schultz G, Julius D. International Union of Pharmacology. International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of: voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev* 2003;55:591-596.
- 79- Clavelou P, Dallel R, Orliaguet T, Woda A, Raboisson P. The orofacial formalin test in rats: effects of different formalin concentrations. *Pain* 1995;62:295-301.
- 80- Clavelou P, Pajot J, Dallel R, Raboisson P. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. *Neurosci Lett* 1989;103:349-353.
- 81- Coderre TJ, Vaccarino AL, Melzack R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res* 1990;535:155-158.

- 82-Coderre TJ, Katz J, Vaccarino AL, Melzack R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain* 1993;52:259-285.
- 83-Coggeshall RE, Carlton SM. Ultrastructural analysis of NMDA, AMPA, and Kainate receptors on unmyelinated and myelinated axons in the periphery. *J Comp Neurol* 1998;391:78-86.
- 84-Colton T. Inference on Means. In: Colton T, editor. *Statistics in medicine*. Chapter 4. Boston: Little, Brown and Company; 1974. p.99-150.
- 85-Connor KM, Cook JL, Davidson JR. Botulinum toxin treatment of social anxiety disorder with hyperhidrosis: a placebo-controlled double-blind trial. *J Clin Psychiatry* 2006;67:30-36.
- 86-Costigan M, Befort K, Karchewski L, Griffin RS, D'Urso D, et al. Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated genes in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury. *BioMed Central Neuroscience*, v. 3, p. 16, 2002.
- 87-Crawley JN, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behaviour for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmac Biochem Behav* 1980;13:167-170.
- 88-Crawley JN, Gerfen CH, Rogawski MA, Sibley DR, Skolnick P, et al. Animal tests of anxiety. *Current Protocols in Neuroscience* 2001;Suppl-10:1-19.
- 89-Cruccu G, Gronseth G, Alksne J, Argoff C, Brainin M, et al. AAN-EFNS guidelines on trigeminal neuralgia management. *Eur Journal of Neurology* 2008;15:1013-1028.
- 90-Cui M, Khanijou S, Rubino J, Aoki KR. Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduces formalin-induced pain. *Pain* 2004;107:125-133.
- 91-Cui M, Li Z, You S, Khanijou S, Aoki KR. Mechanism of the antinociceptive effect of subcutaneous BOTOX: inhibition of peripheral and central nociceptive processing. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2002;365:365.
- 92-Cummins TR, Waxman SG. Downregulation of tetrodotoxin-resistant sodium currents and upregulation of a rapidly repriming tetrodotoxin-sensitive sodium current in small spinal sensory neurons after nerve injury. *J Neurosci* 1997;17:3503-3514.

- 93- Cunha TM, Verri WA Jr, Vivancos GG, Moreira IF, Reis S, et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz J Med Biol Res* 2004;37:401-407.
- 94- Curtis JC, Kleinfeld D. Seeing what the mouse sees with its vibrissae: a matter of behavioral state. *Neuron* 2006;50:524-526.
- 95- Damann N, Rothermel M, Klupp BG, Mettenleiter TC, Hatt H, et. al. Chemosensory properties of murine nasal and cutaneous trigeminal neurons identified by viral tracing. *BMC Neurosci* 2006;8:46.
- 96- Darian-Smith I, Isbister J, Mok H. Somatic sensory cortical projection areas excited and tactile stimulation of the cat: a triple representation. *J Physiol* 1966;182:671-689.
- 97- Darian Smith I. Neural mechanisms of facial sensation. *Int Rev Neurobiol* 1966;9:301-395.
- 98- Davis KD, Pope GE. Noxious cold evokes multiple sensations with distinct time courses. *Pain* 2002;98:179-185.
- 99- Degroot A, Treit D. Dorsal and ventral hippocampal cholinergic systems modulate anxiety in the plus-maze and shock-probe tests. *Brain Res* 2002;949:60-70.
- 100- Dekoninck Y, Ribeiro-da-Silva A, Henry JL, Cuello C. Spinal neurons exhibiting a specific nociceptive response receive abundant substance P-containing synaptic contacts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5073-5077.
- 101- Delzell JE Jr, Grelle AR. Trigeminal neuralgia. New treatment options for a well-known cause of facial pain. *Arch. Fam Med* 1999;8:264-268.
- 102- Deschenes M. Vibrissal afferents from trigeminus to cortices. *Scholarpedia* 2009;4:7454.
- 103- Desmeules JA, Kayser V, Weil-Fugazza J, Bertrand A, Guilbaud G. Influence of the sympathetic nervous system in the development of abnormal pain-related behaviours in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience* 1995;67:941-951.
- 104- Devor M. Neuropathic pain: what do we do with all these theories? *Acta Anaesthesiol Scand* 2001;45:1121-1127.

- 105- Devor M. Response of nerves to injury in relation to neuropathic pain. In: McMahon SL, Koltzenburg M (eds): Wall and Melzack's Textbook of pain, 5th ed. London, Churchill Livingstone, 2005:905-927.
- 106- Devor M. Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. *J Pain* 2006;7:S3-S12.
- 107- Dickenson AH, Sullivan AF. Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurones. *Neurosci Lett* 1987;83:207-211.
- 108- Dickenson AH, Matthews EA, Suzuki R. Neurobiology of neuropathic pain: mode of action of anticonvulsants. *Eur. J. Pain* 2002;6: 51-60.
- 109- Dickenson AH, Suzuki R. Opioids in neuropathic pain: clues from animal studies. *Eur J Pain* 2005;9:113-116.
- 110- Djouhri L, Leazard L, Lawson SN. Association of somatic action potential shape with sensory receptive properties in guinea-pig dorsal root ganglion neurons. *J Physiol* 1998;513:857-872.
- 111- Dodick DW, Mauskop A, Elkind AH, DeGryse R, Brin MF, et al. Botulinum toxin type A for the prophylaxis of chronic daily headache: Subgroup analysis of patients not receiving other prophylactic medications: A randomized double-blind, placebo controlled study. *Headache* 2005;45:315-324.
- 112- Dodick DW, Smith TR, Becker WJ, Gendolla A, Relja M, et al. Botulinum neurotoxin type A for treatment of chronic migraine: PREEMP 2 trial double-blind phase. *Cephalalgia* 2009;29(Suppl-1):7-8.
- 113- Dostrovsky JO. Role of thalamus in pain. *Prog Brain Res* 2000; 129:245-245.
- 114- Dubner R. Interaction of peripheral and central input in the main sensory trigeminal nucleus of the cat. *Exp Neurol* 1967;17:186-202.
- 115- Dubner R, Bennett GJ. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. *Annu Rev Neurosci* 1983;6:381-418.
- 116- Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977;4:161-174.

- 117- Dunant Y, Esquerda JE, Loctin F, Marsal J, Muller D. Botulinum toxin inhibits quantal acetylcholine release and energy metabolism in the Torpedo electric organ. *J Physiol* 1987;385:677-692.
- 118- Durham PL, Cady R, Cady R. Regulation of calcitonin gene-related peptide secretion from trigeminal nerve cells by botulinum toxin type A: implications for migraine therapy. *Headache* 2004;44:35-42.
- 119- Duus P. Tronco Cerebral. In: *Diagnóstico Topográfico em neurologia*. 4 edição, Editora Cultura Médica Ltda. Rio de Janeiro 1989. Capítulo 3: pag 64-142.
- 120- Edwards SB. The ascending and descending projections of the red nucleus in the cat: an experimental study using an autoradiographic tracing method. *Brain Research* 1972;48:45-63.
- 121- Eisenach JC, Gebhart GF. Intrathecal amitriptyline: anti-nociceptive interactions with intravenous morphine and intrathecal clonidine, neostigmine, and carbamylcholine in rats. *Anesthesiology* 1995;83:1036-1045.
- 122- Elkind AH, O'Carroll P, Blumenfeld A, DeGryse R, Dimitrova R; BoNTA-024-026-036 Study Group. A series of three sequential, randomized, controlled studies of repeated treatments with botulinum toxin type A for migraine prophylaxis. *J Pain* 2006;7:688-696.
- 123- Epstein JB, Marcoe JH. Topical application of capsaicin for treatment of oral neuropathic pain and trigeminal neuralgia. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol* 1994;77:135-140.
- 124- Farinelli I, Coloprisko G, De Filippis S, Martelletti P. Long-term benefits of botulinum toxin type A (BOTOX) in chronic daily headache: a five-year long experience. *J Headache Pain* 2006;7:407-412.
- 125- Felicio AC, Godeiro C de O Jr, Borges V, Silva SM, Ferraz HB. Bilateral hemifacial spasm and trigeminal neuralgia: a unique form of painful tic convulsif. *Mov Disord* 2007;22:285-286.
- 126- Fitzgerald M, Butcher T, Shortland P. Developmental changes in the laminar termination of A β fibre cutaneous sensory afferents in the rat spinal cord dorsal horn. *Journal of Comparative Neurology* 1994;348:2125-2133.

- 127- Flickinger JC, Pollock BE, Kondziolka D, Phuong LK, Foote RL, et al. Does increased nerve length within thre treatment volume improve trigeminal neuralgia radiosurgery? A prospective double-blind, randomized study. *Int J Radiation Oncol Biol Physics* 2001;51:449-454.
- 128- Freitag FG. Botulinum toxin type A in chronic migraine. *Expert Rev Neurother* 2007;7:463-470.
- 129- Freitag FG, Diamond S, Diamond M, Urban G. Botulinum Toxin Type A in the treatment of chronic migraine without medication overuse. *Headache* 2008;48:201-209.
- 130- Fromm GH, Terrence CF, Chatha AS. Baclofen in the treatment of trigeminal neuralgia: double-blind study and long-term follow-up. *Ann Neurol* 1984;15:240-244.
- 131- Fukuoka T, Kondo E, Dai Y, Hashimoto N, Noguchi K. Brainderived neurotrophic factor increases in the uninjured dorsal root ganglion neurons in selective spinal ligation nerve model. *Journal of Neuroscience* 2001;21:4891-4900.
- 132- Furuta T, Timofeeva E, Nakamura K, Okamoto-Furuta K, Togo M, et al. Inhibitory gating of vibrissal inputs in the brainstem. *J Neurosci* 2008;28:1789-1797.
- 133- Fusco BM, Alessandri M. Analgesic effect of capsaicin in idiopathic trigeminal neuralgia. *Anesth Analg* 1992;74:375-377.
- 134- Garcia-Compean D, Maldonado Garza H. Intragastric injection of botulinum toxin for the treatment of obesity. Where are we? *World J Gastroenterol* 2008;14:1805-1809.
- 135- Gazerani P, Pedersen NS, Staahl C, Drewes AM, Arendt-Nielsen L. Subcutaneous botulinum toxin type A reduces capasaicin-induced trigeminal pain and vasomotor reactions in human skin. *Pain* 2008;141:60-69.
- 136- Gill DM. Bacterial Toxins: A fable of lethal amounts. *Microbiological Reviews* 1982;46:86-94.
- 137- Gilron I, Booher SL, Rowan MS, Smoller MS, Max MB. A randomized, controlled trial of high-dose dextromethorphan in facial neuralgias. *Neurol* 2000;55:964-971.

- 138- Gilron I, Booher SL, Rowan JS, Max MB. Topiramate in trigeminal neuralgia: a randomized, placebo-controlled multiple crossover pilot study. *Clin Neuropharmacol* 2001;24:109-112.
- 139- Goadsby PJ, Hoskin KL. The distribution of trigeminovascular afferents in the nonhuman primate brain *Macaca nemestrina*: a c-fos immunocytochemical study. *J Anat* 1997;190:367-375.
- 140- Goadsby PJ, Hoskin KL, Knight YE. Stimulation of the greater occipital nerve increases metabolic activity in the trigeminal nucleus caudalis and cervical dorsal horn of the cat. *Pain* 1997;73:23-28.
- 141- Gobel S, Falls WM, Humphrey E. Morphology and synaptic connections of ultrafine primary axons in lamina I of the spinal dorsal horn: candidates for the terminal axonal arbors of primary neurons with unmyelinated (C) axons. *J. Neurosci* 1981;10:1163-1179.
- 142- Godaux E, Desmedt JE. Human masseter muscle: H and tendon reflexes. *Arch Neurol (Chic)* 1975;32:229-234.
- 143- Goto F, Ishizaki K, Yoshikawa D, Obata H, Arii H, Terada M. The long lasting effects of peripheral nerve blocks for trigeminal neuralgia using high concentration of tetracaine dissolved in bupivacaine. *Pain* 1999;79:101-103.
- 144- Greene EC. *Anatomy of the rat*. New York: Hafner, 1955.
- 145- Greenwood LF, Sessle BJ. Inputs to trigeminal brain stem neurons from facial, oral, tooth pulp and pharyngolaryngeal tissues: II. Role of trigeminal nucleus caudalis in modulating responses to innocuous and noxious stimuli. *Brain Res* 1976;117:227-238.
- 146- Grelik C, Bennett GJ, Ribeiro-da-Silva A. Autonomic fibre sprouting and changes in nociceptive sensory innervation in the rat lower lip skin following chronic constriction injury. *Eur J Neurosci* 2005;21:2475-2478.
- 147- Grüsser OJ. Die ersten systematischen beschreibungen und tieresperimentellen untersuchungen des botulismus. Zum 200. Geburtstag von Justinus Kerner am 18. September 1986. *Sudhoffs Arch* 1986;10:167-187.
- 148- Guilbaud G, Benoist JM, Gautron M. Contribution of sciatic and saphenous nerve to the ventrobasal thalamic neuronal responses to pinch in rats with a chronic sciatic nerve constriction: a study using anesthetic blocks and nerve section. *Neurosci Lett* 1995;187:197-200.

- 149- Haerer AF. The neurologic examination. In: DeJong's. The Trigeminal Nerve, chapter 12. JB Lipponcott Company Filadelfia 1992; 165-179.
- 150- Hakanson S. Trigeminal neuralgia treated by the injection of glycerol into the trigeminal cistern. *Neurosurgery* 1981;9:638-646.
- 151- Haley JE, Sullivan AF, Dickenson AH. Evidence for spinal *N*-methyl-D-aspartate receptor involvement in prolonged chemical nociception in the rat. *Brain Res* 1990;518:218-226.
- 152- Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a mazeexploration model of fear-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmac* 1984;327:1-5.
- 153- Hao JX, Yu W, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z. Capsaicin-sensitive afferents mediate chronic cold, but not mechanical, allodynia-like behavior in spinally injured rats, *Brain Res* 1996;722:177-180.
- 154- Harper AA, Lawson SN. Conduction velocity is related to morphological cell type in the rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* 1985;359:31-46.
- 155- Hascoët M, Bourin M. A new approach to the light/dark procedure in mice. *Pharmacol. Biochem Behav* 1998;60:645-653.
- 156- Haymaker W, Woodhall B. Peripheral nerve injuries. Principles of diagnosis. WB Saunder, 1945 Philadelphia.
- 157- Heckmann M, Heyer G, Brunner B, Plewig G. Botulinum toxin type A injection in the treatment of lichen simplex: an open pilot study. *J Am Acad Dermatol* 2002;46:617-619.
- 158- Hiura A. Neuroanatomical effects of capsaicin on the primary afferent neurons, *Arch Histol Cytol* 2000;63:199-215.
- 159- Hoffmann KD, Matthews MA. Comparison of sympathetic neurons in orofacial and upper extremity nerves: implications for causalgia. *J. Oral Maxillofac. Surg* 1990;48:720-726.
- 160- Holden JE, Pizzi JA. The challenge of chronic pain. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2003;55:935-948.
- 161- Holland LN, Goldstein BD. Examination of tonic nociceptive behavior using a method of substance P-receptor desensitization in the dorsal horn. *Pain* 1994;56:339-346.

- 162- Holland LN, Goldstein BD. Changes of substance P-like immunoreactivity in the dorsal horn are associated with the phasic behavioural response to a formalin stimulus. *Brain Res* 1990;537:287-292.
- 163- Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* 1991;43:143-201.
- 164- Honda K, Harada A, Takano Y, Kamiya H. Involvement of M3 muscarinic receptors of the spinal cord in formalin-induced nociception in mice. *Brain Research* 2000;859:38-44.
- 165- Hong S, Wiley JW. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in the expression and function of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* 2005;280:618-627.
- 166- Honor P, Menning PM, Rogers SD. Spinal substance P receptor expression and internalization in acute, short-term, and long-term inflammatory pain states. *J Neurosci* 1999;19:7670-7678.
- 167- Hwang SW, Cho H, Kwak J. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:6155–6160.
- 168- Idanpaan-Heikkila JJ, Guilbaud G. Pharmacological studies on a rat model of trigeminal neuropathic pain: baclofen, but not carbamazepine, morphine or tricyclic antidepressants, attenuates the allodynia-like behaviour. *Pain* 1999;79:281-290.
- 169- Imamura Y, Kawamoto H, Nakanishi O. Characterization of heat hyperalgesia in an experimental trigeminal neuropathy in rats. *Exp Brain Res* 1997;116:97-103.
- 170- Ingvar Jensen BK, Laursen H, Olsen UB, Hansen AJ. Possible mechanism of c-fos expression in trigeminal nucleus caudalis following cortical spreading depression. *Pain* 1997;72:407-415.
- 171- International Headache Society Classification Subcommittee. The international classification of headache disorders: 2nd edition. *Cephalalgia* 2004;24:9-160.
- 172- Iyadomi M, Iyadomi I, Kumamoto E, Tomokuni K, Yoshimura M. Presynaptic inhibition by baclofen of miniature EPSCs and IPSCs in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal dorsal horn. *Pain* 2000;85:385-393.

- 173- Iwasaki Y, Tanabe M, Kobata K, Watanabe T. TRPA1 agonists-allyl isothiocyanate and cinnamaldehyde-induce adrenaline secretion. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008;72:2608-2614.
- 174- Jabbari B. Evidence based medicine in the use of botulinum toxin for back pain. *J Neural Transm* 2008;115:637-640.
- 175- Jacquin MF, Hess A, Yang G, Adamo P, Math MF, et al. Organization of the infraorbital nerve in rat: a quantitative electron microscopic study. *Brain Res* 1984;290:131-135.
- 176- Jacquin MF, Chiaia NL, Rhoades RW. Trigeminal projections to contralateral dorsal horn: central extent, peripheral origins, and plasticity. *Somatosens. Mot Res* 1990;7:153-183.
- 177- Jacquin MF, Rhoades RW. Cell structure and response properties in the trigeminal subnucleus oralis. *Somatosens Mot Res* 1990;7:265-288.
- 178- Jakubowski M, McAllister PJ, Bajwa ZH, Ward TN, Smith P, et al. Exploding vs. imploding headache in migraine prophylaxis with Botulinum Toxin A. *Pain* 2006;125:286-295.
- 179- Jannetta PJ. Arterial compression of the trigeminal nerve at the pons in patients with trigeminal neuralgia. *J. Neurosurg* 1967;26:159-162.
- 180- Jannetta PJ. Neurovascular compression in cranial nerve and systemic disease. *Ann Surg* 1980;192:518-525.
- 181- Jasmin L, Kohan L, Franssen M, Janni G, Goff JR. The cold plate as a test of nociceptive behaviors: description and application to the study of chronic neuropathic and inflammatory pain models. *Pain* 1998;75:367-782.
- 182- Jhaveri MD, Elmes SJ, Kendall DA, Chapman V. Inhibition of peripheral vanilloid TRPV1 receptors reduces noxious heat-evoked responses of dorsal horn neurons in naive, carrageenan-inflamed and neuropathic rats. *Eur J Neurosci* 2005;22:361-370.
- 183- Ji RR, Samad TA, Jin SX, Schmoll R, Woolf CJ. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron* 2002;36:57-68.
- 184- Johnston JB. The radix mesencephalica trigemini. *J Comp Neurol* 1909;19:593-644.

- 185- Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001;413:203-210.
- 186- Karai L, Brown DC, Mannes AJ, Connelly ST, Brown J, et al. Deletion of vanilloid receptor 1-expressing primary afferent neurons for pain control. *J Clin Invest* 2004;113:1344-1352.
- 187- Karashima Y, Prenen J, Meseguer V, Owsianik G, Voets T, et al. Modulation of the transient receptor potential channel TRPA1 by phosphatidylinositol 4,5-biphosphate manipulators. *Pflugers Arch* 2008;457:77-89.
- 188- Karashima Y, Talavera K, Everaerts W, Janssens A, Kwan KY, et al. TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *PNAS* 2009;106:1273-1278.
- 189- Karsenty G, Corcos J, Schurch B. Urological applications of botulinum toxins. *Prog Urol* 2006;16:263-274.
- 190- Katsura H, Obata K, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, et al. Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. *Exp Neurol* 2006;200:112-123.
- 191- Katusic S, Beard CM, Bergstralh E, Kurland LT. Incidence and clinical features of trigeminal neuralgia, Rochester, Minnesota, 1945-1984. *Ann Neurol* 1990;27:89-95.
- 192- Katusic S, Williams DB, Beard CM, Bergstralh EJ, Kurland LT. Epidemiology and clinical features of idiopathic trigeminal neuralgia and glossopharyngeal neuralgia: similarities and differences, Rochester, Minnesota, 1945-1984. *Neuroepidemiol* 1991;10:276-281.
- 193- Kauppila T, Xu XJ, Yu W, Wiesenfeld-Hallin Z. Dextromethorphan potentiates the effect of morphine in rats with peripheral neuropathy. *Neuroreport* 1998;9:1071-1074.
- 194- Kayser V, Aibel B, Hamon M, Bourgoin S. The antimigraine 5-HT 1B/1D receptor agonists, sumatriptan, zolmitriptan and dihydroergotamine, attenuate pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 2002;137:1287-1297.
- 195- Kerner J. Vergiftung durch verdorbene Würste. *Tübinger Blätter für Naturwissenschaften und Arznei-kind* 1817;3:1-25.

- 196-Kerner J. Neue Beobachtungen über die in Württemberg so häufig vorkommenden tödlichen Vergiftungen durch den Genuss geräucherter Würste. Osiander, Tübingen 1820.
- 197-Kerner J. Das Fettgift oder die Fettsäure and ihre Wirkungen auf den thierischen Organismus, eine Beytrag zur Untersuchung des n verdorbenen Würsten giftig wirkenden Stoffes. Cotta, Stuttgart 1822.
- 198- Kerr FWL. A mechanism to account for frontal headache in cases of posterior fossa tumors. *J Neurosurg* 1961;18:605-609.
- 199- Kerr FWL. The fine structure of the subnucleus caudalis of the trigeminal nerve. *Brain Research* 1970;23:129-145.
- 200-Killian JM, Fromm GH. Carbamazepine in the treatment of neuralgia. *Arch Neurol* 1968;19:129-136.
- 201-Kim KS, Kim SS, Yoon JH, Han JW. The effect of botulinum toxin type A injection for intrinsic rhinitis. *J Laryngol Otol* 1998;112:248-251.
- 202- Kim HY, Park CK, Cho IH, Jung SJ, Kim JS, Oh SB. Differential Changes in TRPV1 Expression After Trigeminal Sensory Nerve Injury. *J Pain* 2008;9:280-288.
- 203-Kitamura Y, Matsuka Y, Spigelman I. Botulinum toxin type A (150kDa) decreases exaggerated neurotransmitter release from trigeminal ganglion neurons and relieves neuropathy behaviors induced by infraorbital nerve constriction. *Neuroscience* 2009;159:1422-1429.
- 204-Kobayashi K, Fukuoka T, Obata K, Yamanaka H, Dai Y, et al. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with trk receptors, *J Comp Neurol* 2005;493:596-606.
- 205-Koltzenburg M, Torebjork HE, Wahren LK. Nociceptor modulated central plasticity causes mechanical hyperalgesia in chronic neuropathic and acute chemogenic pain. *Brain* 1994;117:579-591.
- 206-Kretschmer T, Happel LT, England JD, Nguyen DH, Tiel RL, et al. Accumulation of PN1 and PN3 sodium channels in painful human neuroma – evidence from immunocytochemistry. *Acta Neurochir (Wien)* 2002;144:803-810.

- 207- Krugel L, Michel F. A morphological and somatotopic analysis of single unit activity in the trigeminal sensory complex of the cat. *Exp Neurol* 1926;5:139-156.
- 208- Kühn FJ, Kühn C, Lückhoff A. Inhibition of TRPM8 by icilin distinct from desensitization induced by menthol and menthol derivatives. *J Bio Chem* 2009;284:4102-4111.
- 209- Kugelberg E, Lindblom U. The mechanism of the pain in trigeminal neuralgia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1959;22:36-43.
- 210- Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang DS, et al. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* 2006;50:277-289.
- 211- Lavallée P, Urbain N, DUfresne C, Bokor H, Acsády L, et al. Feedforward inhibitory control of sensory information in higher-order thalamic nuclei. *J Neurosci* 2005;25:7489-7498.
- 212- Lazarov NE. Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. *Progress in Neurobiology* 2002;66:19-59.
- 213- Lechin F, van der Dijs B, Lechin ME, Amat J, Lechin AE, et al. Pimozide therapy for trigeminal neuralgia. *Arch Neurol* 1989;46:960-963.
- 214- Lee S, Carvell GE, Simons DJ. Motor modulation of afferent somatosensory circuits. *Nat Neurosci* 2008;12:1430-1438.
- 215- Lekan HA, Carlton SM, Coggeshall RE. Sprouting of A beta fibers into lamina II of the rat dorsal horn in peripheral neuropathy. *Neurosci Lett* 1996;208:147-150.
- 216- Lindstrom P, Lindblom U. The analgesic effect of tocainide in trigeminal neuralgia. *Pain* 1987;28:45-50.
- 217- Liu CN, Michaelis M, Amir R, Devor M. Spinal nerve injury enhances subthreshold membrane potential oscillations in DRG neurons: relation to neuropathic pain. *J. Neurophysiol* 2000;84:205-215.
- 218- Liu L, Chen L, Liedtke W, Simon SA. Changes in osmolality sensitize the response to capsaicin in the trigeminal sensory neurons. *J Neurophysiol* 2007;97:2001-2015.

- 219- Lowe NJ. Overview of botulinum neurotoxins. *J Cosmet Laser Ther* 2007;(Suppl1):11-16.
- 220- Love S, Coakham HB. Trigeminal neuralgia. Pathology and pathogenesis. *Brain* 2001;124:2347-2360.
- 221- Lunardi G, Leandri M, Albano C, Cultrera S, Fracassi M, et al. Clinical effectiveness of lamotrigine and plasma levels in essential and symptomatic trigeminal neuralgia. *Neurol* 1997;48:1714-1717.
- 222- Luvisetto S, Rossetto O, Montecucco C, Pavone F. Toxicity of botulinum neurotoxins in central nervous system of mice. *Toxicon* 2003;41:475-481.
- 223- Luvisetto S, Marinelli S, Lucchetti F, Marchi F, Cobianchi S, et al. Botulinum neurotoxins and formalin-induced pain: central vs. peripheral effects in mice. *Brain Res* 2006;1082:124-131.
- 224- Ma PM, Woolsey TA. Cytoarchitectonic correlates of the vibrissae in the medullary trigeminal complex of the mouse. *Brain Res* 1984;306:374-379.
- 225- MacDonald BK, Cockerell OC, Sander JWAS, Shorvon SD. The incidence and lifetime prevalence of neurological disorders in a prospective community-based study in the UK. *Brain* 2000;123:665-676.
- 226- Maesawa S, Salame C, Flickinger JC, Pirris S, Kondziolka D. Clinical outcomes after stereotactic radiosurgery for idiopathic trigeminal neuralgia. *J Neurosurg* 2001;94:14-20.
- 227- Marfurt, C. F. The central projections of trigeminal primary afferent neurons in the cat as determined by the transganglionic transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 1981;203:785-798.
- 228- Martin JH. *Neuroanatomy Text and Atlas*. Second Edition, Appleton & Lange. Stamford 1996.
- 229- Mason L, Moore RA, Derry S, Edwards JE, McQuay HJ. Systematic review of topical capsaicin for the treatment of chronic pain. *BMJ* 2004;328:991.
- 230- Mathew N, Frishberg BM, Gawel M et al. Botulinum toxin type A (BOTOX®) for the prophylactic treatment of chronic daily headache: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Headache* 2005;45:293-307.
- 231- Mathew NT, Kailasam J, Meadors L. Predictors of response to botulinum toxin type A (BoNTA) in chronic daily headache. *Headache* 2008;48:194-200.

- 232- Mathews E S, Scrivani SJ. Percutaneous stereotactic radiofrequency thermal rhizotomy for the treatment of trigeminal neuralgia. *Mt Sinai J Med* 2000;67:288-299.
- 233- Mathisen LC, Skjelbred P, Skoglund LA, Oye I. Effect of ketamine, an NMDA receptor inhibitor, in acute and chronic orofacial pain. *Pain* 1995;61:215-220.
- 234- McCarson KE, Krause JE. The formalin-induced expression of tachykinin peptide and neurokinin receptor messenger RNAs in rat sensory ganglia and spinal cord is modulated by opiate preadministration. *Neuroscience* 1995;64:729-739.
- 235- McCarson KE, Krause JE. The neurokinin-1 receptor antagonist LY306,740 blocks nociception-induced increases in dorsal horn neurokinin-1 receptor gene expression. *Mol Pharmacol* 1996;50:1189-1199.
- 236- Mckemy DD, Neuhausser WM, Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 2002;416:52-58.
- 237- McQuay H, Carroll D, Jadad AR, Wiffen P, Moore A. Anticonvulsant drugs for management of pain: a systematic review. *BMJ* 1995;311:1047-1052.
- 238- McMahon HT, Foran P, Dolly JO, Verhage M, Wiegant VM, et al. Tetanus and botulinum toxins type A and B inhibit glutamate, GABA, aspartate and met-enkephalin release from synaptosomes: clues to the locus of action. *J Biol Chem* 1992;267:21338-21343.
- 239- McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL e colaboradores. *PNAS* 2007;104:13525-13530.
- 240- Menezes C, Rodrigues B, Magalhães E, Melo A. Botulinum toxin type A in refractory chronic migraine: an open-label trial. *Arq Neuropsiquiatr* 2007;65:596-598.
- 241- Meng J, Wang J, Lawrence G, Dolly JO. Synaptobrevin I mediates exocytosis of CGRP from sensory neurons and inhibition by botulinum toxins reflects their antinociceptive potential. *J Cell Sci* 2007;120:2864-2874.
- 242- Meng J, Ovsepian SV, Wang J, Pickering M, Sasse A, et al. Activation of TRPV1 mediates calcitonin gene-related peptide release, which excites trigeminal sensory neurons and is attenuated by a retargeted botulinum toxin with anti-nociceptive potential. *J Neurosci* 2009;29:4981-92.

- 243- Merskey H, Bogduk N. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms, 2nd ed. Seattle, WA: IASP Press; 1994.
- 244- Meseguer V, Karashima Y, Talavera K, D'Hoedt D, Donovan-Rodríguez T, et al. Transient receptor potential channels in sensory neurons are targets of the antimycotic agent clotrimazole. *J Neurosci* 2008;28:576-586.
- 245- Micheli F, Scorticati MC, Raina G. Beneficial effects of botulinum toxin type a for patients with painful tic convulsiv. *Clin Neuropharmacol* 2002;25:260-262.
- 246- Millan MJ, Duka T. Anxiolytic properties of opiates and endogenous opioid peptides and their relationship to the actions of benzodiazepines. *Modern Problems of Pharmacopsychiatry* 1981;17:123-141.
- 247- Mizuno N, Sauerland EK, Clemente CD. Projections from the orbital gyrus in the cat. I. To brain stem structures. *J Comp Neurol* 1968;133:463-476.
- 248- Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Garcia-Sanz N, Ferrer-Montiel A. Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J Biol Chem* 2004;279:25665-25672.
- 249- Mullan S, Lichtor T. Percutaneous microcompression of the trigeminal ganglion for trigeminal neuralgia. *J Neurosurg* 1983;59:1007-1012.
- 250- Nagaro T, Shimizu C, Inoue H, Fujitani T, Adachi N, et al. The efficacy of intravenous lidocaine on various types of neuropathic pain. *Masui* 1995;44:862-867.
- 251- Nagata K, Duggan A, Kumar G, García-Añoveros J. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci* 2005;25:4052-4061.
- 252- Naguib M, Yaksh LT. Characterization of muscarinic receptor subtypes that mediate anti-nociception in the rat spinal cord. *Anesth Analg* 1997;85:847-853.
- 253- Nakahara K, Okada M, Nakanishi S. The metabotropic glutamate receptor mGluR5 induces calcium oscillations in cultured astrocytes via protein kinase C phosphorylation. *J Neurochem* 1997;4:1467-1475.
- 254- Nakahara K, Ohbayashi M, Tomita H, Mlyashita Y. The neuronal basis of visual memory and imagery in primate: a neurophysiological approach. *Adv Biophys* 1998;35:103-119.

- 255- Neil A, Attal N, Guilbaud G. Effects of guanetidine on sensitization to natural stimuli and self-mutilating behaviour in rats with a peripheral neuropathy. *Brain Research* 1991;565:237-246.
- 256- Nichols ML, Lopez Y, Ossipov MH, Bian D, Porreca F. Enhancement of the antiallodynic and antinociceptive efficacy of spinal morphine by antisera to dynorphin A (1-13) or MK-801 in a nerve-ligation model of peripheral neuropathy. *Pain* 1997;69:317-322.
- 257- Nicol CF. A four year double blind study of tegretol in facial pain. *Headache* 1969;9:54-57.
- 258- Noguchi K, Kawai Y, Fukuoka T, Senba E, Miki K. Substance P induced by peripheral nerve injury in primary afferent sensory neurons and its effect on dorsal column nucleus neurons. *Journal of Neuroscience* 1995;15:7633-7643.
- 259- Obata K, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Mizushima T, et al. Role of mitogen-activated protein kinase activation in injured and intact primary afferent neurons for mechanical and heat hypersensitivity after spinal nerve ligation. *J Neurosci* 2004;24:10211-10222.
- 260- Obata K, Katsura H, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, et al. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest* 2005;115:2393-2401.
- 261- Odderson IR. Axillary hyperhidrosis treated with botulinum toxin A. *Arch Phys Med Rehabil* 1998;79:350-352.
- 262- Olszewski J, Baxter D. *Cytoarchitecture of the human brain stem*. S Karger, New York 1954.
- 263- Ossipov MH, Lopez Y, Nichols ML, Bian D, Porreca F. The loss of antinociceptive efficacy of spinal morphine in rats with nerve ligation injury is prevented by reducing spinal afferent drive. *Neurosci Lett* 1995;199:87-90.
- 264- Otsuka M, Yanagisawa M. Does substance P act as a pain transmitter? *Trends Pharmacol Sci* 1987;8:506-510.
- 265- Paik SK, Park KP, Lee SK, Ma SK, Cho YS, et al. Light and electron microscopic analysis of the somata and parent axons innervating the rat upper molar and lower incisor pulp. *Neuroscience* 2009;162:1279-1286.

- 266- Pajot J, Pelissier T, Sierralta F, Raboisson P, Dallel R. Differential effects of trigeminal tractotomy on A δ - and C-fiber-mediated nociceptive responses, *Brain Res* 2000;863:289-292.
- 267- Palao CM, Cases RP, Sanz NG, Montiel AF. Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004;279:25665-25672.
- 268- Parada CA, Tambeli CH, Cunha FQ, Ferreira SH. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience* 2001;102:937-944.
- 269- Park HJ, Lee Y, Lee J, Park C, Moon DE. The effects of botulinum toxin A on mechanical and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Can J Anaesth* 2006;53:470-477.
- 270- Parsons, C. G. NMDA receptors as targets for drug action in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2001;429:71-78.
- 271- Pauwels PJ, John GW. Present and future of 5-HT receptor agonists as antimigraine drugs. *Clin Neuropharmacol* 1999;22:123-136.
- 272- Pei L, Lin CY, Dai JP, Yin GF. Facial pain induces the alteration of transient receptor potential vanilloid receptor 1 expression in rat trigeminal ganglion. *Neurosci Bull* 2007;23:92-100.
- 273- Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, et al. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 2002;108:705-715.
- 274- Peres MF, Stiles MA, Siow HC, Rozen TD, Young WB, et al. Greater occipital nerve blockade for cluster headache. *Cephalalgia* 2002;22:520-522.
- 275- Pernow B. Substance P. *Pharmacol Rev* 1983;35:506-510.
- 276- Perrot S, Attal N, Ardid , Guilbaud G. Are mechanical and cold allodynia in mononeuropathic and arthritic rats relieved by systemic treatment with calcitonina and guanethidine? *Pain* 1993;52:41-47.
- 277- Petit JH, Herman JM, Nagda S, DiBiase SJ, Chin LS. Radiosurgical treatment of trigeminal neuralgia: evaluating quality of life and treatment outcomes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;56:1147-1153.

- 278- Pfaller K, Arvidsson J. Central distribution of trigeminal and upper cervical primary afferents in the rat studied by anterograde transport of horseradish peroxidase conjugated to wheat germ agglutinin. *J Comp Neurol* 1988;268:91-108.
- 279- Piatt JH Jr, Wilkins RH. Microvascular decompression for tic douloureux. *Neurosurgery* 1984;15:456.
- 280- Piovesan EJ, Kowacs PA, Tatsui CE, Lange MC, Ribas LC, et al. Referred pain after painful stimulation of the greater occipital nerve in humans: evidence of convergence of cervical afferences on trigeminal nucle. *Cephalalgia* 2001-a;21:107-109.
- 281- Piovesan EJ, Werneck LC, Kowacs PA, Tatsui CE, Lange MC, et al. Anesthetic blockade of the greater occipital nerve in migraine prophylaxis. *Arq Neuropsiquiat* 2001;59:545-551.
- 282- Piovesan EJ, Kowacs PA, Oshinsky ML. Convergence of cervical and trigeminal sensory afferents. *Curr Pain Headache Rep* 2003;7:377-383.
- 283- Piovesan EJ, Teive HG, Kowacs PA, Della Coletta MV, Werneck LC, Silberstein SD. An open study of botulinum-A toxin treatment of trigeminal neuralgia. *Neurology* 2005;65:1306-1308.
- 284- Piovesan EJ, Di Stani F, Kowacs PA, Mulinari RA, Radunz VH, et al. Massaging over the greater occipital nerve reduces the intensity of migraine attacks: evidence for inhibitory trigemino-cervical convergence mechanisms. *Arq Neuropsiquiatr* 2007;65:599-604.
- 285- Piovesan EJ, Teive HG, Kowacs PA, Silva LL, Werneck LC. Botulinum toxin type-A for primary stabbing headache. An open study. *Arq Neurops* 2010 (Em fase de publicação).
- 286- Pitcher GM, Henry JL. Second phase of formalin-induced excitation of spinal dorsal horn neurons in spinalized rats is reversed by sciatic nerve block. *Eur J Neurosci* 2002;15:1509-1515.
- 287- Prado WA, Gonçalves AS. Antinociceptive effect of intrathecal neostigmine evaluated in rats by two different pain models. *Braz J Med Biol Res* 1997;30:1225-1231.

- 288- Premkumar LS, Ahern GP. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* 2000;408:985-990.
- 289- Puig S, Sorkin LS. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain* 1995;64:345-355.
- 290- Quasthoff S, Grosskreutz J, Schroder JM, Schneider U, Grafe P. Calcium potentials and tetrodotoxin-resistant sodium potentials in unmyelinated C fibres of biopsied human sural nerve. *Neuroscience* 1995;69:955-965.
- 291- Raboisson P, Dallel R. The orofacial formalin test. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2004;28:219-226.
- 292- Raboisson P, Bourdiol P, Dallel R, Clavelou P, Woda A. Responses of trigeminal subnucleus oralis nociceptive neurones to subcutaneous formalin in the rat. *Neurosci Lett* 1991;125:179-182.
- 293- Radhakrishnan V, Henry JL. Novel substance P antagonist, CP-96345, blocks responses of cat spinal neurons to noxious cutaneous stimulation and to substance P. *Neurosci Lett* 1991;132:39-43.
- 294- Ramón Cajal S. *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*. 1909, Vol 1 A, Maloine, Paris.
- 295- Ranoux D, Attal N, Morain F, Bouhassira D. Botulinum toxin type a induces direct analgesic effects in chronic neuropathic pain. *Ann Neurol*. 2008;64:274-283.
- 296- Relja M, Poole AC, Schoenen J, Pascual J, Lei X, Thompson C, European BoNTA Headache Study Group. A multicentre, double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel group study of multiple treatments of botulinum toxin type A (BoNTA) for the prophylaxis of episodic migraine headaches. *Cephalalgia* 2007;27:492-503.
- 297- Rha DW, Yang EJ, Chung HI, Kim HB, Park CI, et al. Is electrical stimulation beneficial for improving the paralytic effect of botulinum toxin type A in children with spastic diplegic cerebral palsy. *Yonsei Med J* 2008;49:545-552.
- 298- Roberts PA, Matzke HA. Projections of the subnucleus caudalis of the trigeminal nucleus in the sheep. *J Comp Neurol* 1971;141:273-282.
- 299- Rockliff BW, Davis EH. Controlled sequential trials of carbamazepine in trigeminal neuralgia. *Arch Neurol* 1966;15:129-136.

- 300- Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res* 1997;30:289-304.
- 301- Rogawski MA, Loscher W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci* 2004;5:553-564.
- 302- Rossetto O, Seveso M, Caccin P, Montecucco C. Botulinum neurotoxins are metalloproteases specific for SNARE proteins involved in neuroexocytosis. In: Kreyden OP, Böne R, Burg G (eds). *Hyperhidrosis and botulinum toxin in dermatology*. *Curr Probl Dermatol*, vol 30. Karger, Basel, 2002:117-125.
- 303- Roy JY, Lee JS, Zhong Y. Activation of TRPV1 and TRPA1 leads to muscle nociception and mechanical hyperalgesia. *Pain* 2009;144:270-272.
- 304- Rozen TD. Trigeminal neuralgia and glossopharyngeal neuralgia. *Neurol Clin* 2004;22:185-206.
- 305- Saito K, Hitomi S, Suzuki I, Masuda Y, Kitagawa J, Tsuboi Y et al. Modulation of trigeminal spinal subnucleus caudalis neuronal activity following regeneration of transected inferior alveolar nerve in rats. *J Neurophysiol* 2008;99:2251-2263.
- 306- Salas MM, Hargreaves KM, Akopian AN. TRPA-1-mediated responses in trigeminal sensory neurons: interaction between TRPA1 and TRPV1. *Eur J Neurosci* 2009;29:1568-1578.
- 307- Scharf JH. Sensible ganglien. In: Möllendorff MV, Bargmann W. *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd.IV/3, Nervensystem*. Springer, Berlin – 1958:290-300.
- 308- Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, Rossetto O, Polverin de Laureto P, et al. Tetanus and botulinum-B toxins block transmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 1992;359:832-835.
- 309- Scrivani SJ, Mathews ES, Maciewicz RJ. Trigeminal neuralgia. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod*, 2005;100:527-538.
- 310- Scott AB. Botulinum toxin injection to correct strabism. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1979;79:924-927.
- 311- Sessle BJ. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. *Minerva Anesthesiol* 2005;71:117-136.

- 312- Sessle BJ. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11:57-91.
- 313- Sessle BJ. Mechanisms of trigeminal and occipital pain. *Pain* 1996;3:91-116.
- 314- Sessle BJ. Neurophysiology of orofacial pain. *Dent. Clin. North Am* 1987;31:595-613.
- 315- Shir Y, Seltzer Z. A-fibers mediate mechanical hyperesthesia and allodynia and C-fibers mediate thermal hyperalgesia in a new model of causalgiform pain disorders in rats. *Neurosci Lett* 1990;115:62-67.
- 316- Shortland P, Molander M, Fitzgerald M, Woolf C. Neonatal capsaicin treatment induces invasion of the substantia gelatinosa by the arborizations of HFA's in the rat dorsal horn. *Journal of Comparative Neurology*, 1990;296:23-31.
- 317- Shortland PJ, Demaro JA, Shang F, Waite PM, Jacquin MF. Peripheral and central predictors of whisker afferent morphology in the rat brainstem. *J Comp Neurol*. 1996;375:481-501.
- 318- Silberstein S. Botulinum toxin type A for the prophylactic treatment of chronic daily headache: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Mayo Clin Proc* 2005;80:1126-1137.
- 319- Silberstein S, Mathew N, Saper J, Jenkins S, for the BOTOX® Migraine Clinical Research Group. Botulinum toxin type A as a migraine preventive treatment. *Headache* 2000;40:445-450.
- 320- Sileri P, Mele A, VM. Medical and surgical treatment of chronic anal fissure: a prospective study. *J Gastrointest Surg* 2007;11:1541-1548.
- 321- Simpson LL. The origin, structure, and pharmacological activity of botulinum toxin. *Pharmacol Rev* 1981;33:155-188-A.
- 322- Simpson DM, Blitzer A, Brasher AI. Assessment: Botulinum neurotoxin for the treatment of movement disorders (an evidence-based review): report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2008;70:1699-1706-B.
- 323- Simpson DM, Gracies JM, Graham HK. Assessment: Botulinum neurotoxin for the treatment of spasticity (an evidence-based review): report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2008;70:1691-1698.

- 324- Sindrup SH, Jensen TS. Pharmacotherapy of trigeminal neuralgia. *Clin J Pain* 2002;18:22-27.
- 325- Sindrup SH, Otto M, Finnerup NB, Jensen T. S. Antidepressants in the treatment of neuropathic pain. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005;96:399-409.
- 326- Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC et al. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br J Pharmacol* 2000;129:227–230.
- 327- Smith CP, Somogyi GT, Chancellor MB. Botulinum toxin: poisoning the spastic bladder en urethra. *Rev Urol* 2002;4:61-68.
- 328- Smith KJ, McDonald WI. Spontaneous and evoked electrical discharges from a central demyelinating lesion. *J Neurol Sci* 1982;55:39-47.
- 329- Soderpalm, B. Anticonvulsants: aspects of their mechanisms of action. *Eur. J. Pain*, 2002;6:3-9.
- 330- Sosnik R, Haidarliu S, Ahissar E. Temporal frequency of whisker movement. I. Representations in brain stem and thalamus. *J Neurophysiol* 2001;86:339-353.
- 331- Spencer RF, McNeer KW. Botulinum toxin paralysis of adult monkey extraocular muscle. Structural alterations in orbital, singly innervated muscle fibers. *Arch Ophthalmol* 1987;105:1703-1711.
- 332- Stajcic Z, Juniper RP, Todorovic L. Peripheral streptomycin/lidocaine injections versus lidocaine alone in the treatment of idiopathic trigeminal neuralgia. A double blind controlled trial. *J Craniomaxillofac Surg* 1990;18:243-246.
- 333- Stewart WA, King RB. Fiber projections from the nucleus caudalis of the spinal trigeminal nucleus. *J Comp Neurol* 1963;121:271-286.
- 334- Story GM, Peier AM, Reeve AJ. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 2003;112:819–829.
- 335- Svensson P, Cairns BE, Wang K. Glutamate-evoked pain and mechanical allodynia in the human masseter muscle. *Pain* 2003;101:221-227.
- 336- Sweet WH. The treatment of trigeminal neuralgia (tic douloureux). *N Engl J Med* 1986;315:174-177.
- 337- Swope D, Barbano R. Treatment recommendations and practical applications of cervical dystonia. *Neurol Clin* 2008;26(Suppl-1):54-65.

- 338- Takahashi K, Sato J, Mizumura K. Responses of C-fiber low threshold mechanoreceptors and nociceptors to cold were facilitated in rats persistently inflamed and hypersensitive to cold. *Neuroscience Research* 2003;47:409-419.
- 339- Takahashi N, Mizuno Y, Kozai D, Yamamoto S, Kiyonaka S, et al. Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators. *Channels (Austin)* 2008;2:287-298.
- 340- Tal M, Bennett GJ. Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. *Pain* 1994;57:375-382.
- 341- Tal M, Devor M. Ectopic discharge in injured nerves: comparison of trigeminal and somatic afferents. *Brain Res* 1992;579:148-151.
- 342- Taylor BK, Peterson MA, Basbaum AI. Persistent cardiovascular and behavioral nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. *J Neurosci* 1995;15:7575-7584.
- 343- Taylor-Clark TE, Udem BJ, Macglasham DW Jr, Gratta S, Carr MJ. Prostaglandin-induced activation of nociceptive neurons via direct interaction with transient receptor potential A1 (TRPA1). *Mol Pharmacol* 2008;73:274-281.
- 344- Testut L, Latarjet A. Nervio trigémino. In: *Tratado de Anatomía humana*. Tomo tercero, 80-122. Salvat editores, Barcelona 1979.
- 345- Timofeeva E, Dufresne C, Sik A, Zhang ZW, Deschênes M. Cholinergic modulation of vibrissal receptive fields in trigeminal nuclei. *J Neurosci* 2005;25:9135-9143.
- 346- Ting PT, Freiman A. The story of *Clostridium botulinum*: from food poisoning to Botox. *Clin Med* 2004;4:258-261.
- 347- Tiwari RK, King RB. Fiber projections from trigeminal nucleus caudalis in primate (squirrel monkey and baboon). *J Comp Neurol* 1974;158:191-206.
- 348- Tjolsen Aberg OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992;51:5-17.
- 349- Todd AJ, Spike RC. The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn. *Prog Neurobiol* 1993;41:609-645.

- 350- Tölle T, Dukes E, Sadosky A. Patient burden of trigeminal neuralgia: results from a cross-sectional survey of health state impairment and treatment patterns in six European countries. *Pain Practice* 2006;6:153-160.
- 351- Torebjork HE, Lundberg LER, LaMotte RH. Central changes in processing of mechanoreceptive input in capsaicin-induced secondary hyperalgesia in humans. *Journal of Physiology*, 1992;448:765-780.
- 352- Torrance N, Smith BH, Bennett MI, Lee AJ. The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey. *Journal of Pain* 2006;7:281-289.
- 353- Torrens JK. Clostridium botulinum was named because of association with “sausage poisoning”. *BMJ* 1998;316:151.
- 354- Trageser JC, Keller A. Reducing the uncertainty: gating of peripheral inputs by zona incerta. *J Neurosci* 2004;24:8911-8915.
- 355- Truini A, Galeotti F, Cruccu G. New insight into trigeminal neuralgia. *J. Headache Pain* 2005;6:237-239.
- 356- Türk U, Ilhan S, Alp R, Sur H. Botulinum toxin and intractable trigeminal neuralgia. *Clin Neuropharmacol* 2005;28:161-162.
- 357- Turp JC, Gobetti JP. Trigeminal neuralgia versus atypical facial pain. A review of the literature and case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;81:424-432.
- 358- Urbain N, Deschênes M. Motor cortex gates vibrissal responses in a thalamocortical projection pathway. *Neuron* 2007;56:714-725.
- 359- Usunoff KG, Marani E, Schoen JH. The trigeminal system in man. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1997;136:1-126.
- 360- Walker KM, Urban L, Medhurst SJ, Patel S, Panesar M, et al. The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304:56-62.
- 361- Wang S, Redgrave P. Microinjections of muscimol into lateral superior colliculus disrupt orienting and oral movements in the formalin model of pain. *Neuroscience* 1997;81:967-988.
- 362- Warner SE, Sanford DA, Becker BA, Bain SD, Srinivasan S, et al. Botox induced muscle paralysis rapidly degrades bone. *Bone* 2006;38:257-264.

- 363- Waxman SG, Cummins TR, Dib-Hajj S, Fjell J, Black JA. Sodium channels, excitability of primary sensory neurons, and the molecular basis of pain. *Muscle Nerve* 1999;22:1177-1187.
- 364- Weigel G, Kenneth F, Casey M. *Striking Back! Gainesville: Trigeminal neuralgia association* 2000.
- 365- Welch MJ, Purkiss JR, Foster KA. Sensitivity of embryonic rat dorsal root ganglia neurons to *Clostridium botulinum* neurotoxins. *Toxicon* 2000;38:245-258.
- 366- Wen WD, Yuan F, Song YF. Experimental studies for botulinum toxin type A on allergic rhinitis in the rat. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2004;39:97-101.
- 367- Wheeler-Aceto H, Cowan A. Neurogenic and tissue-mediated components of formalin-induced edema: evidence for supraspinal regulation. *Agents Actions* 1991;34:264-269.
- 368- Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ. The role of cholecystinin in nociception, neuropathic pain and opiate tolerance. *Regul Pept* 1996;65:23-28.
- 369- Woda A. Pain in the trigeminal system: from orofacial nociception to neural network modeling. *Dent Res* 2003;82:764-768.
- 370- Woolf CJ, Shortland P, Reynolds M, Ridings J, Doubell T, et al. Reorganization of central terminals of myelinated primary afferents in the rat dorsal horn following peripheral axotomy. *J Comp Neurol* 1995;360:121-134.
- 371- Woolf CJ. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. *Life Sci* 2004;74:2605-2610.
- 372- Van Ermengem EP. A new anaerobic bacillus and its relation to botulism. *Rev Infect Dis* 1979;1:701-719.
- 373- van Kleef M, van Genderen WE, Narouze S, Nurmikko TJ, van Zundert J. Trigeminal neuralgia. *Pain Practice* 2009;9:252-259.
- 374- Veinante P, Jacquin M, Deschênes M. Thalamic projections from the whisker sensitive regions of the spinal trigeminal complex in the rat. *J Comp Neurol* 2000;420:233-240.

- 375- Voisin DL, Domejean-Orliaguet S, Chalus M, Dallel R, Woda A. Ascending connections from the caudal part to the oral part of the spinal trigeminal nucleus in the rat. *Neuroscience* 2002;109:183-193.
- 376- Volcy M, Tepper SJ, Rapoport AM, Sheftell FD, Bigal ME. Botulinum toxin A for the treatment of greater occipital neuralgia and trigeminal neuralgia: a case report with pathophysiological considerations. *Cephalalgia* 2006;26:336-340.
- 377- Voogd J, Nieuwenhuys R, Van Dongen PA, Ten Donkelaar HJ. Mammals. In: Nieuwenhuys, R.; Ten Donkelaar, H. J.; Nicholson, C. *The central nervous system of vertebrates*, v. 3, Springer, Berlin, 1998, p. 1637-2098.
- 378- Vos BP, Benoist JM, Gautron M, Guilbaud G. Changes in neuronal activities in the two ventral posterior medial thalamic nuclei in an experimental model of trigeminal pain in the rat by constriction of one infraorbital nerve. *Somatosens Mot Res* 2000;17:109-122.
- 379- Vos BP, Maciewicz RJ. Behavioral changes following ligation of the infraorbital nerve in rat: an animal model of trigeminal neuropathic pain. In: Besson JM, Guilbaud G, editors. *Lesions of primary afferent fibers as a tool for the study of clinical pain*, Amsterdam: Elsevier, 1991, pp. 147-158.
- 380- Vos BP, Strassman AM, Maciewicz RJ. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *J Neurosci* 1994;14:2708-2723.
- 381- Xiao HS, Huang QH, Zhang FX, Bao L, Lu YJ, et al. Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002;99:8360-8365.
- 382- Zakrzewska JM, Chaudhry Z, Nurmikko TJ, Patton DW, Mullens EL. Lamotrigine (Lamictal) in refractory trigeminal neuralgia: results from a double-blind placebo controlled crossover trial. *Pain* 1997;73:223-230.
- 383- Zakrzewska JM, Cohen J, Brown J, Alksne J, Gemillion H, et al. An open study of botulinum-A toxin treatment of trigeminal neuralgia. *Neurology* 2006;9;66:1458-1459.

- 384- Zarrindast, MR, Rostami P, Zarei M, Roohbakhsh A. Intracerebroventricular effects of histaminergic agents on morphine-induced anxiolysis in the elevated plus-maze in rats. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2005;97:276-281.
- 385- Zhang HT, Xu ZM, Luo ZP, Qin BY. Anxiogenic effect of naltrexone in social interaction test in rats. *Acta pharmacologica Sinica* 1996;17:314-317.
- 386- Zhang RX, Mi Z, Qiao JT. Changes of spinal substance P, calcitonin gene-related peptide, somatostatin, Met-enkephalin and neurotensin in rats in response to formalin-induced pain. *Regul Pept* 1994;51:25-32.
- 387- Zhou S, Bonasera L, Carlton SM. Peripheral administration of NMDA, AMPA or KA results in pain behaviors in rats. *Neuroreport* 1996;7:890-895.
- 388- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109-110.
- 389- Zimmermann K, Leffler A, Babes A, Cendan CM, Carr RW, et al. Sensory neuron sodium channel Na_v 1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature* 2007;447:855-859.
- 390- Zucker E, Welker WI. Coding of somatic sensory input by vibrissae neurons in the rat's trigeminal ganglion. *Brain Research* 1969;12:138-156.
- 391- Zúñiga C, Díaz S, Piedimonte F, Micheli F. Beneficial effects of botulinum toxin type A in trigeminal neuralgia. *Arq Neuropsiqu* 2008;26:500-503.
- 392- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, et al. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 1999;400:452-457.
- 393- Yamamoto T, Yaksh TL. Stereospecific effects of a nonpeptidic NK1 selective antagonist, CP-96,345: anti-nociception in the absence of motor dysfunction. *Life Sci* 1991;49:1955-1963.
- 394- Yamamoto Y, Hatakeyama T, Taniguchi K. Immunohistochemical colocalization of TREK-1, TREK-2 and TRAAK with TRP channels in the trigeminal ganglion cells. *Neurosci Lett* 2009;454:129-133.
- 395- Yashpal K, Dam TV, Quirion R. Quantitative autoradiographic distribution of multiple neurokinin binding sites in rat spinal cord. *Brain Res* 1990;506:259-266.

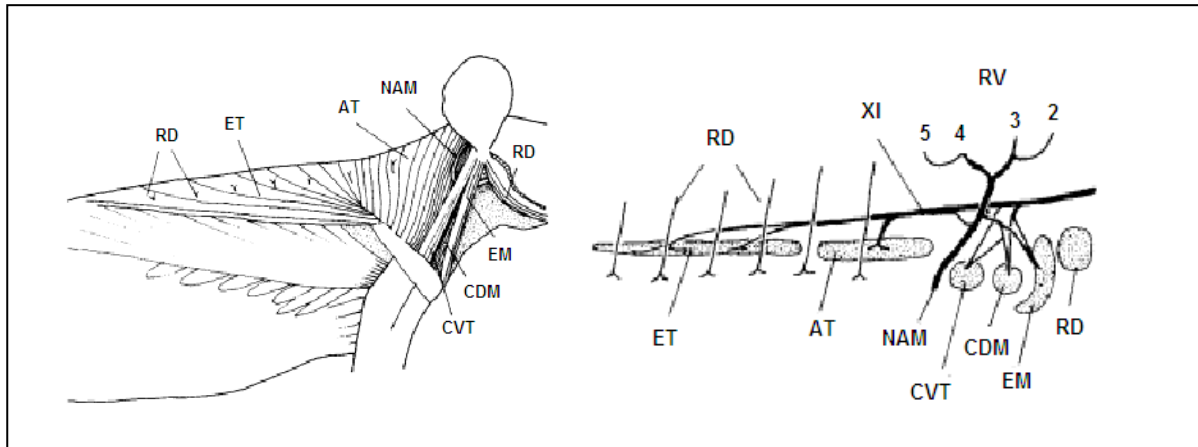
- 396- Yoshimasu F, Kurland LT, Elveback LR. Tic douloureux in Rochester, Minnesota, 1945-1969. *Neurol.* 1972;22:952-956.
- 397- Yuan RY, Sheu JJ, Yu JM, Chen WT, Tseng IJ, et al. Botulinum toxin for diabetic neuropathic pain: a randomized double-blind crossover trial. *Neurology* 2009;72:1473-1478.

8. ANEXOS

ANEXO 1 - CARACTERÍSTICAS DO ALIMENTO FORNECIDO AOS ANIMAIS

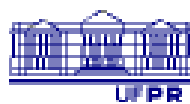
| | |
|--|-----------------|
| Marca: NUVILAB CR ₁ . | |
| Fabricado pela NUVITAL. | |
| Registro no Ministério de Agricultura e Reforma Agrária: PR – 58033-00103. | |
| | |
| | |
| <u>Composição Básica do Produto:</u> Carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e de aminoácidos, aditivos antioxidantes. | |
| | |
| | |
| <u>Níveis de Garantia:</u> | - Umidade (máx) |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| <u>Indicação:</u> Alimento equilibrado para camundongos e ratos de laboratório, baseado em recomendações do National Research Council e National Institute of Health – USA. | |
| | |
| <u>Vitaminas:</u> Vitamina A 12.000 UI; vitamina D3 1.800 UI; vitamina E 30,00mg; vitamina K3 3,00mg; vitamina B1 5,00mg; vitamina B2 6,00mg; vitamina B6 7,00mg; vitamina B12 20,00mcg; niacina 60,00mg; ácido pantotênico 20,00mg; ácido fólico 1,00mg; biotina 0,05mg, colina 600,00mg. | |
| | |
| <u>Microelementos:</u> Ferro 50,00mg; zinco 60,00mg; cobre 10,00mg; iodo 2,00mg; manganês 60,00mg; selênio 0,05mg; cobalto 1,50mg. | |
| | |
| | |
| <u>Aminoácidos:</u> DL-metionina 300,00mg; lisina 100,00mg. | |
| | |
| | |
| <u>Aditivos:</u> Antioxidantes 100,00mg. | |

ANEXO 2 - FORMAÇÃO DO MÚSCULO TRAPÉZIO, INSERÇÕES, ORIGENS, INERVAÇÃO SENSITIVA E MOTORA. NERVO ESPINHAL ACESSÓRIO (XI); RAMO DIGÁSTRICO (RD); RAMO VENTRAL (RV); MÚSCULO ESPINOTRAPÉZIO (ET); MÚSCULO ACROMIOTRAPÉZIO (AT); NERVO AURICULAR MAIOR (NAM); MÚSCULO ESTERNOMASTÓIDEO (EM); MÚSCULO CLEIDOMASTÓIDEO (CDM); MÚSCULO CLAVOTRAPÉZIO (CVT)



| Músculo | Origem | Inserção | Funções | Inervação sensitiva | Inervação motora |
|---------|---|--|--|---------------------|------------------|
| ET | Processo espinhal de T4 até L3 | Espinha proximal da escápula | Fixação da espinha da escápula. Levantar e baixa o membro ventralmente e dorsalmente | C2-C5 | XI |
| AT | Processo espinhal de C1 até T4 | Acrômio, processo espinhal da escápula | Fixação da espinha da escápula. Levantar e baixa o membro ventralmente e dorsalmente | C2-C5 | XI C2-C5 |
| CVT | Linha nucal superior, protuberância occipital externa | Bordo posterior da clavícula | Levanta e abaixa o membro ventralmente e dorsalmente. | C2-C5 | XI C2-C5 |
| EM | Manúbrio do externo | Porção mastóidea do osso temporal | Flexiona a cabeça e o pescoço lateralmente | C2-C5 | XI C2-C5 |
| CDM | Porção média da clavícula | Processo mastóideo, porção superior do osso occipital e temporal | Flexão da cabeça e do pescoço | C2-C5 | XI NAM |

ANEXO 3 - REGISTRO DA PESQUISA NO BANPESQ



Ministério de Educação
 UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 Sistema de Banco de Pesquisas

25-JUN-2008 14:3

Número da Pesquisa **2008023001**

Nome do Pesquisador
ELCIO JULIATO PIOVESAN

Local da Pesquisa
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

Área de Conhecimento
40101070 Neurologia

Tipo do Projeto
Tese de Doutorado

Data de Início
25/06/2008

Data da aprovação no Dept
25/06/2008

Nome do Orientador
LINEU CESAR WERNERCK

Fase atual da pesquisa
Projeto Novo

Horas semanais dedicadas
10

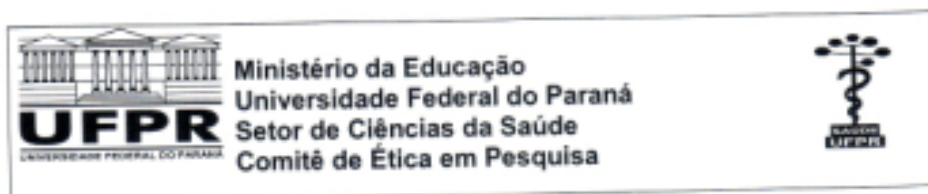
Data de inclusão no sistema
25/06/2008

Título
Efeito da Toxina Botulínica Tipo-A Sobre a Nodicepção Trigeminal

Ementa
 A Toxina botulínica é um potente inibidor dos receptores TRPV1, componentes fundamentais para a nocicepção. Estudamos 96 ratos submetidos ao bloqueio sobre o segundo ramo do trigêmeo em um estudo duplo cego com utilização de Toxina botulínica e soro fisiológico. Os animais serão avaliados com teste de formalina 2,5%, teste de abertura, teste da cruz elevada e teste campo claro e escuro.

Equipe de Colaboradores

ANEXO 4 - Carta de aprovação do estudo no Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde.



Curitiba, 24 de setembro de 2008.

Ilmo (a) Sr. (a)
Elcio Juliato Piovesan
Nesta

Prezado(a) Pesquisador(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Efeito da toxina botulínica tipo A sobre a nocicepção trigeminal**" está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 27 de agosto de 2008 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 24 de setembro de 2008.

Registro **CEP/SD**: AN.013.004.08.08

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 24/03/2009.

Atenciosamente

Prof. Dr. Liliansa Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

Prof. Dra. Liliansa Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa - SD/UFPR

ANEXO 5 - Peso no grupo NTBo-A, antes do Primeiro Tratamento (T=1), antes do Segundo Tratamento (T=2) e ao final do estudo (T=3). Valores em gramas.

| Subgrupos | Animal | T ₁ = 0 dias | T ₂ = 42 dias | T ₃ = 84 dias | T2-T1 | T3-T1 | T3-T2 |
|------------|--------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------|-------|-------|
| ● 24 horas | # 1 | 290 | 415 | 455 | 125 | 165 | 40 |
| | # 2 | 281 | 382 | 432 | 101 | 151 | 50 |
| | # 3 | 287 | 382 | 408 | 95 | 121 | 26 |
| | # 4 | 296 | 401 | 433 | 105 | 137 | 32 |
| | # 5 | 269 | 371 | 330 | 102 | 61 | -43 |
| | # 6 | 276 | 328 | 350 | 52 | 74 | 22 |
| | # 7 | 258 | 355 | 331 | 97 | 73 | -24 |
| | # 8 | 366 | 264 | 332 | -102 | -34 | 68 |
| ● 8 dias | # 1 | 318 | 311 | 326 | -7 | 8 | 15 |
| | # 2 | 280 | 345 | 319 | 65 | 39 | -26 |
| | # 3 | 278 | 390 | 364 | 112 | 86 | -26 |
| | # 4 | 320 | 419 | 442 | 99 | 122 | 23 |
| | # 5 | 270 | 293 | 325 | 23 | 55 | 32 |
| | # 6 | 275 | 357 | 364 | 82 | 89 | 7 |
| | # 7 | 245 | 343 | 387 | 98 | 142 | 44 |
| | # 8 | 256 | 320 | 362 | 64 | 106 | 42 |
| ● 15 dias | # 1 | 327 | 376 | 383 | 49 | 56 | 7 |
| | # 2 | 377 | 315 | 320 | -62 | -57 | 5 |
| | # 3 | 309 | 360 | 373 | 51 | 64 | 13 |
| | # 4 | 260 | 424 | 400 | 164 | 140 | -24 |
| | # 5 | 281 | 349 | 372 | 68 | 91 | 23 |
| | # 6 | 256 | 360 | 391 | 104 | 135 | 31 |
| | # 7 | 270 | 365 | 407 | 95 | 137 | 42 |
| | # 8 | 258 | 330 | 353 | 72 | 95 | 23 |
| ● 22 dias | # 1 | 297 | 346 | 483 | 49 | 86 | 37 |
| | # 2 | 252 | 393 | 435 | 141 | 183 | 42 |
| | # 3 | 298 | 435 | 385 | 137 | 87 | -50 |
| | # 4 | 328 | 401 | 419 | 73 | 91 | 18 |
| | # 5 | 253 | 328 | 350 | 75 | 97 | 22 |
| | # 6 | 253 | 315 | 355 | 62 | 102 | 40 |
| | # 7 | 267 | 341 | 333 | 74 | 66 | -8 |
| | # 8 | 272 | 324 | 338 | 52 | 66 | 14 |
| ● 29 dias | # 1 | 283 | 334 | 361 | 51 | 78 | 27 |
| | # 2 | 325 | 431 | 451 | 106 | 126 | 20 |
| | # 3 | 275 | 396 | 438 | 121 | 163 | 42 |
| | # 4 | 320 | 351 | 387 | 31 | 67 | 36 |
| | # 5 | 252 | 384 | 430 | 132 | 178 | 46 |
| | # 6 | 212 | 311 | 318 | 99 | 106 | 7 |
| | # 7 | 312 | 424 | 301 | 112 | -11 | -123 |
| | # 8 | 232 | 297 | 318 | 65 | 86 | 22 |
| ● 36 dias | # 1 | 279 | 314 | 330 | 35 | 51 | 16 |
| | # 2 | 371 | 267 | 278 | -104 | -93 | 11 |
| | # 3 | 257 | 311 | 336 | 54 | 79 | 25 |
| | # 4 | 269 | 406 | 446 | 137 | 177 | 40 |
| | # 5 | 287 | 350 | 340 | 63 | 53 | -10 |
| | # 6 | 247 | 315 | 353 | 68 | 106 | 38 |
| | # 7 | 189 | 283 | 320 | 94 | 131 | 37 |
| | # 8 | 235 | 297 | 331 | 62 | 96 | 34 |

ANEXO 6 - Peso no grupo SSI, antes do Primeiro Tratamento (T=1), antes do Segundo Tratamento (T=2) e ao final do estudo (T=3). Valores em gramas.

| Subgrupos | Animal | T ₁ = 0 dias | T ₂ = 42 dias | T ₃ = 84 dias | T ₂ -T ₁ | T ₃ -T ₁ | T ₃ -T ₂ |
|------------|--------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| ● 24 horas | # 1 | 287 | 374 | 435 | 87 | 148 | 61 |
| | # 2 | 315 | 398 | 446 | 83 | 131 | 48 |
| | # 3 | 302 | 413 | 486 | 111 | 184 | 73 |
| | # 4 | 234 | 323 | 361 | 89 | 127 | 38 |
| | # 5 | 264 | 400 | 355 | 136 | 91 | -45 |
| | # 6 | 253 | 323 | 315 | 70 | 62 | -8 |
| | # 7 | 263 | 303 | 370 | 40 | 107 | 67 |
| | # 8 | 237 | 348 | 400 | 111 | 163 | 52 |
| ● 8 dias | # 1 | 415 | 476 | 470 | 61 | 55 | -6 |
| | # 2 | 387 | 449 | 501 | 62 | 114 | 52 |
| | # 3 | 342 | 475 | 492 | 133 | 150 | 17 |
| | # 4 | 417 | 416 | 463 | -1 | 46 | 47 |
| | # 5 | 255 | 395 | 419 | 140 | 164 | 24 |
| | # 6 | 294 | 325 | 342 | 31 | 48 | 17 |
| | # 7 | 254 | 315 | 344 | 61 | 90 | 29 |
| | # 8 | 259 | 350 | 380 | 91 | 121 | 30 |
| ● 15 dias | # 1 | 368 | 424 | 435 | 56 | 67 | 11 |
| | # 2 | 378 | 436 | 498 | 58 | 120 | 62 |
| | # 3 | 395 | 476 | 457 | 81 | 62 | -19 |
| | # 4 | 298 | 355 | 379 | 57 | 81 | 24 |
| | # 5 | 200 | 378 | 324 | 178 | 124 | -54 |
| | # 6 | 237 | 318 | 347 | 81 | 110 | 29 |
| | # 7 | 258 | 338 | 372 | 80 | 124 | 34 |
| | # 8 | 278 | 371 | 409 | 93 | 131 | 38 |
| ● 22 dias | # 1 | 302 | 369 | 340 | 67 | 38 | -29 |
| | # 2 | 289 | 386 | 408 | 97 | 119 | 22 |
| | # 3 | 296 | 304 | 394 | 8 | 98 | 90 |
| | # 4 | 255 | 356 | 335 | 101 | 80 | -21 |
| | # 5 | 236 | 324 | 346 | 88 | 110 | 32 |
| | # 6 | 239 | 302 | 325 | 63 | 86 | 23 |
| | # 7 | 233 | 382 | 299 | 149 | 66 | -83 |
| | # 8 | 242 | 310 | 335 | 68 | 93 | 25 |
| ● 29 dias | # 1 | 291 | 360 | 386 | 69 | 95 | 26 |
| | # 2 | 312 | 342 | 382 | 30 | 70 | 40 |
| | # 3 | 290 | 369 | 416 | 79 | 126 | 47 |
| | # 4 | 302 | 367 | 342 | 65 | 40 | -25 |
| | # 5 | 245 | 308 | 323 | 63 | 78 | 15 |
| | # 6 | 263 | 349 | 335 | 86 | 72 | -14 |
| | # 7 | 238 | 315 | 350 | 77 | 112 | 35 |
| | # 8 | - | - | - | - | - | - |
| ● 36 dias | # 1 | 401 | 453 | 470 | 52 | 69 | 17 |
| | # 2 | 260 | 294 | 321 | 34 | 61 | 27 |
| | # 3 | 391 | 461 | 500 | 70 | 109 | 39 |
| | # 4 | 260 | 327 | 365 | 67 | 105 | 38 |
| | # 5 | 310 | 399 | 440 | 89 | 130 | 41 |
| | # 6 | 270 | 334 | 353 | 64 | 83 | 18 |
| | # 7 | 254 | 356 | 394 | 102 | 140 | 38 |
| | # 8 | 233 | 271 | 298 | 38 | 65 | 27 |

ANEXO 7 - PORCENTAGEM DE VARIAÇÃO DO GANHO DE PESO NOS DIFERENTES MOMENTOS DO ESTUDO GRUPO NTBo-A. ANTES DO PRIMEIRO TRATAMENTO (T=1), ANTES DO SEGUNDO TRATAMENTO (T=2) E AO FINAL DO ESTUDO (T=3). RESULTADOS EM GRAMAS E EM PORCENTAGENS (%).

| Subgrupos | Animal | T2-T1 | T3-T1 | T3-T2 | % T2-T1 | % T3-T1 | % T3-T2 |
|------------|--------|-------|-------|-------|---------|---------|---------|
| ● 24 horas | # 1 | 125 | 165 | 40 | 43 | 56,8 | 9,6 |
| | # 2 | 101 | 151 | 50 | 35,9 | 53,7 | 13 |
| | # 3 | 95 | 121 | 26 | 33,1 | 42,1 | 9,2 |
| | # 4 | 105 | 137 | 32 | 35,4 | 46,2 | 7,9 |
| | # 5 | 102 | 61 | -43 | 37,9 | 22,6 | -11,5 |
| | # 6 | 52 | 74 | 22 | 18,8 | 26,8 | 6,7 |
| | # 7 | 97 | 73 | -24 | 37,5 | 28,2 | 6,7 |
| | # 8 | -102 | -34 | 68 | -27,8 | -9,2 | 25,7 |
| ● 8 dias | # 1 | -7 | 8 | 15 | -2 | 2,5 | 4,8 |
| | # 2 | 65 | 39 | -26 | 23,2 | 13,9 | -7,5 |
| | # 3 | 112 | 86 | -26 | 40,2 | 30,9 | -6,6 |
| | # 4 | 99 | 122 | 23 | 30,9 | 38,1 | 5,4 |
| | # 5 | 23 | 55 | 32 | 8,5 | 20,3 | 10,9 |
| | # 6 | 82 | 89 | 7 | 29,8 | 32,3 | 1,9 |
| | # 7 | 98 | 142 | 44 | 40 | 57,9 | 12,8 |
| | # 8 | 64 | 106 | 42 | 25 | 41,4 | 13,1 |
| ● 15 dias | # 1 | 49 | 56 | 7 | 14,9 | 17,1 | 1,8 |
| | # 2 | -62 | -57 | 5 | -16,4 | -15,1 | 1,5 |
| | # 3 | 51 | 64 | 13 | 16,5 | 20,7 | 3,6 |
| | # 4 | 164 | 140 | -24 | 63 | 53,8 | -5,6 |
| | # 5 | 68 | 91 | 23 | 24,1 | 32,3 | 6,5 |
| | # 6 | 104 | 135 | 31 | 40,6 | 52,7 | 8,6 |
| | # 7 | 95 | 137 | 42 | 35,1 | 50,7 | 11,5 |
| | # 8 | 72 | 95 | 23 | 27,9 | 36,8 | 6,9 |
| ● 22 dias | # 1 | 49 | 86 | 37 | 16,4 | 28,9 | 10,6 |
| | # 2 | 141 | 183 | 42 | 55,9 | 72,6 | 10,6 |
| | # 3 | 137 | 87 | -50 | 45,9 | 29,1 | -11,4 |
| | # 4 | 73 | 91 | 18 | 22,2 | 27,7 | 4,4 |
| | # 5 | 75 | 97 | 22 | 29,6 | 38,3 | 6,7 |
| | # 6 | 62 | 102 | 40 | 24,5 | 40,3 | 12,6 |
| | # 7 | 74 | 66 | -8 | 27,7 | 24,7 | -2,3 |
| | # 8 | 52 | 66 | 14 | 19,1 | 24,2 | 4,3 |
| ● 29 dias | # 1 | 51 | 78 | 27 | 18 | 27,5 | 8 |
| | # 2 | 106 | 126 | 20 | 32,6 | 38,7 | 4,6 |
| | # 3 | 121 | 163 | 42 | 44 | 59,2 | 10,6 |
| | # 4 | 31 | 67 | 36 | 9,6 | 20,9 | 10,2 |
| | # 5 | 132 | 178 | 46 | 52,3 | 70,6 | 11,9 |
| | # 6 | 99 | 106 | 7 | 46,6 | 50 | 2,2 |
| | # 7 | 112 | -11 | -123 | 35,8 | -3,5 | -29 |
| | # 8 | 65 | 86 | 22 | 28 | 37 | 7,4 |
| ● 36 dias | # 1 | 35 | 51 | 16 | 12,5 | 18,2 | 5 |
| | # 2 | -104 | -93 | 11 | -28 | -25 | 4,1 |
| | # 3 | 54 | 79 | 25 | 21 | 30,7 | 8 |
| | # 4 | 137 | 177 | 40 | 50,9 | 65,7 | 9,8 |
| | # 5 | 63 | 53 | -10 | 21,9 | 18,4 | -2,8 |
| | # 6 | 68 | 106 | 38 | 27,5 | 42,9 | 12 |
| | # 7 | 94 | 131 | 37 | 49,7 | 69,3 | 13 |
| | # 8 | 62 | 96 | 34 | 26,3 | 40,8 | 11,4 |

ANEXO 8 - Porcentagem de variação de ganho de peso nos diferentes momentos do estudo Grupo SSI. Antes do Primeiro Tratamento (T=1), Antes do Segundo Tratamento (T=2) e ao final do estudo (T=3). Resultados em gramas e em porcentagens (%).

| Subgrupos | Animal | T2-T1 | T3-T1 | T3-T2 | % T2-T1 | % T3-T1 | % T3-T2 |
|------------|--------|-------|-------|-------|---------|---------|---------|
| ● 24 horas | # 1 | 87 | 148 | 61 | 30,3 | 51,5 | 16,3 |
| | # 2 | 83 | 131 | 48 | 26,3 | 41,5 | 17,6 |
| | # 3 | 111 | 184 | 73 | 36,7 | 60,9 | 11,7 |
| | # 4 | 89 | 127 | 38 | 38 | 54,2 | 11,7 |
| | # 5 | 136 | 91 | -45 | 51,5 | 34,4 | -11,2 |
| | # 6 | 70 | 62 | -8 | 27,6 | 24,5 | -2,4 |
| | # 7 | 40 | 107 | 67 | 15,2 | 40,6 | 22,1 |
| | # 8 | 111 | 163 | 52 | 46,8 | 68,7 | 14,9 |
| ● 8 dias | # 1 | 61 | 55 | -6 | 14,6 | 13,2 | -1,2 |
| | # 2 | 62 | 114 | 52 | 16 | 29,4 | 11,5 |
| | # 3 | 133 | 150 | 17 | 38,8 | 43,8 | 3,5 |
| | # 4 | -1 | 46 | 47 | -0,2 | 11 | 11,2 |
| | # 5 | 140 | 164 | 24 | 54,9 | 64,3 | 6 |
| | # 6 | 31 | 48 | 17 | 10,5 | 16,3 | 5,2 |
| | # 7 | 61 | 90 | 29 | 24 | 35,4 | 9,2 |
| | # 8 | 91 | 121 | 30 | 35,1 | 46,7 | 8,5 |
| ● 15 dias | # 1 | 56 | 67 | 11 | 15,2 | 18,2 | 2,5 |
| | # 2 | 58 | 120 | 62 | 15,3 | 31,7 | 14,2 |
| | # 3 | 81 | 62 | -19 | 20,5 | 15,6 | -3,9 |
| | # 4 | 57 | 81 | 24 | 19,1 | 27,1 | 6,7 |
| | # 5 | 178 | 124 | -54 | 89 | 62 | -14,2 |
| | # 6 | 81 | 110 | 29 | 34,1 | 46,4 | 9,1 |
| | # 7 | 80 | 124 | 34 | 31 | 48 | 10 |
| | # 8 | 93 | 131 | 38 | 33,4 | 47,1 | 10,2 |
| ● 22 dias | # 1 | 67 | 38 | -29 | 22,1 | 12,5 | -7,8 |
| | # 2 | 97 | 119 | 22 | 33,5 | 41,1 | 5,6 |
| | # 3 | 8 | 98 | 90 | 2,7 | 33,1 | 29,6 |
| | # 4 | 101 | 80 | -21 | 39,6 | 31,3 | -5,8 |
| | # 5 | 88 | 110 | 32 | 37,2 | 46,6 | 9,8 |
| | # 6 | 63 | 86 | 23 | 26,3 | 35,9 | 7,6 |
| | # 7 | 149 | 66 | -83 | 63,9 | 28,3 | -21,7 |
| | # 8 | 68 | 93 | 25 | 28 | 38,4 | 8 |
| ● 29 dias | # 1 | 69 | 95 | 26 | 23,7 | 32,6 | 7,2 |
| | # 2 | 30 | 70 | 40 | 9,6 | 22,4 | 11,6 |
| | # 3 | 79 | 126 | 47 | 27,2 | 43,4 | 12,7 |
| | # 4 | 65 | 40 | -25 | 21,5 | 13,2 | -6,8 |
| | # 5 | 63 | 78 | 15 | 25,7 | 31,8 | 4,8 |
| | # 6 | 86 | 72 | -14 | 32,6 | 27,3 | -4 |
| | # 7 | 77 | 112 | 35 | 32,3 | 47 | 11,1 |
| | # 8 | - | - | - | - | - | - |
| ● 36 dias | # 1 | 52 | 69 | 17 | 12,9 | 17,2 | 3,7 |
| | # 2 | 34 | 61 | 27 | 13 | 23,4 | 9,1 |
| | # 3 | 70 | 109 | 39 | 17,9 | 27,8 | 8,4 |
| | # 4 | 67 | 105 | 38 | 25,7 | 40,3 | 11,6 |
| | # 5 | 89 | 130 | 41 | 28,7 | 41,9 | 10,2 |
| | # 6 | 64 | 83 | 18 | 23,7 | 30,7 | 5,3 |
| | # 7 | 102 | 140 | 38 | 40,1 | 55,1 | 10,6 |
| | # 8 | 38 | 65 | 27 | 16,3 | 27,8 | 9,9 |

ANEXO 9 - Análise Descritiva e Comparativa do Peso Segundo os Diferentes Momentos. Neurotoxina Botulínica do Tipo-A (Grupo 1); Solução Salina Isotônica 0,9% (Grupo 2); Mínimo (Min.); Máximo (Max). † Mann-Whitney test. Significância utilizada $p < 0,05$. Valores apresentados em gramas.

| | Grupo | n | Média | Mediana | Min. | Max | Desvio Padrão | p [†] 1 versus 2 |
|--------------------------------|-------|----|--------|---------|-------|------|---------------|------------------------------|
| ● Peso Tempo "0 dias" (T1) | 1 | 48 | 278,50 | 275 | 189 | 377 | 35,21 | p=0,882 |
| | 2 | 47 | 289,40 | 270 | 200 | 417 | 55,57 | |
| ● Peso Tempo "42 dias" (T2) | 1 | 48 | 352,27 | 349,5 | 264 | 435 | 44,42 | p=0,315 |
| | 2 | 47 | 366,32 | 356 | 271 | 476 | 53,15 | |
| ● Peso Tempo "84 dias" (T3) | 1 | 48 | 370,72 | 361,5 | 278 | 483 | 48,25 | p=0,154 |
| | 2 | 47 | 388,44 | 379 | 298 | 501 | 58,82 | |
| ● % de ganho de peso T2-T1 | 1 | 48 | 27,18 | 27,95 | -28 | 63 | 18,79 | p=0,534 |
| | 2 | 47 | 28,25 | 26,3 | -0,20 | 89 | 15,71 | |
| ● % de ganho de peso T3-T1 | 1 | 48 | 33,34 | 32,3 | -25 | 72,6 | 21,33 | p=0,696 |
| | 2 | 47 | 35,77 | 34,4 | 11 | 68,7 | 14,55 | |
| ● % de ganho de peso T3-T2 | 1 | 48 | 5,39 | 6,8 | -29 | 25,7 | 8,56 | p=0,452 |
| | 2 | 47 | 6,38 | 8,5 | -21,7 | 29,6 | 9,22 | |

ANEXO 10 - VALOR EM UNIDADES DE NTBo-A E VOLUME DOS FÁRMACOS ADMINISTRADOS NOS SUBGRUPOS DOS GRUPOS NTBo-A E SSI (DURANTE O PRIMEIRO TRATAMENTO)

| Subgrupos | Animal | Unid/Botox | Vol/Botox (yl) | Vol/SSI (yl) |
|------------|--------|------------|----------------|--------------|
| ● 24 horas | 1 | 3,5 | 7 | 7 |
| | 2 | 3,4 | 6,8 | 7,5 |
| | 3 | 3,4 | 6,8 | 7,2 |
| | 4 | 3,5 | 7 | 5,6 |
| | 5 | 3,2 | 6,4 | 6,2 |
| | 6 | 3,3 | 6,6 | 6 |
| | 7 | 3,1 | 6,2 | 6,2 |
| | 8 | 4,3 | 8,6 | 5,6 |
| ● 8 dias | 1 | 3,8 | 7,6 | 10 |
| | 2 | 3,4 | 6,8 | 9,4 |
| | 3 | 3,4 | 6,8 | 8,2 |
| | 4 | 3,9 | 7,8 | 10 |
| | 5 | 3,2 | 6,4 | 6 |
| | 6 | 3,3 | 6,6 | 7 |
| | 7 | 3 | 6 | 6 |
| | 8 | 3,6 | 7,2 | 6,2 |
| ● 15 dias | 1 | 4 | 8 | 8,9 |
| | 2 | 4,5 | 9 | 9,1 |
| | 3 | 3,7 | 7,4 | 9,5 |
| | 4 | 3,1 | 6,2 | 7,2 |
| | 5 | 3,3 | 6,6 | 4,8 |
| | 6 | 3 | 6 | 5,6 |
| | 7 | 3,2 | 6,4 | 6 |
| | 8 | 3 | 6 | 6,6 |
| ● 22 dias | 1 | 3,6 | 7,2 | 7,3 |
| | 2 | 3 | 6 | 7 |
| | 3 | 3,6 | 7,2 | 7,1 |
| | 4 | 4 | 8 | 6,1 |
| | 5 | 3 | 6 | 5,6 |
| | 6 | 3 | 6 | 5,6 |
| | 7 | 3,2 | 6,4 | 5,4 |
| | 8 | 3,3 | 6,6 | 5,8 |
| ● 29 dias | 1 | 3,5 | 7 | 7 |
| | 2 | 3,9 | 7,8 | 7,5 |
| | 3 | 3,3 | 6,6 | 7 |
| | 4 | 3,8 | 7,6 | 7,3 |
| | 5 | 3 | 6 | 5,8 |
| | 6 | 2,5 | 5 | 6,2 |
| | 7 | 3,7 | 7,4 | 5,6 |
| | 8 | 2,7 | 5,4 | 5,4 |
| ● 36 dias | 1 | 3,4 | 6,8 | 9,6 |
| | 2 | 4,5 | 9 | 6,2 |
| | 3 | 3,1 | 6,2 | 9,3 |
| | 4 | 3,2 | 6,4 | 6,3 |
| | 5 | 3,4 | 6,8 | 7,6 |
| | 6 | 2,9 | 5,8 | 6,4 |
| | 7 | 2,2 | 4,4 | 6 |
| | 8 | 2,8 | 5,6 | 5,4 |

ANEXO 11 - VALOR EM UNIDADES DE NTBo-A E VOLUME DOS FÁRMACOS ADMINISTRADOS NOS SUBGRUPOS DOS GRUPOS NTBo-A E SSI (DURANTE O SEGUNDO TRATAMENTO)

| Subgrupos | Animal | Unid/Botox | Vol/Botox (µl) | Vol/SSI (µl) |
|------------------|---------------|-------------------|-----------------------|---------------------|
| ● 24 horas | 1 | 4,9 | 9,8 | 8,8 |
| | 2 | 4,5 | 9 | 9,4 |
| | 3 | 4,5 | 9 | 9,8 |
| | 4 | 4,8 | 9,6 | 7,6 |
| | 5 | 4,5 | 9 | 9,6 |
| | 6 | 4 | 8 | 7,8 |
| | 7 | 4,2 | 8,4 | 7,2 |
| | 8 | 3,2 | 6,4 | 8,4 |
| ● 8 dias | 1 | 3,7 | 7,4 | 11,4 |
| | 2 | 4,1 | 8,2 | 10,6 |
| | 3 | 4,7 | 9,3 | 11,4 |
| | 4 | 5 | 10 | 10 |
| | 5 | 3,5 | 7 | 9,6 |
| | 6 | 4,3 | 8,6 | 7,8 |
| | 7 | 4,2 | 8,4 | 7,6 |
| | 8 | 3,9 | 7,8 | 8,4 |
| ● 15 dias | 1 | 4,5 | 9 | 10,1 |
| | 2 | 3,8 | 7,6 | 10,4 |
| | 3 | 4,3 | 8,6 | 11,4 |
| | 4 | 5 | 10 | 8,4 |
| | 5 | 4,2 | 8,4 | 9,2 |
| | 6 | 4,4 | 8,8 | 7,6 |
| | 7 | 4,4 | 8,8 | 8 |
| | 8 | 4 | 8 | 9 |
| ● 22 dias | 1 | 4,1 | 8,2 | 8,8 |
| | 2 | 4,7 | 9,4 | 9,2 |
| | 3 | 5,2 | 10,4 | 7,2 |
| | 4 | 4,8 | 9,6 | 8,4 |
| | 5 | 4 | 8 | 7,8 |
| | 6 | 3,8 | 7,6 | 7,2 |
| | 7 | 4 | 8 | 9,2 |
| | 8 | 3,9 | 7,8 | 7,6 |
| ● 29 dias | 1 | 4 | 8 | 8,6 |
| | 2 | 5,1 | 10,2 | 8,2 |
| | 3 | 4,7 | 9,4 | 8,8 |
| | 4 | 4,2 | 8,4 | 8,8 |
| | 5 | 4,6 | 9,2 | 7,4 |
| | 6 | 3,8 | 7,6 | 8,4 |
| | 7 | 5 | 10 | 7,6 |
| | 8 | 3,6 | 7,2 | |
| ● 36 dias | 1 | 3,7 | 7,4 | 10,8 |
| | 2 | 3,2 | 6,4 | 7 |
| | 3 | 3,7 | 7,4 | 11 |
| | 4 | 4,8 | 9,6 | 7,8 |
| | 5 | 4,2 | 8,4 | 9,6 |
| | 6 | 3,8 | 7,6 | 8 |
| | 7 | 3,4 | 6,8 | 8,6 |
| | 8 | 3,6 | 7,2 | 6,6 |

ANEXO 12 - - ANÁLISE ESTATÍSTICA DESCRITIVA E COMPARATIVA DO NÚMERO DE UNIDADES E VOLUME APLICADOS NOS DIFERENTES GRUPOS E SUBGRUPOS DO ESTUDO. NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A (GRUPO 1); SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9% (GRUPO 2); MÍNIMO (MIN.); MÁXIMO (MAX). † MANN-WHITNEY TEST. SIGNIFICÂNCIA UTILIZADA $P < 0,05$. VALORES EM UNIDADES E EM μL .

| | Grupo | n | Média | Mediana | Min. | Max | Desvio Padrão | p [†] 1 versus 2 |
|-----------------------------------|-------|----|-------|---------|------|------|---------------|------------------------------|
| ● Unidades no Primeiro Tratamento | 1 | 48 | 3,36 | 3,30 | 2,2 | 4,5 | 0,46 | - |
| | 2 | 47 | - | - | - | - | - | - |
| ● Unidades no Segundo Tratamento | 1 | 48 | 4,21 | 4,20 | 3,2 | 5,2 | 0,51 | - |
| | 2 | 47 | - | - | - | - | - | - |
| ● Volume no Primeiro Tratamento | 1 | 48 | 6,73 | 6,60 | 4,4 | 9 | 0,92 | 0,831 |
| | 2 | 47 | 6,91 | 6,40 | 4,8 | 10 | 1,37 | |
| ● Volume no Segundo Tratamento | 1 | 48 | 8,43 | 8,40 | 6,4 | 10,4 | 1,02 | 0,321 |
| | 2 | 47 | 8,76 | 8,60 | 6,6 | 11,4 | 1,26 | |

ANEXO 13 - Resultados do Teste do Campo Aberto para o grupo NTBo-A, após o Primeiro Tratamento. Latência e tempo de imobilidade em segundos, Número de Casas andadas e Número de Levantamentos em unidades.

| Subgrupos | Animal | Latência | N. Casas | Levantamentos | Imobilidade |
|------------|--------|----------|----------|---------------|-------------|
| ● 24 horas | 1 | 5 | 48 | 7 | 204 |
| | 2 | 4 | 121 | 31 | 103 |
| | 3 | 41 | 97 | 17 | 102 |
| | 4 | 29 | 67 | 16 | 115 |
| | 5 | 17 | 79 | 10 | 114 |
| | 6 | 11 | 13 | 10 | 192 |
| | 7 | 39 | 112 | 14 | 42 |
| | 8 | 19 | 45 | 16 | 60 |
| ● 8 dias | 1 | 23 | 14 | 6 | 241 |
| | 2 | 2 | 77 | 28 | 87 |
| | 3 | 2 | 82 | 21 | 150 |
| | 4 | 1 | 60 | 34 | 133 |
| | 5 | 1 | 124 | 33 | 189 |
| | 6 | 3 | 120 | 14 | 180 |
| | 7 | 2 | 52 | 13 | 253 |
| | 8 | 2 | 78 | 30 | 228 |
| ● 15dias | 1 | 0 | 69 | 20 | 266 |
| | 2 | 2 | 106 | 45 | 36 |
| | 3 | 48 | 32 | 8 | 154 |
| | 4 | 3 | 6 | 4 | 262 |
| | 5 | 2 | 4 | 1 | 240 |
| | 6 | 300 | 0 | 0 | 147 |
| | 7 | 8 | 105 | 31 | 12 |
| | 8 | 15 | 1 | 3 | 258 |
| ● 22 dias | 1 | 3 | 19 | 4 | 185 |
| | 2 | 0 | 70 | 5 | 149 |
| | 3 | 0 | 83 | 21 | 64 |
| | 4 | 2 | 93 | 24 | 69 |
| | 5 | 2 | 49 | 6 | 124 |
| | 6 | 0 | 108 | 30 | 210 |
| | 7 | 3 | 139 | 43 | 195 |
| | 8 | 0 | 49 | 239 | 9 |
| ● 29 dias | 1 | 28 | 61 | 14 | 118 |
| | 2 | 1 | 54 | 7 | 108 |
| | 3 | 5 | 47 | 25 | 117 |
| | 4 | 1 | 81 | 19 | 51 |
| | 5 | 24 | 42 | 13 | 183 |
| | 6 | 27 | 24 | 5 | 151 |
| | 7 | 2 | 72 | 11 | 37 |
| | 8 | 68 | 1 | 2 | 170 |
| ● 36 dias | 1 | 22 | 15 | 9 | 211 |
| | 2 | 1 | 52 | 20 | 56 |
| | 3 | 1 | 39 | 15 | 129 |
| | 4 | 300 | 0 | 0 | 300 |
| | 5 | 0 | 93 | 9 | 229 |
| | 6 | 30 | 49 | 12 | 250 |
| | 7 | 2 | 28 | 29 | 269 |
| | 8 | 2 | 60 | 26 | 242 |

ANEXO 14 - RESULTADOS DO TESTE DO CAMPO ABERTO PARA O GRUPO SSI, APÓS O PRIMEIRO TRATAMENTO. LATÊNCIA E TEMPO DE IMOBILIDADE EM SEGUNDOS, NÚMERO DE CASAS ANDADAS E NÚMERO DE LEVANTAMENTOS EM UNIDADES

| Subgrupos | Animal | Latência | N. Casas | Levantamentos | Imobilidade |
|------------|--------|----------|----------|---------------|-------------|
| • 24 horas | 1 | 9 | 50 | 13 | 170 |
| | 2 | 1 | 96 | 18 | 104 |
| | 3 | 1 | 91 | 47 | 66 |
| | 4 | 2 | 89 | 42 | 64 |
| | 5 | 2 | 112 | 16 | 31 |
| | 6 | 33 | 45 | 13 | 129 |
| | 7 | 2 | 50 | 29 | 11 |
| | 8 | 1 | 65 | 19 | 60 |
| • 8 dias | 1 | 4 | 42 | 7 | 187 |
| | 2 | 1 | 61 | 19 | 124 |
| | 3 | 1 | 57 | 28 | 162 |
| | 4 | 2 | 35 | 13 | 156 |
| | 5 | 1 | 128 | 25 | 115 |
| | 6 | 0 | 108 | 45 | 191 |
| | 7 | 3 | 22 | 68 | 232 |
| | 8 | 1 | 78 | 11 | 210 |
| • 15 dias | 1 | 0 | 63 | 39 | 58 |
| | 2 | 0 | 53 | 12 | 170 |
| | 3 | 46 | 55 | 3 | 173 |
| | 4 | 0 | 75 | 20 | 176 |
| | 5 | 2 | 35 | 16 | 67 |
| | 6 | 6 | 145 | 38 | 9 |
| | 7 | 3 | 145 | 20 | 16 |
| | 8 | 0 | 68 | 12 | 142 |
| • 22 dias | 1 | 95 | 43 | 4 | 200 |
| | 2 | 3 | 60 | 5 | 113 |
| | 3 | 10 | 69 | 21 | 111 |
| | 4 | 2 | 39 | 24 | 132 |
| | 5 | 1 | 101 | 30 | 208 |
| | 6 | 4 | 59 | 18 | 204 |
| | 7 | 4 | 93 | 31 | 200 |
| | 8 | 8 | 93 | 19 | 204 |
| • 29 dias | 1 | 78 | 57 | 2 | 157 |
| | 2 | 2 | 75 | 20 | 89 |
| | 3 | 5 | 28 | 8 | 188 |
| | 4 | 9 | 11 | 4 | 257 |
| | 5 | 4 | 39 | 10 | 94 |
| | 6 | 3 | 38 | 12 | 80 |
| | 7 | 0 | 62 | 19 | 45 |
| | 8 | - | - | - | - |
| • 36 dias | 1 | 5 | 95 | 21 | 49 |
| | 2 | 2 | 147 | 33 | 15 |
| | 3 | 1 | 135 | 30 | 32 |
| | 4 | 1 | 50 | 10 | 75 |
| | 5 | 18 | 6 | 0 | 291 |
| | 6 | 2 | 2 | 17 | 237 |
| | 7 | 2 | 51 | 15 | 256 |
| | 8 | 1 | 41 | 41 | 244 |

ANEXO 15 - RESULTADOS DO TESTE DO CAMPO ABERTO PARA O GRUPO NTBo-A, APÓS O SEGUNDO TRATAMENTO. LATÊNCIA E TEMPO DE IMOBILIDADE EM SEGUNDOS, NÚMERO DE CASAS ANDADAS E NÚMERO DE LEVANTAMENTOS EM UNIDADES

| Subgrupos | Animal | Latência | N. Casas | Levantamentos | Imobilidade |
|------------|--------|----------|----------|---------------|-------------|
| • 24 horas | 1 | 1 | 10 | 0 | 249 |
| | 2 | 0 | 10 | 4 | 237 |
| | 3 | 4 | 27 | 4 | 211 |
| | 4 | 270 | 10 | 1 | 247 |
| | 5 | 1 | 18 | 7 | 216 |
| | 6 | 2 | 5 | 1 | 261 |
| | 7 | 8 | 7 | 1 | 269 |
| | 8 | 14 | 39 | 5 | 131 |
| • 8 dias | 1 | 10 | 26 | 5 | 225 |
| | 2 | 2 | 2 | 1 | 9 |
| | 3 | 1 | 25 | 5 | 227 |
| | 4 | 4 | 8 | 1 | 279 |
| | 5 | 25 | 13 | 1 | 256 |
| | 6 | 30 | 9 | 4 | 57 |
| | 7 | 1 | 19 | 12 | 174 |
| | 8 | 13 | 42 | 19 | 8 |
| • 15 dias | 1 | 2 | 48 | 4 | 268 |
| | 2 | 24 | 2 | 0 | 285 |
| | 3 | 9 | 6 | 5 | 245 |
| | 4 | 0 | 46 | 25 | 86 |
| | 5 | 3 | 5 | 0 | 271 |
| | 6 | 300 | 0 | 0 | 276 |
| | 7 | 29 | 17 | 0 | 212 |
| | 8 | 300 | 0 | 0 | 291 |
| • 22 dias | 1 | 0 | 8 | 0 | 270 |
| | 2 | 0 | 26 | 11 | 240 |
| | 3 | 2 | 12 | 2 | 272 |
| | 4 | 2 | 27 | 9 | 252 |
| | 5 | 1 | 49 | 9 | 151 |
| | 6 | 1 | 26 | 6 | 279 |
| | 7 | 3 | 46 | 7 | 264 |
| | 8 | 2 | 11 | 11 | 286 |
| • 29 dias | 1 | 11 | 11 | 4 | 241 |
| | 2 | 5 | 5 | 1 | 271 |
| | 3 | 1 | 9 | 5 | 204 |
| | 4 | 5 | 4 | 1 | 266 |
| | 5 | 4 | 5 | 0 | 290 |
| | 6 | 11 | 4 | 1 | 285 |
| | 7 | 10 | 26 | 6 | 283 |
| | 8 | 300 | 0 | 0 | 300 |
| • 36 dias | 1 | 7 | 7 | 4 | 280 |
| | 2 | 3 | 29 | 14 | 262 |
| | 3 | 300 | 0 | 0 | 300 |
| | 4 | 0 | 49 | 14 | 245 |
| | 5 | 16 | 97 | 1 | 62 |
| | 6 | 12 | 6 | 0 | 292 |
| | 7 | 10 | 15 | 3 | 194 |
| | 8 | 6 | 26 | 4 | 276 |

ANEXO 16 - RESULTADOS DO TESTE DO CAMPO ABERTO PARA O GRUPO SSI, APÓS O PRIMEIRO TRATAMENTO. LATÊNCIA E TEMPO DE IMOBILIDADE EM SEGUNDOS, NÚMERO DE CASAS ANDADAS E NÚMERO DE LEVANTAMENTOS EM UNIDA

| Subgrupos | Animal | Latência | N. Casas | Levantamentos | Imobilidade |
|------------|--------|----------|----------|---------------|-------------|
| • 24 horas | 1 | 6 | 6 | 1 | 276 |
| | 2 | 2 | 67 | 7 | 141 |
| | 3 | 4 | 10 | 2 | 242 |
| | 4 | 4 | 20 | 5 | 192 |
| | 5 | 9 | 5 | 0 | 225 |
| | 6 | 5 | 8 | 1 | 240 |
| | 7 | 10 | 5 | 2 | 253 |
| | 8 | 2 | 15 | 4 | 162 |
| • 8 dias | 1 | 14 | 4 | 2 | 280 |
| | 2 | 3 | 4 | 5 | 219 |
| | 3 | 2 | 26 | 4 | 128 |
| | 4 | 0 | 14 | 6 | 256 |
| | 5 | 6 | 11 | 3 | 135 |
| | 6 | 7 | 23 | 14 | 39 |
| | 7 | 1 | 98 | 23 | 61 |
| | 8 | 1 | 6 | 0 | 260 |
| • 15 dias | 1 | 1 | 26 | 13 | 131 |
| | 2 | 0 | 19 | 6 | 221 |
| | 3 | 2 | 3 | 3 | 116 |
| | 4 | 7 | 4 | 0 | 248 |
| | 5 | 86 | 9 | 2 | 236 |
| | 6 | 4 | 16 | 2 | 132 |
| | 7 | 10 | 2 | 2 | 264 |
| | 8 | 2 | 2 | 2 | 271 |
| • 22 dias | 1 | 16 | 7 | 2 | 283 |
| | 2 | 1 | 5 | 0 | 285 |
| | 3 | 18 | 4 | 1 | 290 |
| | 4 | 23 | 14 | 9 | 278 |
| | 5 | 2 | 25 | 10 | 279 |
| | 6 | 1 | 19 | 8 | 276 |
| | 7 | 2 | 40 | 18 | 258 |
| | 8 | 2 | 21 | 2 | 272 |
| • 29 dias | 1 | 9 | 8 | 0 | 266 |
| | 2 | 119 | 46 | 15 | 50 |
| | 3 | 12 | 8 | 2 | 227 |
| | 4 | 13 | 13 | 1 | 187 |
| | 5 | 9 | 22 | 4 | 264 |
| | 6 | 4 | 3 | 2 | 277 |
| | 7 | 7 | 17 | 4 | 200 |
| | 8 | - | - | - | - |
| • 36 dias | 1 | 0 | 21 | 8 | 273 |
| | 2 | 0 | 78 | 30 | 208 |
| | 3 | 0 | 47 | 5 | 225 |
| | 4 | 10 | 2 | 0 | 279 |
| | 5 | 300 | 0 | 0 | 283 |
| | 6 | 1 | 25 | 1 | 284 |
| | 7 | 12 | 12 | 6 | 206 |
| | 8 | 134 | 15 | 7 | 148 |

ANEXO 17: ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA PARA O TESTE DO CAMPO ABERTO - LATÊNCIA APÓS O PRIMEIRO BLOQUEIO NOS DIFERENTES GRUPOS E SUBGRUPOS. NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A (GRUPO 1); SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9% (GRUPO 2); MÍNIMO (MIN.); MÁXIMO (MAX). † T-STUDENT TESTE, ‡ MANN-WHITNEY TESTE. SIGNIFICÂNCIA UTILIZADA $P < 0,05$. VALORES APRESENTADOS EM SEGUNDOS.

| | Grupo | n | Média | Desvio Padrão | Mediana | Min. | Max | $p^{\dagger, \ddagger}$ 1 versus 2 |
|------------|-------|---|-------|---------------|---------|------|-----|---------------------------------------|
| ● 24 horas | 1 | 8 | 20,63 | 14,40 | 18 | 4 | 41 | † $p=0,044$ † |
| | 2 | 8 | 6,38 | 11,08 | 2 | 1 | 33 | |
| ● 8 dias | 1 | 8 | 4,50 | 7,50 | 2 | 1 | 23 | † $p=0,304$ † |
| | 2 | 8 | 1,63 | 1,30 | 1 | 0 | 4 | |
| ● 15 dias | 1 | 8 | 47,25 | 103,33 | 5,50 | 0 | 300 | † $p=0,296$ † |
| | 2 | 8 | 7,13 | 15,85 | 1 | 0 | 46 | |
| ● 22 dias | 1 | 8 | 1,25 | 1,38 | 1 | 0 | 3 | † $p=0,219$ † |
| | 2 | 8 | 15,88 | 32,11 | 4 | 1 | 95 | |
| ● 29 dias | 1 | 8 | 12,57 | 12,99 | 5 | 1 | 28 | † $p=0,682$ ‡ |
| | 2 | 7 | 14,43 | 28,17 | 4 | 0 | 78 | |
| ● 36 dias | 1 | 8 | 44,75 | 103,76 | 2 | 0 | 300 | † $p=0,667$ † |
| | 2 | 8 | 4 | 5,80 | 2 | 1 | 18 | |

ANEXO 18 - ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA PARA O TESTE DO CAMPO ABERTO - LATÊNCIA APÓS O SEGUNDO BLOQUEIO NOS DIFERENTES GRUPOS E SUBGRUPOS. NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A (GRUPO 1); SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9% (GRUPO 2); MÍNIMO (MIN.); MÁXIMO (MAX). † T-STUDENT TESTE, ‡ MANN-WHITNEY TESTE. SIGNIFICÂNCIA UTILIZADA $P < 0,05$. VALORES APRESENTADOS EM SEGUNDOS.

| | Grupo | n | Média | Desvio Padrão | Mediana | Min. | Max | $p^{\dagger, \ddagger}$ 1 versus 2 |
|------------|-------|---|-------|---------------|---------|------|-----|---------------------------------------|
| ● 24 horas | 1 | 8 | 37,5 | 94,06 | 3 | 0 | 270 | $p=0,349^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 5,25 | 2,96 | 4,5 | 2 | 10 | |
| ● 8 dias | 1 | 8 | 10,75 | 11,28 | 7 | 1 | 30 | $p=0,154^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 4,25 | 4,65 | 2,5 | 0 | 14 | |
| ● 15 dias | 1 | 8 | 83,38 | 134,11 | 16,5 | 0 | 300 | $p=0,175^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 14 | 29,28 | 3 | 0 | 86 | |
| ● 22 dias | 1 | 8 | 1,38 | 1,06 | 1,50 | 0 | 3 | $p=0,059^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 8,13 | 9,21 | 2 | 1 | 23 | |
| ● 29 dias | 1 | 8 | 43,38 | 103,75 | 7,50 | 1 | 300 | $p=0,664^{\ddagger}$ |
| | 2 | 7 | 24,71 | 41,68 | 9 | 4 | 119 | |
| ● 36 dias | 1 | 8 | 44,25 | 103,46 | 8,5 | 0 | 300 | $p=0,811^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 57,13 | 108,29 | 5,50 | 0 | 300 | |

ANEXO 19 - ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA PARA O TESTE DO CAMPO ABERTO - LATÊNCIA APÓS O SEGUNDO BLOQUEIO NOS DIFERENTES GRUPOS E SUBGRUPOS. NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A (GRUPO 1); SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9% (GRUPO 2); MÍNIMO (MIN.); MÁXIMO (MAX). † T-STUDENT TESTE, ‡ MANN-WHITNEY TESTE. SIGNIFICÂNCIA UTILIZADA $P < 0,05$. VALORES APRESENTADOS EM SEGUNDOS.

| | Grupo | N | Média | Desvio Padrão | Mediana | Min. | Max | $p^{\dagger, \ddagger}$ 1 versus 2 |
|------------|-------|---|-------|---------------|---------|------|-----|---------------------------------------|
| ● 24 horas | 1 | 8 | 72,75 | 36,80 | 73 | 13 | 121 | $p = 0,901^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 74,75 | 25,38 | 77 | 45 | 112 | |
| ● 8 dias | 1 | 8 | 75,88 | 35,77 | 77,5 | 14 | 124 | $p = 0,607^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 66,38 | 36,50 | 59 | 22 | 128 | |
| ● 15 dias | 1 | 8 | 40,38 | 46,38 | 19 | 0 | 106 | $p = 0,096^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 79,88 | 41,89 | 65,5 | 35 | 145 | |
| ● 22 dias | 1 | 8 | 76,25 | 37,93 | 76,5 | 19 | 139 | $p = 0,176^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 69,63 | 23,69 | 64,5 | 39 | 101 | |
| ● 29 dias | 1 | 7 | 54,43 | 19,12 | 54 | 24 | 81 | $p = 0,779^{\ddagger}$ |
| | 2 | 7 | 44,29 | 21,83 | 39 | 11 | 75 | |
| ● 36 dias | 1 | 8 | 42 | 28,71 | 44 | 0 | 93 | $p = 0,293^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 65,88 | 54,72 | 50,50 | 2 | 147 | |

ANEXO 20 ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA PARA O TESTE DO CAMPO ABERTO – NÚMERO DE CASAS ANDADAS APÓS O SEGUNDO BLOQUEIO NOS DIFERENTES GRUPOS E SUBGRUPOS. NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A (GRUPO 1); SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9% (GRUPO 2); MÍNIMO (MIN.); MÁXIMO (MAX). [†] T-STUDENT TESTE, [‡] MANN-WHITNEY TESTE. SIGNIFICÂNCIA UTILIZADA $P < 0,05$. VALORES APRESENTADOS EM UNIDADES.

| | Grupo | N | Média | Desvio Padrão | Mediana | Min. | Max | $p^{\dagger, \ddagger}$ 1 versus 2 |
|------------|-------|---|-------|---------------|---------|------|-----|---------------------------------------|
| ● 24 horas | 1 | 8 | 15,75 | 11,73 | 10 | 5 | 39 | $p = 0,885^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 17 | 20,88 | 9 | 5 | 67 | |
| ● 8 dias | 1 | 8 | 18 | 12,82 | 16 | 2 | 42 | $p = 0,668^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 23,25 | 31,32 | 12,50 | 4 | 98 | |
| ● 15 dias | 1 | 8 | 15,5 | 20,18 | 5,50 | 0 | 48 | $p = 0,504^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 10,13 | 9,15 | 6,50 | 2 | 26 | |
| ● 22 dias | 1 | 8 | 23,63 | 15,46 | 26 | 8 | 49 | $p = 0,229^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 16,88 | 12,15 | 16,50 | 4 | 40 | |
| ● 29 dias | 1 | 8 | 8 | 8 | 5 | 0 | 26 | $p = 0,163^{\ddagger}$ |
| | 2 | 7 | 16,71 | 14,37 | 13 | 3 | 46 | |
| ● 36 dias | 1 | 8 | 28,63 | 31,80 | 20,50 | 0 | 97 | $p = 0,807^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 25 | 26 | 18 | 0 | 78 | |

ANEXO 21 - ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA PARA O TESTE DO CAMPO ABERTO – NÚMERO DE LEVANTAMENTOS APÓS O PRIMEIRO BLOQUEIO NOS DIFERENTES GRUPOS E SUBGRUPOS. NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A (GRUPO 1); SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9% (GRUPO 2); MÍNIMO (MIN.); MÁXIMO (MAX). † T-STUDENT TESTE, ‡ MANN-WHITNEY TESTE. SIGNIFICÂNCIA UTILIZADA $P < 0,05$. VALORES APRESENTADOS EM UNIDADES

| | Grupo | n | Média | Desvio Padrão | Mediana | Min. | Max | $p^{\dagger, \ddagger}$ 1 versus 2 |
|------------|-------|---|-------|---------------|---------|------|-----|---------------------------------------|
| ● 24 horas | 1 | 8 | 15,13 | 7,33 | 15 | 7 | 31 | $p=0,099^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 24,63 | 13,32 | 18,5 | 13 | 47 | |
| ● 8 dias | 1 | 8 | 22,38 | 10,46 | 24,5 | 6 | 34 | $p=0,578^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 27 | 20,44 | 22 | 7 | 68 | |
| ● 15 dias | 1 | 8 | 14 | 16,51 | 6 | 0 | 45 | $p=0,428^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 20 | 12,63 | 18 | 3 | 39 | |
| ● 22 dias | 1 | 8 | 46,50 | 78,98 | 22,5 | 4 | 239 | $p=0,954^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 19,00 | 10,11 | 20 | 4 | 31 | |
| ● 29 dias | 1 | 8 | 13,43 | 6,87 | 13 | 5 | 25 | $p=0,779^{\ddagger}$ |
| | 2 | 7 | 10,71 | 6,89 | 10 | 2 | 20 | |
| ● 36 dias | 1 | 8 | 15 | 9,62 | 13,50 | 0 | 29 | $p=0,329^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 20,88 | 13,30 | 19 | 0 | 41 | |

ANEXO 22- Análise Descritiva e Comparativa para o Teste do Campo Aberto – Número de Levantamentos após o Segundo Bloqueio nos Diferentes Grupos e Subgrupos.

NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A (GRUPO 1); SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9% (GRUPO 2); MÍNIMO (MIN.); MÁXIMO (MAX). † T-STUDENT TESTE, ‡ MANN-WHITNEY TESTE. SIGNIFICÂNCIA UTILIZADA P<0,05. VALORES APRESENTADOS EM UNIDADES

| | Grupo | n | Média | Desvio Padrão | Mediana | Min. | Max | p^{†,‡} 1 versus 2 |
|------------|--------------|----------|--------------|----------------------|----------------|-------------|------------|---------------------------------------|
| ● 24 horas | 1 | 8 | 2,81 | 2,47 | 2,50 | 0 | 7 | p= 0,919 [†] |
| | 2 | 8 | 2,75 | 2,37 | 2 | 0 | 7 | |
| ● 8 dias | 1 | 8 | 6 | 6,39 | 4,50 | 1 | 19 | p=0,754 [†] |
| | 2 | 8 | 7,13 | 7,64 | 4,50 | 0 | 23 | |
| ● 15 dias | 1 | 8 | 4,25 | 8,63 | 4 | 0 | 25 | p=0,884 [†] |
| | 2 | 8 | 3,75 | 4,09 | 3 | 0 | 13 | |
| ● 22 dias | 1 | 8 | 6,88 | 4,05 | 8 | 0 | 11 | p=0,814 [†] |
| | 2 | 8 | 6,25 | 6,15 | 5 | 0 | 18 | |
| ● 29 dias | 1 | 8 | 2,25 | 2,37 | 1 | 0 | 6 | p=0,397 [‡] |
| | 2 | 7 | 4 | 5,06 | 2 | 0 | 15 | |
| ● 36 dias | 1 | 8 | 5 | 5,78 | 3,50 | 0 | 14 | p=0,835 [†] |
| | 2 | 8 | 7,13 | 9,77 | 5,50 | 0 | 30 | |

ANEXO 23:- ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA PARA O TESTE DO CAMPO ABERTO – TEMPO DE IMOBILIDADE APÓS O PRIMEIRO BLOQUEIO NOS DIFERENTES GRUPOS E SUBGRUPOS. NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A (GRUPO 1); SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9% (GRUPO 2); MÍNIMO (MIN.); MÁXIMO (MAX). † T-STUDENT TESTE, ‡ MANN-WHITNEY TESTE. SIGNIFICÂNCIA UTILIZADA P<0,05. VALORES APRESENTADOS EM SEGUNDOS

| | Grupo | N | Média | Desvio Padrão | Mediana | Min. | Max | p ^{†‡} 1 versus 2 |
|------------|-------|---|--------|---------------|---------|------|-----|-------------------------------|
| ● 24 horas | 1 | 8 | 116,50 | 56,69 | 108,5 | 42 | 204 | p=0,195 [†] |
| | 2 | 8 | 79,38 | 52,21 | 65 | 11 | 170 | |
| ● 8 dias | 1 | 8 | 182,63 | 57,49 | 184,5 | 87 | 253 | p=0,680 [†] |
| | 2 | 8 | 172,13 | 40,60 | 174,5 | 115 | 232 | |
| ● 15 dias | 1 | 8 | 171,88 | 102,81 | 197 | 12 | 266 | p=0,134 [†] |
| | 2 | 8 | 101,38 | 71,65 | 104,5 | 9 | 176 | |
| ● 22 dias | 1 | 8 | 125,63 | 72,32 | 136,5 | 9 | 210 | p=0,148 [†] |
| | 2 | 8 | 171,50 | 44,25 | 200 | 111 | 208 | |
| ● 29 dias | 1 | 8 | 109,29 | 51,53 | 117 | 37 | 183 | p=0,955 [‡] |
| | 2 | 7 | 130 | 74,07 | 94 | 45 | 257 | |
| ● 36 dias | 1 | 8 | 210,75 | 80,03 | 235,5 | 56 | 300 | p=0,244 [†] |
| | 2 | 8 | 149,88 | 116,80 | 156 | 15 | 291 | |

ANEXO 24- ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA PARA O TESTE DO CAMPO ABERTO – TEMPO DE IMOBILIDADE APÓS O SEGUNDO BLOQUEIO NOS DIFERENTES GRUPOS E SUBGRUPOS. NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A (GRUPO 1); SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9% (GRUPO 2); MÍNIMO (MIN.); MÁXIMO (MAX). † T-STUDENT TESTE, ‡ MANN-WHITNEY TESTE. SIGNIFICÂNCIA UTILIZADA $p < 0,05$. VALORES APRESENTADOS EM SEGUNDOS.

| | Grupo | N | Média | Desvio Padrão | Mediana | Min. | Max | $p^{\dagger, \ddagger}$ 1 versus 2 |
|------------|-------|---|--------|---------------|---------|------|-----|---------------------------------------|
| ● 24 horas | 1 | 8 | 227,63 | 43,90 | 242 | 131 | 269 | $p=0,628^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 236,38 | 46,93 | 232,50 | 141 | 276 | |
| ● 8 dias | 1 | 8 | 154,38 | 112,47 | 199,50 | 8 | 279 | $p=0,735^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 172,25 | 94,10 | 177 | 39 | 280 | |
| ● 15 dias | 1 | 8 | 241,75 | 67,78 | 269,50 | 86 | 291 | $p=0,255^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 202,38 | 64,99 | 228,50 | 116 | 271 | |
| ● 22 dias | 1 | 8 | 251,75 | 43,25 | 267 | 151 | 286 | $p=0,846^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 277,63 | 9,69 | 278,50 | 258 | 290 | |
| ● 29 dias | 1 | 8 | 267,50 | 31,30 | 277 | 204 | 300 | $p=0,820^{\ddagger}$ |
| | 2 | 7 | 210,14 | 78,59 | 227 | 50 | 277 | |
| ● 36 dias | 1 | 8 | 238,88 | 78,83 | 269 | 62 | 300 | $p=1^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 238,25 | 49,62 | 249 | 148 | 284 | |

ANEXO 25: - TESTE DO CAMPO ABERTO – LATÊNCIA. COMPARAÇÃO DOS SUBGRUPOS NOS DIFERENTES GRUPOS ANTES DO PRIMEIRO VERSUS SEGUNDO TESTE DA FORMALINA (TF). (NTBo-A) NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A; (SSI) SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA. † T-STUDENT TESTE. SIGNIFICÂNCIA $P < 0.05$. VALORES APRESENTADOS EM SEGUNDOS.

| Subgrupos (Latência) | Grupo | Antes do Primeiro TF | Antes do Segundo TF | (p) [†] |
|----------------------|--------|----------------------|---------------------|------------------------|
| • 24 horas | NTBo-A | 20,62 ± 14,40 | 37,50 ± 94,06 | p = 0,624 [†] |
| | SSI | 6,37 ± 11,08 | 5,25 ± 2,96 | p = 0,786 [†] |
| • 8 dias | NTBo-A | 4,50 ± 7,50 | 10,75 ± 11,28 | p = 0,213 [†] |
| | SSI | 1,62 ± 1,30 | 4,25 ± 4,65 | p = 0,147 [†] |
| • 15 dias | NTBo-A | 47,25 ± 103,33 | 83,37 ± 134,11 | p = 0,556 [†] |
| | SSI | 7,12 ± 15,85 | 14 ± 29,28 | p = 0,569 [†] |
| • 22 dias | NTBo-A | 1,25 ± 1,38 | 1,37 ± 1,06 | p = 0,843 [†] |
| | SSI | 15,87 ± 32,11 | 8,12 ± 9,21 | p = 0,522 [†] |
| • 29 dias | NTBo-A | 19,5 ± 22,99 | 43,37 ± 103,75 | p = 0,535 [†] |
| | SSI | 14,42 ± 28,17 | 24,71 ± 41,68 | p = 0,598 [†] |
| • 36 dias | NTBo-A | 44,75 ± 103,7 | 44,25 ± 103,46 | p = 0,992 [†] |
| | SSI | 4 ± 5,8 | 57,12 ± 108,29 | p = 0,188 [†] |

ANEXO 26: - TESTE DO CAMPO ABERTO – CASAS ANDADAS. COMPARAÇÃO DOS SUBGRUPOS NOS DIFERENTES GRUPOS ANTES DO PRIMEIRO VERSUS SEGUNDO TESTE DA FORMALINA (TF); (NTBo-A) NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A; (SSI) SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA. † T-STUDENT TESTE. SIGNIFICÂNCIA $p < 0.05$. VALORES APRESENTADOS EM UNIDADES.

| Subgrupos | Grupo | Antes do Primeiro TF | Antes do Segundo TF | (p)† |
|------------------|--------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------|
| • 24 horas | NTBo-A | 72,75 ± 36,80 | 15,75 ± 11,73 | p=0,001 |
| | SSI | 74,75 ± 25,38 | 17 ± 20,88 | p < 0,0001 |
| • 8 dias | NTBo-A | 75,87 ± 35,77 | 18 ± 12,82 | p = 0,001 |
| | SSI | 66,37 ± 36,50 | 23,25 ± 31,32 | p = 0,024 |
| • 15 dias | NTBo-A | 40,37 ± 46,38 | 15,5 ± 20,18 | p = 0,186 |
| | SSI | 79,87 ± 41,89 | 10,12 ± 9,15 | p < 0,0001 |
| • 22 dias | NTBo-A | 76,25 ± 37,93 | 25,62 ± 15,46 | p = 0,004 |
| | SSI | 69,62 ± 23,69 | 16,87 ± 12,15 | p < 0,0001 |
| • 29 dias | NTBo-A | 47,75 ± 25,88 | 8 ± 8 | p = 0,001 |
| | SSI | 44,28 ± 21,83 | 16,71 ± 14,37 | p = 0,016 |
| • 36 dias | NTBo-A | 42 ± 28,71 | 28,62 ± 31,80 | p = 0,392 |
| | SSI | 65,87 ± 54,72 | 25 ± 26 | p = 0,077 |

ANEXO 27: - TESTE DO CAMPO ABERTO – LEVANTAMENTOS. COMPARAÇÃO DOS SUBGRUPOS NOS DIFERENTES GRUPOS ANTES DO PRIMEIRO VERSUS SEGUNDO TESTE DA FORMALINA (TF); (NTBo-A) NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A; (SSI) SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA. † T-STUDENT TESTE. SIGNIFICÂNCIA $P < 0.05$. VALORES APRESENTADOS EM UNIDADES.

| Subgrupos | Grupo | Antes do Primeiro TF | Antes do Segundo TF | (p) [†] |
|------------|--------|----------------------|---------------------|--------------------|
| • 24 horas | NTBo-A | 15,12 ± 7,33 | 2,87 ± 2,47 | p=0,001 |
| | SSI | 24,62 ± 13,31 | 2,75 ± 2,37 | p<0,0001 |
| • 8 dias | NTBo-A | 22,37 ± 10,45 | 6 ± 6,39 | p =0,002 |
| | SSI | 27 ± 20,44 | 7,12 ± 7,64 | p =0,022 |
| • 15dias | NTBo-A | 14 ± 16,5 | 4,25 ± 8,63 | p = 0,161 |
| | SSI | 20 ± 12,63 | 3,75 ± 4,09 | p = 0,004 |
| • 22 dias | NTBo-A | 46,5 ± 78,98 | 6,87 ± 4,05 | p = 0,178 |
| | SSI | 19 ± 10,11 | 6,25 ± 6,15 | p = 0,009 |
| • 29 dias | NTBo-A | 12 ± 12,54 | 2,25 ± 2,37 | p = 0,004 |
| | SSI | 10,71 ± 6,89 | 4 ± 5,06 | p =0,063 |
| • 36 dias | NTBo-A | 15 ± 9,62 | 5 ± 5,78 | p = 0,025 |
| | SSI | 20,87 ± 13,3 | 7,12 ± 9,77 | p =0,034 |

ANEXO 28- TESTE DO CAMPO ABERTO – TEMPO DE IMOBILIDADE. COMPARAÇÃO DOS SUBGRUPOS NOS DIFERENTES GRUPOS ANTES DO PRIMEIRO VERSUS SEGUNDO TESTE DA FORMALINA (TF); (NTBo-A) NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A; (SSI) SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA. † T-STUDENT TESTE. SIGNIFICÂNCIA $P < 0.05$. VALORES APRESENTADOS EM SEGUNDOS.

| Subgrupos | Grupo | Antes do Primeiro TF | Antes do Segundo TF | (p) [†] |
|------------|--------|----------------------|---------------------|----------------------|
| ● 24 horas | NTBo-A | 116,5 ± 56,69 | 227,62 ± 43,90 | p = 0,001 |
| | SSI | 79,37 ± 52,21 | 216,37 ± 46,93 | p < 0,0001 |
| ● 8 dias | NTBo-A | 182,62 ± 57,49 | 154,37 ± 112,47 | p = 0,537 |
| | SSI | 172,12 ± 40,60 | 172,25 ± 94,10 | p = 0,997 |
| ● 15 dias | NTBo-A | 171,87 ± 102,81 | 242,75 ± 67,78 | p = 0,131 |
| | SSI | 101,37 ± 71,65 | 202,37 ± 64,99 | p = 0,01 |
| ● 22 dias | NTBo-A | 125,62 ± 72,32 | 251,75 ± 43,25 | p = 0,001 |
| | SSI | 171,5 ± 44,25 | 277,62 ± 9,69 | p < 0,0001 |
| ● 29 dias | NTBo-A | 116,87 ± 52,31 | 267,5 ± 31,3 | p < 0,0001 |
| | SSI | 130 ± 74,07 | 210,14 ± 78,59 | p = 0,073 |
| ● 36 dias | NTBo-A | 210,75 ± 80,03 | 238,87 ± 78,82 | p = 0,490 |
| | SSI | 149,87 ± 116,80 | 238,25 ± 49,62 | p = 0,069 |

ANEXO 29: - RESULTADOS DO TESTE DA FORMALINA APÓS O PRIMEIRO TRATAMENTO NOS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBo-A. MINUTOS (M). RESULTADOS EM SEGUNDOS.

| Subgrupos | Animal | 3m | 6m | 9m | 12m | 15m | 18m | 21m | 24m | 27m | 30m |
|------------|--------|-----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ● 24 horas | 1 | 100 | 0 | 0 | 8 | 43 | 0 | 21 | 50 | 0 | 0 |
| | 2 | 18 | 0 | 37 | 15 | 0 | 40 | 90 | 27 | 53 | 12 |
| | 3 | 37 | 36 | 34 | 4 | 58 | 58 | 55 | 9 | 23 | 40 |
| | 4 | 74 | 20 | 13 | 0 | 55 | 95 | 113 | 85 | 78 | 88 |
| | 5 | 87 | 1 | 0 | 0 | 52 | 65 | 30 | 0 | 0 | 0 |
| | 6 | 108 | 0 | 0 | 0 | 66 | 1 | 0 | 0 | 27 | 0 |
| | 7 | 81 | 0 | 0 | 24 | 17 | 1 | 0 | 0 | 42 | 0 |
| | 8 | 57 | 46 | 0 | 0 | 0 | 66 | 71 | 16 | 85 | 0 |
| ● 8 dias | 1 | 59 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 69 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 69 | 0 | 0 | 0 | 8 | 54 | 39 | 54 | 41 | 19 |
| | 3 | 58 | 0 | 0 | 0 | 0 | 23 | 75 | 78 | 58 | 75 |
| | 4 | 70 | 0 | 25 | 1 | 0 | 0 | 2 | 4 | 5 | 0 |
| | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 | 0 |
| | 6 | 60 | 0 | 0 | 6 | 15 | 1 | 8 | 11 | 2 | 20 |
| | 7 | 21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 | 9 | 1 | 0 | 0 |
| | 8 | 60 | 3 | 0 | 28 | 18 | 15 | 39 | 15 | 15 | 14 |
| ● 15 dias | 1 | 14 | 0 | 0 | 15 | 0 | 3 | 36 | 73 | 57 | 51 |
| | 2 | 75 | 55 | 36 | 110 | 92 | 146 | 127 | 125 | 50 | 62 |
| | 3 | 71 | 0 | 0 | 56 | 85 | 81 | 55 | 77 | 56 | 59 |
| | 4 | 40 | 0 | 0 | 0 | 51 | 67 | 69 | 47 | 73 | 18 |
| | 5 | 60 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 91 | 44 | 86 | 53 |
| | 6 | 35 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 72 | 6 | 0 | 0 |
| | 7 | 94 | 20 | 0 | 34 | 28 | 15 | 19 | 33 | 64 | 15 |
| | 8 | 75 | 0 | 0 | 41 | 41 | 57 | 104 | 36 | 63 | 8 |
| ● 22 dias | 1 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 | 0 | 26 | 36 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 54 |
| | 3 | 107 | 24 | 0 | 0 | 0 | 60 | 52 | 38 | 38 | 49 |
| | 4 | 45 | 2 | 0 | 0 | 35 | 74 | 57 | 52 | 47 | 90 |
| | 5 | 10 | 0 | 0 | 0 | 3 | 28 | 21 | 8 | 6 | 0 |
| | 6 | 24 | 1 | 17 | 21 | 22 | 19 | 43 | 28 | 21 | 14 |
| | 7 | 15 | 5 | 0 | 0 | 26 | 58 | 69 | 35 | 72 | 38 |
| | 8 | 13 | 4 | 21 | 0 | 2 | 23 | 40 | 0 | 0 | 7 |
| ● 29 dias | 1 | 64 | 0 | 0 | 20 | 39 | 16 | 30 | 77 | 75 | 72 |
| | 2 | 60 | 0 | 0 | 0 | 0 | 35 | 92 | 95 | 98 | 69 |
| | 3 | 78 | 4 | 2 | 1 | 49 | 94 | 100 | 40 | 49 | 59 |
| | 4 | 41 | 0 | 0 | 0 | 46 | 95 | 47 | 57 | 32 | 21 |
| | 5 | 68 | 79 | 0 | 0 | 56 | 109 | 36 | 87 | 62 | 37 |
| | 6 | 44 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 74 | 64 | 30 | 38 |
| | 7 | 62 | 26 | 0 | 64 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 96 |
| | 8 | 49 | 2 | 22 | 47 | 115 | 81 | 77 | 2 | 68 | 99 |
| ● 36 dias | 1 | 51 | 5 | 0 | 0 | 0 | 77 | 85 | 44 | 58 | 12 |
| | 2 | 73 | 7 | 0 | 24 | 44 | 42 | 62 | 32 | 58 | 37 |
| | 3 | 69 | 3 | 30 | 14 | 113 | 72 | 42 | 31 | 45 | 29 |
| | 4 | 23 | 0 | 5 | 0 | 55 | 34 | 25 | 26 | 31 | 28 |
| | 5 | 23 | 0 | 5 | 0 | 10 | 30 | 30 | 54 | 57 | 5 |
| | 6 | 22 | 0 | 0 | 25 | 18 | 39 | 21 | 0 | 16 | 37 |
| | 7 | 15 | 40 | 0 | 0 | 48 | 28 | 18 | 36 | 24 | 12 |
| | 8 | 9 | 0 | 0 | 0 | 1 | 5 | 0 | 15 | 8 | 1 |

ANEXO 30- RESULTADOS DO TESTE DA FORMALINA APÓS O SEGUNDO TRATAMENTO NOS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBo-A. MINUTOS (M). RESULTADOS EM SEGUNDOS

| Subgrupos | Animal | 3m | 6m | 9m | 12m | 15m | 18m | 21m | 24m | 27m | 30m |
|------------|--------|-----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ● 24 horas | 1 | 62 | 0 | 0 | 0 | 14 | 49 | 82 | 64 | 32 | 12 |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 44 | 84 |
| | 3 | 12 | 0 | 14 | 48 | 0 | 74 | 71 | 10 | 0 | 33 |
| | 4 | 42 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 33 | 0 | 0 | 22 |
| | 5 | 49 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 | 0 | 9 | 24 | 0 |
| | 6 | 72 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 39 | 0 | 63 |
| | 7 | 59 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 22 | 32 | 17 |
| | 8 | 147 | 0 | 0 | 19 | 2 | 0 | 14 | 38 | 1 | 0 |
| ● 8 dias | 1 | 76 | 3 | 1 | 31 | 3 | 0 | 17 | 90 | 91 | 70 |
| | 2 | 74 | 31 | 0 | 0 | 56 | 87 | 125 | 76 | 76 | 76 |
| | 3 | 47 | 0 | 17 | 0 | 0 | 57 | 23 | 29 | 40 | 1 |
| | 4 | 105 | 1 | 0 | 0 | 99 | 59 | 101 | 37 | 2 | 69 |
| | 5 | 65 | 15 | 0 | 0 | 0 | 71 | 63 | 66 | 62 | 56 |
| | 6 | 69 | 4 | 0 | 0 | 44 | 69 | 38 | 56 | 33 | 59 |
| | 7 | 71 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 46 | 0 |
| | 8 | 97 | 0 | 0 | 0 | 48 | 5 | 71 | 44 | 16 | 0 |
| ● 15 dias | 1 | 48 | 77 | 5 | 52 | 83 | 61 | 51 | 73 | 62 | 109 |
| | 2 | 41 | 13 | 49 | 22 | 61 | 109 | 59 | 41 | 35 | 11 |
| | 3 | 74 | 5 | 33 | 10 | 113 | 117 | 84 | 66 | 76 | 61 |
| | 4 | 62 | 8 | 25 | 2 | 33 | 90 | 66 | 59 | 75 | 27 |
| | 5 | 68 | 0 | 5 | 45 | 0 | 0 | 39 | 28 | 46 | 80 |
| | 6 | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 2 | 0 |
| | 7 | 83 | 18 | 28 | 72 | 45 | 96 | 41 | 80 | 57 | 73 |
| | 8 | 7 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 8 | 2 |
| ● 22 dias | 1 | 27 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 | 18 |
| | 2 | 87 | 0 | 0 | 0 | 0 | 130 | 61 | 40 | 32 | 65 |
| | 3 | 40 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 53 | 51 | 44 | 50 |
| | 4 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 29 | 70 | 57 | 70 |
| | 5 | 36 | 46 | 0 | 0 | 25 | 16 | 4 | 16 | 19 | 12 |
| | 6 | 17 | 0 | 0 | 0 | 22 | 17 | 20 | 31 | 40 | 35 |
| | 7 | 47 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 33 | 36 | 51 | 19 |
| | 8 | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 24 | 0 | 0 | 0 |
| ● 29 dias | 1 | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 41 | 39 | 87 | 53 |
| | 2 | 59 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 49 | 71 | 106 |
| | 3 | 49 | 0 | 0 | 7 | 0 | 10 | 11 | 0 | 95 | 26 |
| | 4 | 62 | 0 | 2 | 0 | 0 | 100 | 77 | 85 | 51 | 77 |
| | 5 | 37 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 | 38 | 6 |
| | 6 | 24 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 30 | 20 | 1 | 4 |
| | 7 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 40 | 17 | 22 | 11 |
| | 8 | 35 | 0 | 0 | 6 | 18 | 41 | 15 | 35 | 8 | 20 |
| ● 36 dias | 1 | 5 | 3 | 0 | 0 | 12 | 40 | 25 | 13 | 22 | 0 |
| | 2 | 10 | 11 | 6 | 0 | 0 | 33 | 37 | 4 | 32 | 21 |
| | 3 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 46 | 21 | 30 |
| | 4 | 30 | 0 | 12 | 21 | 0 | 68 | 30 | 36 | 27 | 14 |
| | 5 | 54 | 25 | 23 | 0 | 0 | 0 | 69 | 37 | 38 | 14 |
| | 6 | 42 | 2 | 0 | 0 | 26 | 28 | 0 | 10 | 31 | 14 |
| | 7 | 74 | 1 | 0 | 61 | 37 | 24 | 63 | 38 | 45 | 23 |
| | 8 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 20 | 4 |

ANEXO 31: - RESULTADOS DO TESTE DA FORMALINA APÓS O PRIMEIRO TRATAMENTO NOS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO SSI. MINUTOS (M). RESULTADOS EM SEGUNDOS.

| Subgrupos | Animal | 3m | 6m | 9m | 12m | 15m | 18m | 21m | 24m | 27m | 30m |
|------------|--------|-----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ● 24 horas | 1 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 110 | 62 | 42 | 35 | 47 | 31 | 1 | 44 | 15 | 16 |
| | 3 | 71 | 27 | 6 | 2 | 20 | 59 | 71 | 60 | 18 | 30 |
| | 4 | 71 | 0 | 29 | 43 | 27 | 70 | 79 | 95 | 27 | 89 |
| | 5 | 63 | 0 | 1 | 0 | 23 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 6 | 69 | 11 | 12 | 0 | 0 | 75 | 31 | 50 | 44 | 28 |
| | 7 | 110 | 5 | 2 | 3 | 0 | 54 | 82 | 104 | 56 | 70 |
| | 8 | 86 | 46 | 0 | 11 | 65 | 102 | 0 | 58 | 45 | 65 |
| ● 8 dias | 1 | 77 | 0 | 27 | 30 | 117 | 114 | 92 | 68 | 68 | 32 |
| | 2 | 51 | 0 | 0 | 24 | 62 | 64 | 65 | 65 | 36 | 46 |
| | 3 | 96 | 59 | 21 | 86 | 99 | 96 | 80 | 80 | 51 | 60 |
| | 4 | 80 | 1 | 14 | 36 | 40 | 66 | 71 | 71 | 59 | 73 |
| | 5 | 53 | 0 | 0 | 35 | 59 | 23 | 65 | 53 | 75 | 12 |
| | 6 | 76 | 0 | 0 | 40 | 56 | 54 | 49 | 39 | 5 | 5 |
| | 7 | 7 | 3 | 13 | 5 | 45 | 49 | 20 | 15 | 40 | 8 |
| | 8 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 |
| ● 15 dias | 1 | 80 | 5 | 0 | 5 | 25 | 77 | 87 | 117 | 87 | 80 |
| | 2 | 59 | 0 | 0 | 0 | 32 | 112 | 103 | 99 | 48 | 58 |
| | 3 | 55 | 0 | 0 | 0 | 0 | 45 | 73 | 56 | 45 | 67 |
| | 4 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 40 | 20 | 27 | 14 |
| | 5 | 62 | 85 | 0 | 0 | 114 | 80 | 140 | 8 | 82 | 104 |
| | 6 | 64 | 2 | 39 | 63 | 83 | 18 | 12 | 29 | 63 | 29 |
| | 7 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 8 | 105 | 0 | 0 | 73 | 4 | 60 | 67 | 74 | 13 | 47 |
| ● 22 dias | 1 | 25 | 0 | 0 | 36 | 1 | 0 | 36 | 74 | 79 | 44 |
| | 2 | 65 | 5 | 34 | 30 | 58 | 96 | 48 | 38 | 30 | 23 |
| | 3 | 31 | 0 | 0 | 0 | 0 | 45 | 43 | 66 | 4 | 50 |
| | 4 | 56 | 8 | 0 | 0 | 15 | 38 | 12 | 57 | 33 | 45 |
| | 5 | 21 | 0 | 0 | 2 | 0 | 3 | 5 | 4 | 7 | 10 |
| | 6 | 51 | 5 | 0 | 0 | 0 | 53 | 78 | 54 | 65 | 72 |
| | 7 | 31 | 10 | 6 | 0 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| | 8 | 48 | 48 | 5 | 8 | 30 | 50 | 47 | 45 | 47 | 37 |
| ● 29 dias | 1 | 88 | 0 | 0 | 0 | 0 | 103 | 106 | 86 | 81 | 89 |
| | 2 | 84 | 13 | 0 | 14 | 77 | 48 | 52 | 76 | 25 | 17 |
| | 3 | 49 | 7 | 0 | 0 | 24 | 56 | 31 | 54 | 36 | 47 |
| | 4 | 36 | 1 | 0 | 0 | 18 | 25 | 46 | 31 | 33 | 12 |
| | 5 | 85 | 17 | 0 | 65 | 17 | 0 | 0 | 0 | 18 | 99 |
| | 6 | 104 | 0 | 5 | 5 | 61 | 16 | 47 | 60 | 13 | 63 |
| | 7 | 59 | 0 | 0 | 0 | 0 | 38 | 52 | 56 | 56 | 24 |
| | 8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ● 36 dias | 1 | 49 | 25 | 2 | 11 | 79 | 31 | 36 | 43 | 52 | 41 |
| | 2 | 58 | 49 | 31 | 52 | 59 | 89 | 70 | 71 | 60 | 105 |
| | 3 | 41 | 0 | 31 | 21 | 97 | 82 | 69 | 92 | 76 | 16 |
| | 4 | 44 | 9 | 27 | 58 | 50 | 31 | 51 | 40 | 54 | 25 |
| | 5 | 20 | 0 | 0 | 0 | 12 | 69 | 70 | 36 | 12 | 0 |
| | 6 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 | 45 | 46 | 6 | 13 |
| | 7 | 2 | 0 | 13 | 11 | 0 | 8 | 27 | 18 | 52 | 21 |
| | 8 | 32 | 0 | 20 | 14 | 48 | 114 | 75 | 65 | 39 | 1 |

ANEXO 32: - RESULTADOS DO TESTE DA FORMALINA APÓS O SEGUNDO TRATAMENTO NOS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO SSI. MINUTOS (M). RESULTADOS EM SEGUNDOS

| Subgrupos | Animal | 3m | 6m | 9m | 12m | 15m | 18m | 21m | 24m | 27m | 30m |
|------------|--------|-----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ● 24 horas | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 88 | 83 |
| | 2 | 75 | 21 | 29 | 44 | 14 | 32 | 32 | 9 | 32 | 0 |
| | 3 | 112 | 0 | 0 | 12 | 22 | 57 | 8 | 62 | 60 | 49 |
| | 4 | 32 | 13 | 0 | 0 | 49 | 26 | 27 | 21 | 24 | 28 |
| | 5 | 3 | 7 | 14 | 1 | 0 | 0 | 11 | 0 | 0 | 19 |
| | 6 | 55 | 1 | 0 | 0 | 0 | 22 | 29 | 1 | 4 | 6 |
| | 7 | 38 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 | 0 | 25 | 0 | 4 |
| | 8 | 66 | 0 | 0 | 0 | 8 | 111 | 46 | 36 | 72 | 77 |
| ● 8 dias | 1 | 77 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 37 | 31 | 50 | 54 |
| | 2 | 60 | 1 | 11 | 16 | 35 | 64 | 39 | 32 | 28 | 6 |
| | 3 | 86 | 12 | 0 | 13 | 56 | 96 | 109 | 108 | 97 | 92 |
| | 4 | 69 | 0 | 0 | 21 | 5 | 0 | 0 | 0 | 27 | 26 |
| | 5 | 88 | 46 | 0 | 0 | 83 | 87 | 81 | 35 | 39 | 76 |
| | 6 | 34 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 68 | 53 | 56 | 94 |
| | 7 | 57 | 0 | 0 | 0 | 0 | 24 | 114 | 66 | 62 | 66 |
| | 8 | 64 | 0 | 0 | 0 | 0 | 75 | 54 | 87 | 77 | 78 |
| ● 15 dias | 1 | 51 | 0 | 0 | 0 | 27 | 48 | 31 | 40 | 23 | 27 |
| | 2 | 90 | 27 | 27 | 4 | 28 | 94 | 76 | 24 | 64 | 66 |
| | 3 | 63 | 5 | 0 | 2 | 2 | 75 | 4 | 75 | 102 | 94 |
| | 4 | 82 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 35 | 0 | 0 |
| | 5 | 86 | 0 | 0 | 0 | 15 | 101 | 79 | 108 | 88 | 86 |
| | 6 | 27 | 2 | 0 | 64 | 0 | 20 | 9 | 6 | 9 | 2 |
| | 7 | 42 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 | 32 | 53 | 22 |
| | 8 | 41 | 0 | 0 | 7 | 0 | 24 | 31 | 9 | 4 | 7 |
| ● 22 dias | 1 | 42 | 0 | 1 | 0 | 3 | 26 | 34 | 32 | 26 | 10 |
| | 2 | 68 | 0 | 0 | 15 | 29 | 13 | 23 | 29 | 0 | 10 |
| | 3 | 39 | 0 | 5 | 0 | 12 | 30 | 11 | 15 | 0 | 0 |
| | 4 | 77 | 43 | 0 | 79 | 75 | 65 | 67 | 103 | 10 | 12 |
| | 5 | 28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 16 | 22 | 0 |
| | 6 | 76 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 | 18 | 0 | 53 |
| | 7 | 33 | 0 | 0 | 0 | 0 | 19 | 3 | 16 | 9 | 24 |
| | 8 | 14 | 0 | 0 | 13 | 26 | 18 | 7 | 5 | 12 | 6 |
| ● 29 dias | 1 | 82 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 53 | 117 | 41 |
| | 2 | 97 | 14 | 15 | 43 | 106 | 91 | 52 | 77 | 27 | 46 |
| | 3 | 47 | 0 | 0 | 68 | 68 | 102 | 81 | 109 | 64 | 90 |
| | 4 | 40 | 0 | 0 | 13 | 64 | 42 | 12 | 5 | 0 | 60 |
| | 5 | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 19 | 0 | 0 |
| | 6 | 31 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 7 | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ● 36 dias | 1 | 53 | 0 | 1 | 1 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 51 | 0 | 0 | 52 | 12 | 29 | 23 | 21 | 32 | 15 |
| | 3 | 28 | 0 | 0 | 18 | 1 | 52 | 20 | 0 | 25 | 0 |
| | 4 | 20 | 1 | 9 | 15 | 45 | 66 | 19 | 31 | 14 | 17 |
| | 5 | 111 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 29 | 65 | 96 | 85 |
| | 6 | 21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 38 | 34 | 33 | 61 |
| | 7 | 58 | 0 | 0 | 0 | 38 | 33 | 25 | 51 | 28 | 29 |
| | 8 | 26 | 4 | 0 | 0 | 29 | 34 | 44 | 18 | 21 | 15 |

ANEXO 33 - RESULTADOS NOS DIFERENTES SUBGRUPOS PARA AS FASES NEUROGÊNICA E INFLAMATÓRIA APÓS O PRIMEIRO TRATAMENTO NOS GRUPOS NTBo-A E SSI. VALORES EM SEGUNDOS.

| Subgrupo | Animal | BOTOX | | SSI | |
|------------|--------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| | | Fase Neurogênica | Fase Inflamatória | Fase Neurogênica | Fase Inflamatória |
| ● 24 horas | 1 | 100 | 122 | 9 | 0 |
| | 2 | 18 | 237 | 110 | 189 |
| | 3 | 37 | 247 | 71 | 260 |
| | 4 | 74 | 514 | 71 | 430 |
| | 5 | 87 | 147 | 63 | 23 |
| | 6 | 108 | 94 | 69 | 228 |
| | 7 | 81 | 84 | 110 | 369 |
| | 8 | 57 | 238 | 86 | 346 |
| ● 8 dias | 1 | 59 | 69 | 77 | 521 |
| | 2 | 69 | 215 | 51 | 362 |
| | 3 | 58 | 309 | 96 | 552 |
| | 4 | 70 | 12 | 80 | 416 |
| | 5 | 0 | 12 | 53 | 322 |
| | 6 | 60 | 63 | 76 | 248 |
| | 7 | 21 | 25 | 7 | 182 |
| | 8 | 60 | 144 | 4 | 14 |
| ● 15 dias | 1 | 14 | 235 | 80 | 478 |
| | 2 | 75 | 712 | 59 | 452 |
| | 3 | 71 | 469 | 55 | 286 |
| | 4 | 40 | 325 | 24 | 101 |
| | 5 | 60 | 274 | 62 | 528 |
| | 6 | 35 | 78 | 64 | 297 |
| | 7 | 94 | 208 | 24 | 0 |
| | 8 | 75 | 350 | 105 | 338 |
| ● 22 dias | 1 | 14 | 79 | 25 | 270 |
| | 2 | 0 | 54 | 65 | 323 |
| | 3 | 107 | 237 | 31 | 208 |
| | 4 | 45 | 355 | 56 | 200 |
| | 5 | 10 | 66 | 21 | 31 |
| | 6 | 24 | 168 | 51 | 322 |
| | 7 | 15 | 298 | 31 | 9 |
| | 8 | 13 | 72 | 48 | 264 |
| ● 29 dias | 1 | 64 | 329 | 88 | 465 |
| | 2 | 60 | 389 | 84 | 290 |
| | 3 | 78 | 391 | 49 | 248 |
| | 4 | 41 | 298 | 36 | 165 |
| | 5 | 68 | 387 | 85 | 199 |
| | 6 | 44 | 206 | 104 | 265 |
| | 7 | 62 | 163 | 59 | 226 |
| | 8 | 49 | 489 | | |
| ● 36 dias | 1 | 51 | 276 | 49 | 293 |
| | 2 | 73 | 296 | 58 | 506 |
| | 3 | 69 | 346 | 41 | 453 |
| | 4 | 23 | 199 | 44 | 309 |
| | 5 | 23 | 186 | 20 | 199 |
| | 6 | 22 | 156 | 17 | 122 |
| | 7 | 15 | 166 | 2 | 137 |
| | 8 | 9 | 30 | 32 | 356 |

ANEXO 34: - RESULTADOS NOS DIFERENTES SUBGRUPOS PARA AS FASES NEUROGÊNICA E INFLAMATÓRIA APÓS O SEGUNDO TRATAMENTO NOS GRUPOS NTBo-A E SSI. VALORES EM SEGUNDOS.

| Subgrupo | Animal | BOTOX | | SSI | |
|-----------|--------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| | | Fase Neurogênica | Fase Inflamatória | Fase Neurogênica | Fase Inflamatória |
| ●24 horas | 1 | 62 | 253 | 1 | 171 |
| | 2 | 0 | 128 | 75 | 163 |
| | 3 | 12 | 236 | 112 | 270 |
| | 4 | 42 | 55 | 32 | 175 |
| | 5 | 49 | 49 | 3 | 31 |
| | 6 | 72 | 102 | 55 | 62 |
| | 7 | 59 | 77 | 38 | 40 |
| | 8 | 147 | 74 | 66 | 350 |
| ●8 dias | 1 | 76 | 302 | 77 | 172 |
| | 2 | 74 | 496 | 60 | 220 |
| | 3 | 47 | 150 | 86 | 571 |
| | 4 | 105 | 367 | 69 | 79 |
| | 5 | 65 | 318 | 88 | 401 |
| | 6 | 69 | 299 | 34 | 271 |
| | 7 | 71 | 50 | 57 | 332 |
| | 8 | 97 | 184 | 64 | 371 |
| ●15dias | 1 | 48 | 491 | 51 | 196 |
| | 2 | 41 | 338 | 90 | 356 |
| | 3 | 74 | 527 | 63 | 354 |
| | 4 | 62 | 352 | 82 | 35 |
| | 5 | 68 | 36 | 86 | 131 |
| | 6 | 25 | 328 | 27 | 119 |
| | 7 | 83 | 218 | 42 | 68 |
| | 8 | 7 | 226 | 41 | 411 |
| ●22 dias | 1 | 27 | 36 | 42 | 211 |
| | 2 | 87 | 328 | 68 | 442 |
| | 3 | 40 | 218 | 39 | 582 |
| | 4 | 30 | 226 | 77 | 196 |
| | 5 | 36 | 92 | 28 | 47 |
| | 6 | 17 | 165 | 76 | 83 |
| | 7 | 47 | 140 | 33 | 71 |
| | 8 | 48 | 24 | 14 | 87 |
| ●29 dias | 1 | 25 | 220 | 82 | 211 |
| | 2 | 59 | 226 | 97 | 399 |
| | 3 | 49 | 142 | 47 | 514 |
| | 4 | 62 | 390 | 40 | 183 |
| | 5 | 37 | 59 | 25 | 19 |
| | 6 | 24 | 55 | 31 | 0 |
| | 7 | 30 | 90 | 25 | 0 |
| | 8 | 35 | 143 | - | - |
| ●36 dias | 1 | 5 | 112 | 53 | 10 |
| | 2 | 10 | 127 | 51 | 184 |
| | 3 | 20 | 97 | 28 | 116 |
| | 4 | 30 | 196 | 20 | 207 |
| | 5 | 54 | 158 | 111 | 275 |
| | 6 | 42 | 109 | 21 | 166 |
| | 7 | 74 | 291 | 58 | 204 |
| | 8 | 20 | 44 | 26 | 161 |

ANEXO 35: - ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA DO TESTE DE FORMALINA 2.5% NOS SUBGRUPOS DO GRUPO NTBo-A E SSI PARA FASE NEUROGÊNICA APÓS O PRIMEIRO TRATAMENTO. GRUPO 1 (NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A); GRUPO 2 (SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9%); (MIN.) MÍNIMO; (MAX) MÁXIMO; [†]T-STUDENT TESTE; [‡] MANN-WHITNEY TESTE. SIGNIFICÂNCIA $P < 0,05$. VALORES APRESENTADOS EM SEGUNDOS.

| | Grupo | N | Média | Desvio Padrão | Mediana | Min. | Max | $p^{†,‡}$ 1 versus 2 |
|------------|-------|---|-------|---------------|---------|------|-----|-------------------------|
| ● 24 horas | 1 | 8 | 70,25 | 77,50 | 31,010 | 37 | 108 | $p=0,195^{†}$ |
| | 2 | 8 | 73,63 | 71 | 31,901 | 9 | 110 | |
| ● 8 dias | 1 | 8 | 49,63 | 59,50 | 25,202 | 0 | 70 | $p=0,680^{†}$ |
| | 2 | 8 | 55,50 | 64,50 | 34,130 | 4 | 96 | |
| ● 15 dias | 1 | 8 | 58 | 65,5 | 26,284 | 14 | 94 | $p=0,134^{†}$ |
| | 2 | 8 | 59,13 | 60,5 | 26,878 | 24 | 105 | |
| ● 22 dias | 1 | 8 | 28,50 | 14,50 | 34,314 | 0 | 107 | $p=0,148^{†}$ |
| | 2 | 8 | 41 | 41 | 16,062 | 21 | 65 | |
| ● 29 dias | 1 | 8 | 58,25 | 62 | 12,65 | 41 | 78 | $p=0,955^{‡}$ |
| | 2 | 7 | 72,14 | 84 | 24,45 | 36 | 104 | |
| ● 36 dias | 1 | 8 | 35,63 | 23 | 25,03 | 9 | 73 | $p=0,244^{†}$ |
| | 2 | 8 | 32,88 | 36,5 | 18,71 | 2 | 58 | |

ANEXO 36 ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA DO TESTE DE FORMALINA 2.5% NOS SUBGRUPOS DO GRUPO NTBO-A E SSI PARA FASE NEUROGÊNICA APÓS O SEGUNDO TRATAMENTO. (GRUPO 1) NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A; (GRUPO 2) SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9%; (MIN.) MÍNIMO; (MAX) MÁXIMO. † T-STUDENT TESTE, ‡ MANN-WHITNEY TESTE. SIGNIFICÂNCIA $P < 0,05$. VALORES APRESENTADOS EM SEGUNDOS.

| | Grupo | N | Média | Desvio Padrão | Mediana | Min. | Max | $p^{\dagger, \ddagger}$ 1 versus 2 |
|------------|-------|---|-------|---------------|---------|------|-----|---------------------------------------|
| ● 24 horas | 1 | 8 | 55,38 | 44,55 | 54 | 0 | 147 | $p=0,716^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 47,75 | 37,39 | 46,50 | 1 | 112 | |
| ● 8 dias | 1 | 8 | 75,50 | 18,20 | 72,50 | 47 | 105 | $p=0,351^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 66,88 | 17,53 | 66,50 | 34 | 88 | |
| ● 15 dias | 1 | 8 | 51 | 25,86 | 55 | 7 | 83 | $p=0,468^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 60,25 | 23,67 | 57 | 27 | 90 | |
| ● 22 dias | 1 | 8 | 41,5 | 21,10 | 38 | 17 | 87 | $p=0,624^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 47,13 | 23,65 | 40,50 | 14 | 77 | |
| ● 29 dias | 1 | 8 | 40,13 | 14,83 | 36 | 24 | 62 | $p=0,694^{\ddagger}$ |
| | 2 | 7 | 49,57 | 28,72 | 40 | 25 | 97 | |
| ● 36 dias | 1 | 8 | 31,88 | 23,46 | 25 | 5 | 74 | $p=0,317^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 46 | 30,39 | 39,5 | 20 | 111 | |

ANEXO 37: - ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA DO TESTE DA FORMALINA 2,5% NOS SUBGRUPOS DO GRUPO NTBo-A E SSI. FASE INFLAMATÓRIA APÓS O PRIMEIRO TRATAMENTO. GRUPO 1 (NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A); GRUPO 2 (SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9%); (MIN.) MÍNIMO; (MAX) MÁXIMO. † T-STUDENT TESTE, ‡ MANN-WHITNEY TESTE. SIGNIFICÂNCIA $P < 0,05$. VALORES APRESENTADOS EM SEGUNDOS.

| | Grupo | N | Média | Desvio Padrão | Mediana | Min. | Max | $p^{\dagger, \ddagger}$ 1 versus 2 |
|------------|-------|---|--------|---------------|---------|------|-----|---------------------------------------|
| ● 24 horas | 1 | 8 | 210,38 | 192 | 139,56 | 84 | 514 | $p=0,705^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 230,63 | 244 | 156,34 | 0 | 430 | |
| ● 8 dias | 1 | 8 | 106,13 | 66 | 108,22 | 12 | 309 | $p=0,011^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 327,13 | 342 | 178,35 | 14 | 552 | |
| ● 15 dias | 1 | 8 | 331,38 | 299,50 | 191,31 | 78 | 712 | $p=0,798^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 310 | 317,50 | 184,08 | 0 | 528 | |
| ● 22 dias | 1 | 8 | 166,13 | 123,50 | 117,80 | 54 | 355 | $p=0,607^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 203,38 | 236 | 121,90 | 9 | 323 | |
| ● 29 dias | 1 | 8 | 331,50 | 106,90 | 106,90 | 163 | 489 | $p=0,203^{\ddagger}$ |
| | 2 | 7 | 265,43 | 97,28 | 97,28 | 165 | 465 | |
| ● 36 dias | 1 | 8 | 206,88 | 192,50 | 98,64 | 30 | 346 | $p=0,084^{\dagger}$ |
| | 2 | 8 | 296,88 | 301 | 140,14 | 122 | 506 | |

ANEXO 38- ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA DO TESTE DA FORMALINA 2,5% NOS SUBGRUPOS DO GRUPO NTBo-A E SSI. FASE INFLAMATÓRIA APÓS O SEGUNDO TRATAMENTO. GRUPO 1 (NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A); GRUPO 2 (SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9%); (MIN.) MÍNIMO; (MAX) MÁXIMO. † T- STUDENT TESTE, ‡ MANN-WHITNEY TESTE. SIGNIFICÂNCIA P<0,05. VALORES APRESENTADOS EM SEGUNDOS.

| | Grupo | N | Média | Desvio Padrão | Mediana | Min. | Max | p ^{†‡} 1 versus 2 |
|------------|-------|---|--------|---------------|---------|------|-----|-------------------------------|
| ● 24 horas | 1 | 8 | 121,75 | 79,94 | 89,50 | 49 | 253 | p=0,475 [†] |
| | 2 | 8 | 157,75 | 112,85 | 167 | 31 | 350 | |
| ● 8 dias | 1 | 8 | 270,75 | 138,79 | 300,50 | 50 | 496 | p=0,673 [†] |
| | 2 | 8 | 302,13 | 152,19 | 301,50 | 79 | 571 | |
| ● 15 dias | 1 | 8 | 314,50 | 157,27 | 333 | 36 | 527 | p=0,184 [†] |
| | 2 | 8 | 208,75 | 145,38 | 163,50 | 35 | 411 | |
| ● 22 dias | 1 | 8 | 153,63 | 103,19 | 152,50 | 24 | 328 | p=0,447 [†] |
| | 2 | 8 | 214,88 | 196,16 | 141,50 | 47 | 582 | |
| ● 29 dias | 1 | 8 | 165,63 | 111,70 | 142,50 | 55 | 390 | p=0,867 [‡] |
| | 2 | 7 | 189,43 | 204,36 | 183 | 0 | 514 | |
| ● 36 dias | 1 | 8 | 141,75 | 74,84 | 119,50 | 44 | 291 | p=0,545 [†] |
| | 2 | 8 | 165,38 | 77,63 | 175 | 10 | 275 | |

ANEXO 39: - RESULTADOS DO TESTE DA CRUZ ELEVADA PARA O GRUPO NTBo-A NOS SEUS DIVERSOS SUBGRUPOS. LATÊNCIA (L); BRAÇO ABERTO (BA); BRAÇO FECHADO (BF); CAMPO NEUTRO (CN). RESULTADOS EM SEGUNDOS E UNIDADES.

| Subgrupos | Animal | Latência | Entradas BA | Entradas BF | Total de Entradas BA+BF | Tempo BF | Tempo BA | Tempo CN |
|------------|--------|----------|-------------|-------------|-------------------------|----------|----------|----------|
| • 24 horas | 1 | 300 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 32 | 0 | 267 |
| | 3 | 1 | 0 | 5 | 5 | 233 | 0 | 67 |
| | 4 | 1 | 3 | 3 | 6 | 237 | 58 | 0 |
| | 5 | 4 | 3 | 0 | 3 | 0 | 50 | 246 |
| | 6 | 3 | 3 | 2 | 5 | 260 | 36 | 1 |
| | 7 | 1 | 4 | 4 | 8 | 120 | 125 | 54 |
| | 8 | 2 | 0 | 5 | 5 | 264 | 24 | 10 |
| • 8 dias | 1 | 0 | 0 | 9 | 9 | 246 | 0 | 54 |
| | 2 | 0 | 2 | 3 | 5 | 245 | 47 | 7 |
| | 3 | 0 | 5 | 0 | 5 | 0 | 265 | 35 |
| | 4 | 2 | 1 | 3 | 4 | 126 | 143 | 29 |
| | 5 | 1 | 2 | 3 | 5 | 277 | 10 | 12 |
| | 6 | 4 | 4 | 4 | 8 | 169 | 66 | 61 |
| | 7 | 2 | 12 | 4 | 16 | 51 | 220 | 27 |
| | 8 | 0 | 3 | 5 | 8 | 165 | 45 | 90 |
| • 15 dias | 1 | 0 | 2 | 2 | 4 | 265 | 24 | 11 |
| | 2 | 4 | 0 | 2 | 2 | 275 | 0 | 21 |
| | 3 | 4 | 2 | 3 | 5 | 178 | 39 | 83 |
| | 4 | 1 | 0 | 4 | 4 | 249 | 0 | 51 |
| | 5 | 7 | 10 | 1 | 11 | 18 | 214 | 61 |
| | 6 | 0 | 0 | 3 | 3 | 297 | 0 | 3 |
| | 7 | 1 | 1 | 4 | 5 | 264 | 9 | 26 |
| | 8 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 295 |
| • 22 dias | 1 | 6 | 1 | 0 | 1 | 0 | 293 | 7 |
| | 2 | 4 | 3 | 4 | 7 | 97 | 107 | 92 |
| | 3 | 0 | 2 | 1 | 3 | 240 | 56 | 4 |
| | 4 | 0 | 2 | 1 | 3 | 0 | 299 | 1 |
| | 5 | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 | 223 | 77 |
| | 6 | 0 | 2 | 5 | 7 | 227 | 50 | 23 |
| | 7 | 0 | 0 | 3 | 3 | 300 | 0 | 0 |
| | 8 | 1 | 4 | 11 | 15 | 201 | 56 | 42 |
| • 29 dias | 1 | 1 | 13 | 0 | 13 | 0 | 299 | 0 |
| | 2 | 0 | 6 | 4 | 10 | 140 | 123 | 37 |
| | 3 | 1 | 4 | 3 | 7 | 177 | 85 | 37 |
| | 4 | 4 | 0 | 2 | 2 | 89 | 5 | 202 |
| | 5 | 0 | 3 | 2 | 5 | 36 | 220 | 44 |
| | 6 | 4 | 7 | 3 | 10 | 57 | 193 | 46 |
| | 7 | 3 | 2 | 0 | 2 | 0 | 174 | 123 |
| | 8 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 292 | 7 |
| • 36 dias | 1 | 0 | 3 | 4 | 7 | 170 | 96 | 34 |
| | 2 | 0 | 14 | 0 | 14 | 0 | 296 | 4 |
| | 3 | 0 | 3 | 2 | 5 | 125 | 45 | 130 |
| | 4 | 1 | 6 | 2 | 8 | 124 | 139 | 37 |
| | 5 | 0 | 1 | 1 | 2 | 249 | 20 | 31 |
| | 6 | 0 | 2 | 1 | 3 | 264 | 36 | 0 |
| | 7 | 2 | 3 | 9 | 12 | 147 | 56 | 95 |
| | 8 | 2 | 1 | 2 | 3 | 271 | 1 | 26 |

ANEXO 40: - RESULTADOS DO TESTE DA CRUZ ELEVADA PARA O GRUPO SSI NOS SEUS DIVERSOS SUBGRUPOS. LATÊNCIA (L); BRAÇO ABERTO (BA); BRAÇO FECHADO (BF); CAMPO NEUTRO (CN). RESULTADOS EM SEGUNDOS E UNIDADES.

| Subgrupos | Animal | Latência | Entradas BA | Entradas BF | Total de Entradas BA+BF | Tempo BF | Tempo BA | Tempo CN |
|------------|--------|----------|-------------|-------------|-------------------------|----------|----------|----------|
| • 24 horas | 1 | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 | 298 | 2 |
| | 2 | 0 | 2 | 7 | 9 | 205 | 77 | 17 |
| | 3 | 0 | 5 | 0 | 5 | 0 | 292 | 2 |
| | 4 | 0 | 5 | 8 | 13 | 146 | 72 | 44 |
| | 5 | 1 | 1 | 2 | 3 | 221 | 57 | 21 |
| | 6 | 3 | 3 | 1 | 4 | 283 | 8 | 6 |
| | 7 | 1 | 1 | 6 | 7 | 72 | 193 | 34 |
| | 8 | 1 | 1 | 2 | 3 | 224 | 60 | 15 |
| • 8 dias | 1 | 0 | 1 | 2 | 3 | 262 | 15 | 23 |
| | 2 | 0 | 0 | 5 | 5 | 175 | 0 | 125 |
| | 3 | 4 | 1 | 3 | 4 | 254 | 13 | 29 |
| | 4 | 0 | 7 | 9 | 16 | 170 | 120 | 7 |
| | 5 | 1 | 4 | 6 | 10 | 152 | 61 | 86 |
| | 6 | 3 | 3 | 5 | 8 | 186 | 45 | 66 |
| | 7 | 0 | 7 | 3 | 10 | 18 | 257 | 25 |
| | 8 | 0 | 0 | 1 | 1 | 264 | 0 | 36 |
| • 15 dias | 1 | 0 | 1 | 2 | 3 | 270 | 5 | 25 |
| | 2 | 0 | 0 | 3 | 3 | 122 | 0 | 178 |
| | 3 | 0 | 1 | 4 | 5 | 280 | 2 | 18 |
| | 4 | 6 | 1 | 2 | 3 | 267 | 21 | 12 |
| | 5 | 4 | 0 | 3 | 3 | 4 | 0 | 292 |
| | 6 | 4 | 2 | 2 | 4 | 240 | 40 | 16 |
| | 7 | 7 | 2 | 1 | 3 | 215 | 31 | 47 |
| | 8 | 8 | 0 | 1 | 1 | 292 | 0 | 0 |
| • 22 dias | 1 | 6 | 1 | 0 | 1 | 0 | 289 | 5 |
| | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 298 | 1 |
| | 3 | 1 | 3 | 2 | 5 | 180 | 95 | 24 |
| | 4 | 0 | 4 | 4 | 8 | 180 | 49 | 71 |
| | 5 | 4 | 3 | 2 | 5 | 137 | 159 | 0 |
| | 6 | 4 | 1 | 2 | 3 | 277 | 5 | 14 |
| | 7 | 1 | 2 | 2 | 4 | 278 | 21 | 0 |
| | 8 | 0 | 6 | 5 | 11 | 174 | 86 | 40 |
| • 29 dias | 1 | 2 | 0 | 3 | 3 | 143 | 0 | 155 |
| | 2 | 1 | 2 | 4 | 6 | 168 | 41 | 90 |
| | 3 | 0 | 2 | 5 | 7 | 148 | 24 | 128 |
| | 4 | 1 | 6 | 6 | 12 | 164 | 110 | 25 |
| | 5 | 2 | 0 | 3 | 3 | 293 | 0 | 5 |
| | 6 | 248 | 0 | 1 | 1 | 52 | 0 | 0 |
| | 7 | 8 | 3 | 1 | 4 | 207 | 82 | 3 |
| | - | - | - | - | - | - | - | - |
| • 36 dias | 1 | 0 | 2 | 3 | 5 | 224 | 46 | 30 |
| | 2 | 1 | 10 | 2 | 12 | 65 | 156 | 78 |
| | 3 | 0 | 3 | 4 | 7 | 81 | 164 | 55 |
| | 4 | 0 | 1 | 3 | 4 | 155 | 16 | 129 |
| | 5 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 292 | 7 |
| | 6 | 2 | 0 | 3 | 3 | 227 | 0 | 71 |
| | 7 | 3 | 2 | 0 | 2 | 0 | 170 | 127 |
| | 8 | 0 | 8 | 6 | 14 | 75 | 178 | 47 |

ANEXO 41- TESTE DA CRUZ ELEVADA DADOS DESCRITIVOS DOS DIFERENTES SUBGRUPOS PARA O GRUPO NTBo-A. PORCENTAGEM (%); ENTRADAS NO BRAÇO ABERTO (EBA); ENTRADAS NO BRAÇO FECHADO (EBF); PORCENTAGEM DE TEMPO NO BRAÇO ABERTO (%TBA); PORCENTAGEM DE TEMPO NO BRAÇO FECHADO (%TBF); PORCENTAGEM DE TEMPO NO CAMPO NEUTRO (%TCN); NÚMERO DE QUEDAS (NQ).

| Subgrupos | Animal | Latência | %EBA | % EBF | %TBA | % TBF | %TCN | NQ |
|------------|--------|----------|------|-------|------|-------|------|----|
| ● 24 horas | 1 | 300 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| | 2 | 1 | 0 | 100 | 0 | 10,6 | 89,4 | 0 |
| | 3 | 1 | 0 | 100 | 0 | 77,6 | 22,4 | 0 |
| | 4 | 1 | 50 | 50 | 19,3 | 79 | 1,7 | 1 |
| | 5 | 4 | 100 | 0 | 16,6 | 0 | 83,4 | 1 |
| | 6 | 3 | 60 | 40 | 12 | 86,6 | 11,4 | 1 |
| | 7 | 1 | 50 | 50 | 41,6 | 40 | 18,4 | 0 |
| | 8 | 2 | 0 | 100 | 8 | 88 | 4 | 0 |
| ● 8 dias | 1 | 0 | 0 | 100 | 0 | 82 | 18 | 0 |
| | 2 | 0 | 40 | 60 | 15,6 | 81,6 | 2,8 | 0 |
| | 3 | 0 | 100 | 0 | 88,3 | 0 | 11,7 | 0 |
| | 4 | 2 | 25 | 75 | 47,6 | 42 | 10,4 | 1 |
| | 5 | 1 | 40 | 60 | 3,33 | 92,3 | 4,4 | 0 |
| | 6 | 4 | 50 | 50 | 22 | 56,3 | 21,7 | 0 |
| | 7 | 2 | 75 | 25 | 73,3 | 17 | 9,7 | 1 |
| | 8 | 0 | 37,5 | 62,5 | 15 | 55 | 30 | 2 |
| ● 15 dias | 1 | 0 | 50 | 50 | 8 | 88,3 | 3,7 | 0 |
| | 2 | 4 | 0 | 100 | 0 | 91,6 | 8,4 | 0 |
| | 3 | 4 | 40 | 60 | 13 | 59,3 | 37,7 | 0 |
| | 4 | 1 | 0 | 100 | 0 | 83 | 17 | 0 |
| | 5 | 7 | 9 | 91 | 71,3 | 6 | 22,7 | 0 |
| | 6 | 0 | 0 | 100 | 0 | 99 | 1 | 0 |
| | 7 | 1 | 20 | 80 | 3 | 88 | 9 | 0 |
| | 8 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 1 |
| ● 22 dias | 1 | 6 | 100 | 0 | 97,6 | 0 | 2,4 | 0 |
| | 2 | 4 | 75 | 25 | 35,6 | 32,3 | 32,1 | 0 |
| | 3 | 0 | 66,6 | 33,4 | 18,6 | 80 | 1,4 | 1 |
| | 4 | 0 | 66,6 | 33,4 | 99,6 | 0 | 0,4 | 0 |
| | 5 | 0 | 100 | 0 | 74,3 | 0 | 25,7 | 1 |
| | 6 | 0 | 28,5 | 71,5 | 16,6 | 75,6 | 7,8 | 1 |
| | 7 | 0 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 8 | 1 | 26,6 | 33,4 | 14 | 67 | 19 | 2 |
| ● 29 dias | 1 | 1 | 100 | 0 | 99,6 | 0 | 0,4 | 1 |
| | 2 | 0 | 60 | 40 | 41 | 46,6 | 12,4 | 0 |
| | 3 | 1 | 57,1 | 42,9 | 28,3 | 59 | 12,7 | 0 |
| | 4 | 4 | 0 | 100 | 1,6 | 29,6 | 67,8 | 0 |
| | 5 | 0 | 60 | 40 | 73,3 | 12 | 14,7 | 1 |
| | 6 | 4 | 70 | 30 | 64,3 | 19 | 16,7 | 0 |
| | 7 | 3 | 100 | 0 | 58 | 0 | 42 | 0 |
| | 8 | 1 | 100 | 0 | 97,3 | 0 | 2,7 | 0 |
| ● 36 dias | 1 | 0 | 42,8 | 57,1 | 32 | 56,6 | 11,4 | 0 |
| | 2 | 0 | 100 | 0 | 98,6 | 0 | 1,4 | 0 |
| | 3 | 0 | 60 | 40 | 15 | 41,6 | 43,4 | 1 |
| | 4 | 1 | 75 | 25 | 46,3 | 41,3 | 12,4 | 3 |
| | 5 | 0 | 50 | 50 | 6,6 | 83 | 10,4 | 1 |
| | 6 | 0 | 66,6 | 33,4 | 12 | 88 | 0 | 2 |
| | 7 | 2 | 25 | 75 | 18,6 | 49 | 32,4 | 0 |
| | 8 | 2 | 25 | 75 | 0,3 | 90,3 | 9,4 | 0 |

ANEXO 42: - TESTE DA CRUZ ELEVADA DADOS DESCRITIVOS DOS DIFERENTES SUBGRUPOS PARA O GRUPO SSI. PORCENTAGEM (%); ENTRADAS NO BRAÇO ABERTO (EBA); ENTRADAS NO BRAÇO FECHADO (EBF); PORCENTAGEM DE TEMPO NO BRAÇO ABERTO (%TBA); PORCENTAGEM DE TEMPO NO BRAÇO FECHADO (%TBF); PORCENTAGEM DE TEMPO NO CAMPO NEUTRO (%TCN); NÚMERO DE QUEDAS (NQ).

| Subgrupos | Animal | Latência | %EBA | % EBF | %TBA | % TBF | %TCN | NQ |
|------------|--------|----------|------|-------|------|-------|------|----|
| ● 24 horas | 1 | 0 | 100 | 0 | 99,3 | 0 | 0,7 | 0 |
| | 2 | 0 | 22,2 | 87,8 | 25,6 | 68,3 | 6,1 | 0 |
| | 3 | 0 | 100 | 0 | 97,3 | 0 | 2,7 | 3 |
| | 4 | 0 | 38,4 | 61,6 | 24 | 48,6 | 27,4 | 0 |
| | 5 | 1 | 33,3 | 66,7 | 19 | 73,6 | 7,4 | 0 |
| | 6 | 3 | 75 | 25 | 2,6 | 94,3 | 3,1 | 0 |
| | 7 | 1 | 14,2 | 85,8 | 64,3 | 24 | 11,7 | 0 |
| | 8 | 1 | 25 | 75 | 20 | 74,6 | 5,4 | 0 |
| ● 8 dias | 1 | 0 | 33,3 | 66,7 | 5 | 87,3 | 7,7 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | 100 | 0 | 58,3 | 41,7 | 0 |
| | 3 | 4 | 25 | 75 | 4,3 | 84,6 | 11,1 | 0 |
| | 4 | 0 | 43,7 | 56,3 | 40 | 56,6 | 3,4 | 1 |
| | 5 | 1 | 40 | 60 | 20,3 | 50,6 | 29,1 | 0 |
| | 6 | 3 | 37,5 | 62,5 | 15 | 62 | 23 | 1 |
| | 7 | 0 | 70 | 30 | 85,6 | 6 | 8,4 | 0 |
| | 8 | 0 | 0 | 100 | 0 | 88 | 12 | 0 |
| ● 15dias | 1 | 0 | 33,3 | 66,7 | 1,6 | 90 | 8,4 | 1 |
| | 2 | 0 | 0 | 100 | 0 | 40,6 | 59,4 | 1 |
| | 3 | 0 | 20 | 80 | 0,6 | 93,3 | 6,1 | 1 |
| | 4 | 6 | 33,3 | 66,7 | 7 | 89 | 4 | 0 |
| | 5 | 4 | 0 | 100 | 0 | 1,3 | 98,7 | 0 |
| | 6 | 4 | 50 | 50 | 13,3 | 80 | 6,7 | 0 |
| | 7 | 7 | 66,7 | 33,3 | 10,3 | 71,6 | 18,4 | 1 |
| | 8 | 8 | 0 | 100 | 0 | 97,3 | 2,7 | 1 |
| ● 22 dias | 1 | 6 | 100 | 0 | 96,3 | 0 | 3,7 | 0 |
| | 2 | 1 | 100 | 0 | 99,3 | 0 | 0,7 | 0 |
| | 3 | 1 | 60 | 40 | 31,6 | 60 | 8,4 | 0 |
| | 4 | 0 | 50 | 50 | 16,3 | 60 | 23,7 | 1 |
| | 5 | 4 | 60 | 40 | 53 | 45,6 | 1,4 | 2 |
| | 6 | 4 | 33,3 | 66,7 | 1,6 | 92,3 | 6,1 | 0 |
| | 7 | 1 | 50 | 50 | 7 | 92,6 | 0,4 | 0 |
| | 8 | 0 | 54,5 | 45,5 | 28,6 | 58 | 13,4 | 2 |
| ● 29 dias | 1 | 2 | 0 | 100 | 0 | 47,6 | 52,4 | 0 |
| | 2 | 1 | 33,3 | 66,7 | 13,6 | 56 | 20,4 | 1 |
| | 3 | 0 | 40 | 60 | 8 | 49,3 | 42,7 | 0 |
| | 4 | 1 | 50 | 50 | 36,6 | 54,6 | 8,4 | 0 |
| | 5 | 2 | 0 | 100 | 0 | 97,6 | 2,4 | 0 |
| | 6 | 248 | 0 | 100 | 0 | 17,3 | 82,7 | 0 |
| | 7 | 8 | 75 | 25 | 27,3 | 69 | 3,7 | 0 |
| | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ● 36 dias | 1 | 0 | 40 | 60 | 15,3 | 74,6 | 10,1 | 2 |
| | 2 | 1 | 83,3 | 16,7 | 52 | 21,6 | 26,4 | 3 |
| | 3 | 0 | 42,8 | 57,2 | 54,6 | 27 | 18,4 | 2 |
| | 4 | 0 | 25 | 75 | 5,3 | 51,6 | 43,1 | 0 |
| | 5 | 1 | 100 | 0 | 97,3 | 0 | 2,7 | 0 |
| | 6 | 2 | 0 | 100 | 0 | 75,6 | 24,4 | 0 |
| | 7 | 3 | 100 | 0 | 56,6 | 0 | 43,4 | 0 |
| | 8 | 0 | 57,1 | 42,9 | 59,3 | 25 | 25,7 | 0 |

ANEXO 43: - ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA ENTRE OS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBo-A E SSI. TESTE DA CRUZ ELEVADA – LATÊNCIA. (GRUPO 1) NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A; (GRUPO 2) SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9%; (MIN.) MÍNIMO; (MAX) MÁXIMO. † T- STUDENT TESTE, ‡ MANN-WHITNEY TEST. SIGNIFICÂNCIA $P < 0,05$. VALORES APRESENTADOS EM SEGUNDOS.

| | Grupo | n | Média | Desvio Padrão | Mediana | Min. | Max | $p^{\dagger,\ddagger}$ 1 versus 2 |
|------------|-------|---|-------|---------------|---------|------|-----|--------------------------------------|
| ● 24 horas | 1 | 8 | 39,3 | 105,4 | 1,5 | 1 | 300 | 0,243 [†] |
| | 2 | 8 | 0,75 | 1,03 | 0,5 | 0 | 3 | |
| ● 8 dias | 1 | 8 | 1,13 | 1,45 | 0,5 | 0 | 4 | 0,664 [†] |
| | 2 | 8 | 1 | 1,60 | 0 | 0 | 4 | |
| ● 15 dias | 1 | 8 | 2,75 | 2,60 | 2,5 | 0 | 7 | 0,643 [†] |
| | 2 | 8 | 3,63 | 3,29 | 4 | 0 | 8 | |
| ● 22 dias | 1 | 8 | 1,38 | 2,32 | 0 | 0 | 6 | 0,526 [†] |
| | 2 | 8 | 2,13 | 2,23 | 1 | 0 | 6 | |
| ● 29 dias | 1 | 8 | 1,75 | 1,66 | 1 | 0 | 4 | 0,344 [‡] |
| | 2 | 7 | 37,43 | 92,8 | 2 | 0 | 248 | |
| ● 36 dias | 1 | 8 | 0,63 | 0,91 | 0 | 0 | 2 | 0,689 [†] |
| | 2 | 8 | 0,88 | 1,12 | 0,5 | 0 | 3 | |

ANEXO 44: - ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA ENTRE OS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBo-A E SSI. TESTE DA CRUZ ELEVADA - PORCENTAGEM DE ENTRADAS NO BRAÇO ABERTO.

(GRUPO 1) NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A; (GRUPO 2) SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9%; (MIN.) MÍNIMO; (MAX) MÁXIMO. † T-STUDENT TESTE, ‡ MANN-WHITNEY TESTE. SIGNIFICÂNCIA P<0,05. VALORES APRESENTADOS EM PORCENTAGEM DE ENTRADAS.

| | Grupo | N | Média | Desvio Padrão | Mediana | Min. | Max | p ^{†‡} 1 versus 2 |
|------------|-------|---|-------|---------------|---------|------|-----|-------------------------------|
| ● 24 horas | 1 | 8 | 32,5 | 38,07 | 25 | 0 | 100 | 0,078 [†] |
| | 2 | 8 | 51,01 | 35,27 | 35,8 | 14 | 100 | |
| ● 8 dias | 1 | 8 | 45,94 | 30,41 | 40 | 0 | 100 | 0,848 [†] |
| | 2 | 8 | 31,19 | 23,20 | 35,4 | 0 | 70 | |
| ● 15 dias | 1 | 8 | 14,88 | 20,03 | 4,50 | 0 | 50 | 0,651 [†] |
| | 2 | 8 | 25,41 | 25,07 | 26,65 | 0 | 67 | |
| ● 22 dias | 1 | 8 | 57,91 | 36,22 | 66,60 | 0 | 100 | 0,206 [†] |
| | 2 | 8 | 63,48 | 24,04 | 57,25 | 33 | 100 | |
| ● 29 dias | 1 | 8 | 68,39 | 33,69 | 65 | 0 | 100 | 0,100 [‡] |
| | 2 | 7 | 28,33 | 29,48 | 33,30 | 0 | 75 | |
| ● 36 dias | 1 | 8 | 55,55 | 25,51 | 55 | 25 | 100 | 0,776 [†] |
| | 2 | 8 | 56,03 | 36,14 | 49,95 | 0 | 100 | |

ANEXO 45: - ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA ENTRE OS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBo-A E SSI. TESTE DA CRUZ ELEVADA - PORCENTAGEM DE ENTRADAS NO BRAÇO FECHADO.

(GRUPO 1) NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A; (GRUPO 2) SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9%; (MIN.) MÍNIMO; (MAX) MÁXIMO. † T-STUDENT TESTE, ‡ MANN-WHITNEY TESTE. SIGNIFICÂNCIA $P < 0,05$. VALORES APRESENTADOS EM PORCENTAGEM DE ENTRADAS.

| | Grupo | N | Média | Desvio Padrão | Mediana | Min. | Max | $p^{\dagger,\ddagger}$ 1 versus 2 |
|------------|-------|---|-------|---------------|---------|------|-----|--------------------------------------|
| ● 24 horas | 1 | 8 | 55 | 42,08 | 50 | 0 | 100 | 0,206 [†] |
| | 2 | 8 | 50,24 | 36,59 | 64,15 | 0 | 88 | |
| ● 8 dias | 1 | 8 | 54,06 | 30,41 | 60 | 0 | 100 | 0,848 [†] |
| | 2 | 8 | 68,81 | 23,20 | 64,60 | 30 | 100 | |
| ● 15 dias | 1 | 8 | 72,63 | 35,02 | 85,50 | 0 | 100 | 0,684 [†] |
| | 2 | 8 | 74,59 | 25,07 | 73,35 | 33 | 100 | |
| ● 22 dias | 1 | 8 | 37,09 | 33,97 | 33,40 | 0 | 100 | 0,111 [†] |
| | 2 | 8 | 36,53 | 24,04 | 42,75 | 0 | 67 | |
| ● 29 dias | 1 | 8 | 31,61 | 33,69 | 35 | 0 | 100 | 0,100 [‡] |
| | 2 | 7 | 71,67 | 29,48 | 66,70 | 25 | 100 | |
| ● 36 dias | 1 | 8 | 44,44 | 25,50 | 45 | 0 | 75 | 0,695 [†] |
| | 2 | 8 | 43,98 | 36,14 | 50,05 | 0 | 100 | |

ANEXO 46- ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA ENTRE OS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBo-A E SSI. TESTE DA CRUZ ELEVADA - PORCENTAGEM DE TEMPO NO BRAÇO ABERTO. (GRUPO 1) NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A; (GRUPO 2) SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9%; (MIN.) MÍNIMO; (MAX) MÁXIMO. † T- STUDENT TESTE, ‡ MANN-WHITNEY TESTE. SIGNIFICÂNCIA $P < 0,05$. VALORES APRESENTADOS EM PORCENTAGEM DE TEMPO.

| | Grupo | n | Média | Desvio Padrão | Mediana | Min. | Max | $p^{\dagger, \ddagger}$ 1 versus 2 |
|------------|-------|---|-------|---------------|---------|------|------|---------------------------------------|
| ● 24 horas | 1 | 8 | 12,19 | 14,13 | 10 | 0 | 41,6 | 0,043[†] |
| | 2 | 8 | 44,01 | 37,72 | 24,80 | 2,6 | 99,3 | |
| ● 8 dias | 1 | 8 | 33,14 | 32,97 | 18,80 | 0 | 88,3 | 0,769 [†] |
| | 2 | 8 | 21,28 | 29,24 | 10 | 0 | 85,6 | |
| ● 15 dias | 1 | 8 | 11,91 | 24,46 | 1,50 | 0 | 71,3 | 0,581 [†] |
| | 2 | 8 | 4,10 | 5,35 | 1,10 | 0 | 13,3 | |
| ● 22 dias | 1 | 8 | 44,54 | 39,96 | 27,10 | 0 | 99,6 | 0,887 [†] |
| | 2 | 8 | 41,71 | 38,09 | 30,10 | 1,6 | 99,3 | |
| ● 29 dias | 1 | 8 | 57,93 | 33,59 | 61,15 | 1,6 | 99,6 | 0,006[‡] |
| | 2 | 7 | 12,21 | 14,60 | 8 | 0 | 36,6 | |
| ● 36 dias | 1 | 8 | 28,68 | 31,78 | 16,80 | 0,3 | 98,6 | 0,407 [†] |
| | 2 | 8 | 42,55 | 33,06 | 53,30 | 0 | 97,3 | |

ANEXO 47 - Análise Descritiva e Comparativa entre os Diferentes Subgrupos do Grupo NTBo-A e SSI. Teste da Cruz Elevada - Porcentagem de Tempo no Braço Fechado.

(Grupo 1) Neurotoxina Botulínica do Tipo-A; (Grupo 2) Solução Salina Isotônica 0,9%; (Min.) Mínimo; (Max) Máximo; † t-Student Teste, ‡ Mann-Whitney Teste. Significância $p < 0,05$. Valores apresentados em porcentagem de tempo.

| | Grupo | n | Média | Desvio Padrão | Mediana | Min. | Max | $p^{\dagger,\ddagger}$ 1 versus 2 |
|------------|-------|---|-------|---------------|---------|-------|-------|--------------------------------------|
| ● 24 horas | 1 | 8 | 47,73 | 39,63 | 58,80 | 0 | 88 | 0,992 [†] |
| | 2 | 8 | 47,93 | 36,06 | 58,45 | 0 | 94,3 | |
| ● 8 dias | 1 | 8 | 53,27 | 32,60 | 55,65 | 0 | 92,3 | 0,584 [†] |
| | 2 | 8 | 61,67 | 27,08 | 60,15 | 6 | 88 | |
| ● 15 dias | 1 | 8 | 64,40 | 39,63 | 85,50 | 0 | 99 | 0,748 [†] |
| | 2 | 8 | 70,38 | 33,24 | 84,50 | 1,3 | 97,3 | |
| ● 22 dias | 1 | 8 | 44,36 | 41,23 | 49,65 | 0 | 100 | 0,733 [†] |
| | 2 | 8 | 51,06 | 35,61 | 59 | 0 | 92,6 | |
| ● 29 dias | 1 | 8 | 20,77 | 22,61 | 15,50 | 0 | 59 | 0,210 [‡] |
| | 2 | 7 | 55,91 | 24,20 | 54,60 | 17,30 | 97,60 | |
| ● 36 dias | 1 | 8 | 56,22 | 30,56 | 52,80 | 0 | 90,3 | 0,172 [†] |
| | 2 | 8 | 34,42 | 29,95 | 26 | 0 | 75,6 | |

ANEXO 48 - ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA ENTRE OS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBo-A E SSI. TESTE DA CRUZ ELEVADA - PORCENTAGEM DE TEMPO NO CAMPO NEUTRO.

(GRUPO 1) NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A; (GRUPO 2) SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9%; (MIN.) MÍNIMO; (MAX) MÁXIMO. † T- STUDENT TESTE, ‡ MANN-WHITNEY TESTE. SIGNIFICÂNCIA $P < 0,05$. VALORES APRESENTADOS EM PORCENTAGEM DE TEMPO.

| | Grupo | n | Média | Desvio Padrão | Mediana | Min. | Max | $p^{\dagger,\ddagger}$ 1 versus 2 |
|------------|-------|---|-------|---------------|---------|------|------|--------------------------------------|
| ● 24 horas | 1 | 8 | 41,33 | 41,86 | 20,40 | 1,7 | 100 | 0,045 [†] |
| | 2 | 8 | 8,06 | 8,50 | 5,75 | 0,7 | 27,4 | |
| ● 8 dias | 1 | 8 | 13,58 | 9,13 | 11,05 | 2,8 | 30 | 0,549 [†] |
| | 2 | 8 | 17,05 | 13,08 | 11,55 | 3,4 | 41,7 | |
| ● 15 dias | 1 | 8 | 24,93 | 32,55 | 13 | 1 | 100 | 0,972 [†] |
| | 2 | 8 | 25,55 | 34,97 | 7,55 | 2,7 | 98,7 | |
| ● 22 dias | 1 | 8 | 11,10 | 12,73 | 5,10 | 0 | 32,1 | 0,478 [†] |
| | 2 | 8 | 7,22 | 7,99 | 4,90 | 0,4 | 23,7 | |
| ● 29 dias | 1 | 8 | 21,17 | 22,65 | 13,70 | 0,4 | 67,8 | 0,563 [‡] |
| | 2 | 7 | 30,38 | 30,14 | 20,40 | 2,4 | 82,7 | |
| ● 36 dias | 1 | 8 | 15,10 | 15,07 | 10,90 | 0 | 43,4 | 0,232 [†] |
| | 2 | 8 | 24,27 | 14,28 | 25,05 | 2,7 | 43,4 | |

ANEXO 49 - ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA ENTRE OS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBo-A E SSI. TESTE DA CRUZ ELEVADA - NÚMERO DE QUEDAS. (GRUPO 1) NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A; (GRUPO 2) SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9%; (MIN.) MÍNIMO; (MAX) MÁXIMO. † T- STUDENT TESTE, ‡ MANN-WHITNEY TESTE. SIGNIFICÂNCIA $P < 0,05$. VALORES APRESENTADOS EM UNIDADES.

| | Grupo | n | Média | Desvio Padrão | Mediana | Min. | Max | $p^{\dagger, \ddagger}$ 1 versus 2 |
|------------|-------|---|-------|---------------|---------|------|-----|---------------------------------------|
| ● 24 horas | 1 | 8 | 0,37 | 0,51 | 0 | 0 | 1 | 1^{\dagger} |
| | 2 | 8 | 0,37 | 1,06 | 0 | 0 | 3 | |
| ● 8 dias | 1 | 8 | 0,50 | 0,75 | 0 | 0 | 2 | 0,438 [†] |
| | 2 | 8 | 0,25 | 0,42 | 0 | 0 | 1 | |
| ● 15 dias | 1 | 8 | 0,12 | 0,35 | 0 | 0 | 1 | 0,041[†] |
| | 2 | 8 | 0,62 | 0,51 | 1 | 0 | 1 | |
| ● 22 dias | 1 | 8 | 0,62 | 0,74 | 0,5 | 0 | 2 | 1^{\dagger} |
| | 2 | 8 | 0,62 | 0,91 | 0 | 0 | 2 | |
| ● 29 dias | 1 | 8 | 0,25 | 0,46 | 0 | 0 | 1 | 0,617 [‡] |
| | 2 | 7 | 0,14 | 0,37 | 0 | 0 | 1 | |
| ● 36 dias | 1 | 8 | 0,87 | 1,12 | 0,50 | 0 | 3 | 1^{\dagger} |
| | 2 | 8 | 0,87 | 1,24 | 0 | 0 | 3 | |

ANEXO 50- ANÁLISE ESTATÍSTICA DESCRITIVA E COMPARATIVA GLOBAL (POR GRUPO) DO TESTE DA CRUZ ELEVADA PARA TODAS AS VARIÁVEIS ESTUDADAS. PORCENTAGEM DE ENTRADAS NO BRAÇO ABERTO (%EBA), PORCENTAGEM DE ENTRADAS NO BRAÇO FECHADO (%EBF); PORCENTAGEM DE TEMPO NO BRAÇO ABERTO (%TBA); PORCENTAGEM DE TEMPO NO BRAÇO FECHADO (%TBF); PORCENTAGEM DE TEMPO NO CAMPO NEUTRO (%TCN) E NÚMERO DE QUEDAS (NQ). NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A (GRUPO 1); SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9% (GRUPO 2). ‡ MANN-WHITNEY TESTE. SIGNIFICÂNCIA $P < 0,05$. OS VALORES SÃO APRESENTADOS EM PORCENTAGEM DE TEMPO (%EBA, %EBF, %TBA, % TBF, %TCN) OU EM UNIDADES (NQ).

| | Grupo | n | Média | Desvio Padrão | Mediana | Min. | Max | p‡ 1 versus 2 |
|------------|-------|----|-------|---------------|---------|------|------|------------------|
| ● Latência | 1 | 48 | 7,79 | 43,11 | 1 | 0 | 300 | 0,960 |
| | 2 | 47 | 7 | 35,98 | 1 | 0 | 248 | |
| ● % EBA | 1 | 48 | 45,86 | 34,58 | 50 | 0 | 100 | 0,594 |
| | 2 | 47 | 42,87 | 31,48 | 40 | 0 | 100 | |
| ● % EBF | 1 | 48 | 49,13 | 34,73 | 50 | 0 | 100 | 0,196 |
| | 2 | 47 | 57,33 | 31,66 | 60 | 0 | 100 | |
| ● % TBA | 1 | 48 | 31,39 | 33,40 | 16,60 | 0 | 99,6 | 0,617 |
| | 2 | 47 | 27,97 | 32,02 | 15,30 | 0 | 99,3 | |
| ● % TBF | 1 | 48 | 47,79 | 35,85 | 52 | 0 | 100 | 0,433 |
| | 2 | 47 | 53,51 | 31,86 | 58 | 0 | 97,6 | |
| ● % TCN | 1 | 48 | 21,20 | 25,89 | 12,05 | 0 | 100 | 0,726 |
| | 2 | 47 | 18,51 | 21,44 | 8,40 | 0,4 | 98,7 | |
| ● NQ | 1 | 48 | 0,45 | 0,71 | 0 | 0 | 3 | 0,876 |
| | 2 | 47 | 0,48 | 0,83 | 0 | 0 | 3 | |

ANEXO 51 - ANÁLISE DESCRITIVA DO TESTE DO CAMPO CLARO *VERSUS* ESCURO NOS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBo-A PARA LATÊNCIA, TEMPO NO CAMPO ESCURO E TEMPO NO CAMPO CLARO. VALORES EXPRESSOS EM SEGUNDOS E UNIDADES.

| Subgrupos | Animal | Latência | Entradas | Tempo Escuro | Tempo Claro |
|------------|--------|----------|----------|--------------|-------------|
| • 24 horas | 1 | 20 | 1 | 280 | 0 |
| | 2 | 15 | 2 | 270 | 15 |
| | 3 | 9 | 1 | 291 | 0 |
| | 4 | 15 | 2 | 274 | 11 |
| | 5 | 3 | 2 | 293 | 4 |
| | 6 | 10 | 3 | 286 | 4 |
| | 7 | 6 | 1 | 285 | 9 |
| | 8 | 70 | 2 | 13 | 217 |
| • 8 dias | 1 | 7 | 1 | 293 | 0 |
| | 2 | 13 | 2 | 275 | 12 |
| | 3 | 10 | 1 | 290 | 0 |
| | 4 | 23 | 1 | 277 | 0 |
| | 5 | 11 | 0 | 289 | 0 |
| | 6 | 14 | 9 | 244 | 42 |
| | 7 | 9 | 15 | 216 | 75 |
| | 8 | 56 | 12 | 187 | 57 |
| • 15 dias | 1 | 32 | 1 | 268 | 0 |
| | 2 | 2 | 1 | 298 | 0 |
| | 3 | 25 | 3 | 270 | 5 |
| | 4 | 11 | 7 | 281 | 8 |
| | 5 | 87 | 14 | 157 | 56 |
| | 6 | 5 | 3 | 277 | 18 |
| | 7 | 10 | 15 | 206 | 84 |
| | 8 | 300 | 0 | 0 | 0 |
| • 22 dias | 1 | 9 | 4 | 280 | 11 |
| | 2 | 36 | 13 | 220 | 44 |
| | 3 | 9 | 12 | 240 | 51 |
| | 4 | 6 | 5 | 285 | 9 |
| | 5 | 2 | 4 | 289 | 9 |
| | 6 | 1 | 14 | 189 | 110 |
| | 7 | 13 | 2 | 280 | 7 |
| | 8 | 22 | 3 | 210 | 68 |
| • 29 dias | 1 | 5 | 3 | 283 | 12 |
| | 2 | 8 | 1 | 276 | 16 |
| | 3 | 3 | 4 | 290 | 7 |
| | 4 | 4 | 1 | 285 | 11 |
| | 5 | 9 | 5 | 260 | 31 |
| | 6 | 2 | 9 | 280 | 18 |
| | 7 | 88 | 3 | 204 | 8 |
| | 8 | 300 | 0 | 0 | 0 |
| • 36 dias | 1 | 5 | 3 | 279 | 16 |
| | 2 | 4 | 1 | 286 | 10 |
| | 3 | 5 | 1 | 285 | 10 |
| | 4 | 3 | 7 | 283 | 14 |
| | 5 | 30 | 3 | 268 | 2 |
| | 6 | 11 | 8 | 271 | 18 |
| | 7 | 10 | 7 | 286 | 4 |
| | 8 | 40 | 2 | 259 | 1 |

ANEXO 52 - ANÁLISE DESCRITIVA DO TESTE DO CAMPO CLARO *VERSUS* ESCURO NOS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO SSI PARA LATÊNCIA, TEMPO NO CAMPO ESCURO E TEMPO NO CAMPO CLARO. VALORES EXPRESSOS EM SEGUNDOS E UNIDADES.

| Subgrupos | Animal | Latência | Entradas | Tempo Escuro | Tempo Claro |
|------------|--------|----------|----------|--------------|-------------|
| ● 24 horas | 1 | 46 | 1 | 254 | 0 |
| | 2 | 5 | 1 | 295 | 0 |
| | 3 | 1 | 1 | 299 | 0 |
| | 4 | 18 | 1 | 282 | 0 |
| | 5 | 2 | 0 | 298 | 0 |
| | 6 | 35 | 3 | 257 | 8 |
| | 7 | 2 | 5 | 257 | 41 |
| | 8 | 7 | 2 | 287 | 6 |
| ● 8 dias | 1 | 35 | 1 | 265 | 0 |
| | 2 | 23 | 1 | 277 | 0 |
| | 3 | 15 | 1 | 285 | 0 |
| | 4 | 35 | 1 | 265 | 0 |
| | 5 | 300 | 0 | 0 | 0 |
| | 6 | 36 | 11 | 187 | 77 |
| | 7 | 4 | 14 | 193 | 103 |
| | 8 | 300 | 0 | 0 | 0 |
| ● 15dias | 1 | 5 | 2 | 294 | 1 |
| | 2 | 5 | 2 | 294 | 1 |
| | 3 | 11 | 5 | 284 | 5 |
| | 4 | 11 | 4 | 286 | 3 |
| | 5 | 300 | 0 | 0 | 0 |
| | 6 | 6 | 15 | 175 | 119 |
| | 7 | 1 | 1 | 291 | 8 |
| | 8 | 20 | 3 | 248 | 32 |
| ● 22 dias | 1 | 8 | 5 | 289 | 3 |
| | 2 | 9 | 16 | 249 | 42 |
| | 3 | 17 | 5 | 273 | 10 |
| | 4 | 16 | 8 | 270 | 14 |
| | 5 | 75 | 3 | 207 | 18 |
| | 6 | 5 | 1 | 290 | 5 |
| | 7 | 43 | 3 | 253 | 4 |
| | 8 | 9 | 6 | 258 | 33 |
| ● 29 dias | 1 | 3 | 2 | 290 | 7 |
| | 2 | 4 | 4 | 281 | 15 |
| | 3 | 6 | 12 | 237 | 57 |
| | 4 | 4 | 1 | 285 | 11 |
| | 5 | 4 | 3 | 289 | 7 |
| | 6 | 13 | 2 | 281 | 6 |
| | 7 | 4 | 1 | 267 | 29 |
| | - | - | - | - | - |
| ● 36 dias | 1 | 4 | 4 | 283 | 13 |
| | 2 | 5 | 2 | 280 | 15 |
| | 3 | 6 | 5 | 263 | 31 |
| | 4 | 3 | 9 | 276 | 21 |
| | 5 | 300 | 0 | 0 | 0 |
| | 6 | 8 | 2 | 288 | 4 |
| | 7 | 12 | 3 | 286 | 2 |
| | 8 | 7 | 7 | 284 | 9 |

ANEXO 53 - ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA ENTRE OS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBo-A E SSI. TESTE DO CAMPO CLARO VERSUS ESCURO – LATÊNCIA PARA A ENTRADA NO CAMPO ESCURO. (GRUPO 1) NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A; (GRUPO 2) SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9%; (MIN.) MÍNIMO; (MAX) MÁXIMO. † T- STUDENT TESTE, ‡ MANN-WHITNEY TESTE. SIGNIFICÂNCIA $P < 0,05$. VALORES APRESENTADOS EM SEGUNDOS.

| | Grupo | n | Média | Desvio Padrão | Mediana | Min. | Max | $p^{\dagger, \ddagger}$ 1 versus 2 |
|------------|-------|---|-------|---------------|---------|------|-----|---------------------------------------|
| ● 24 horas | 1 | 8 | 18,50 | 21,50 | 12,50 | 3 | 70 | 0,382 [†] |
| | 2 | 8 | 14,50 | 17,17 | 6 | 1 | 46 | |
| ● 8 dias | 1 | 8 | 17,87 | 16,14 | 12 | 7 | 56 | 0,065 [†] |
| | 2 | 8 | 93,5 | 127,93 | 35 | 4 | 300 | |
| ● 15 dias | 1 | 8 | 59 | 101,15 | 18 | 2 | 300 | 0,786 [†] |
| | 2 | 8 | 44,87 | 103,24 | 8,5 | 1 | 300 | |
| ● 22 dias | 1 | 8 | 12,50 | 11,65 | 9 | 1 | 36 | 0,382 [†] |
| | 2 | 8 | 22,75 | 24,28 | 12,50 | 5 | 75 | |
| ● 29 dias | 1 | 8 | 52,37 | 104,19 | 6,5 | 2 | 300 | 0,463 [‡] |
| | 2 | 7 | 5,42 | 3,45 | 4 | 3 | 13 | |
| ● 36 dias | 1 | 8 | 13,50 | 13,82 | 7,5 | 3 | 40 | 0,437 [†] |
| | 2 | 8 | 43,12 | 103,83 | 6,5 | 3 | 300 | |

ANEXO 54 - ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA ENTRE OS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBo-A E SSI. TESTE DO CAMPO CLARO VERSUS ESCURO – ENTRADAS NO CAMPO ESCURO.

(GRUPO 1) NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A; (GRUPO 2) SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9%; (MIN.) MÍNIMO; (MAX) MÁXIMO. † T- STUDENT TESTE, ‡ MANN-WHITNEY TESTE. SIGNIFICÂNCIA $P < 0,05$. VALORES APRESENTADOS EM UNIDADES.

| | Grupo | N | Média | Desvio Padrão | Mediana | Min. | Max | $p^{\dagger, \ddagger}$ 1 versus 2 |
|------------|-------|---|-------|---------------|---------|------|-----|---------------------------------------|
| ● 24 horas | 1 | 8 | 1,75 | 0,70 | 2 | 1 | 3 | 1^{\dagger} |
| | 2 | 8 | 1,75 | 1,58 | 1 | 0 | 5 | |
| ● 8 dias | 1 | 8 | 5,12 | 5,93 | 1,5 | 0 | 15 | 0,610 [†] |
| | 2 | 8 | 3,63 | 5,55 | 1 | 0 | 14 | |
| ● 15 dias | 1 | 8 | 5,50 | 5,95 | 3 | 0 | 15 | 0,586 [†] |
| | 2 | 8 | 4 | 4,72 | 2,5 | 0 | 15 | |
| ● 22 dias | 1 | 8 | 7,12 | 4,96 | 4,5 | 2 | 14 | 0,610 [†] |
| | 2 | 8 | 5,87 | 4,61 | 5 | 1 | 16 | |
| ● 29 dias | 1 | 8 | 3,25 | 2,86 | 3 | 0 | 9 | 0,953 [‡] |
| | 2 | 7 | 3,57 | 3,86 | 2 | 1 | 12 | |
| ● 36 dias | 1 | 8 | 4 | 2,87 | 3 | 1 | 8 | 1^{\dagger} |
| | 2 | 8 | 4 | 2,92 | 3,5 | 0 | 9 | |

ANEXO 55 - ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA ENTRE OS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBo-A E SSI. TESTE DO CAMPO CLARO VERSUS ESCURO – TEMPO DESPENDIDO NO CAMPO ESCURO. (GRUPO 1) NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A; (GRUPO 2) SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9%; (MIN.) MÍNIMO; (MAX) MÁXIMO. † T- STUDENT TESTE, ‡ MANN-WHITNEY TESTE. SIGNIFICÂNCIA P<0,05. VALORES APRESENTADOS EM SEGUNDOS.

| | Grupo | N | Média | Desvio Padrão | Mediana | Min. | Max | p ^{†‡} 1 versus 2 |
|------------|-------|---|--------|---------------|---------|------|-----|-------------------------------|
| ● 24 horas | 1 | 8 | 249 | 95,68 | 282,5 | 13 | 293 | 0,405 [†] |
| | 2 | 8 | 278,62 | 19,57 | 284,5 | 254 | 299 | |
| ● 8 dias | 1 | 8 | 258,87 | 39,37 | 276 | 187 | 293 | 0,114 [†] |
| | 2 | 8 | 184 | 119,38 | 229 | 0 | 285 | |
| ● 15 dias | 1 | 8 | 219,62 | 100,3 | 269 | 0 | 298 | 0,781 [†] |
| | 2 | 8 | 234 | 102,87 | 285 | 0 | 294 | |
| ● 22 dias | 1 | 8 | 249,12 | 39,38 | 260 | 189 | 289 | 0,487 [†] |
| | 2 | 8 | 261,12 | 26,68 | 264 | 207 | 290 | |
| ● 29 dias | 1 | 8 | 234,75 | 98,81 | 278 | 0 | 290 | 0,353 [‡] |
| | 2 | 7 | 275,71 | 18,69 | 281 | 237 | 290 | |
| ● 36 dias | 1 | 8 | 277,12 | 10,04 | 281 | 259 | 286 | 0,910 [†] |
| | 2 | 8 | 245 | 99,30 | 281,50 | 0 | 288 | |

ANEXO 56 - ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA ENTRE OS DIFERENTES SUBGRUPOS DO GRUPO NTBo-A E SSI. TESTE DO CAMPO CLARO VERSUS ESCURO – TEMPO DESPENDIDO DENTRO DO CAMPO CLARO. (GRUPO 1) NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A; (GRUPO 2) SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9%; (MIN.) MÍNIMO; (MAX) MÁXIMO. † T-STUDENT TESTE, ‡ MANN-WHITNEY TESTE. SIGNIFICÂNCIA P<0,05. VALORES APRESENTADOS EM SEGUNDOS.

| | Grupo | N | Média | Desvio Padrão | Mediana | Min. | Max | p ^{†‡} 1 versus 2 |
|------------|-------|---|-------|---------------|---------|------|-----|-------------------------------|
| ● 24 horas | 1 | 8 | 32,5 | 74,73 | 6,5 | 0 | 217 | 0,357 [†] |
| | 2 | 8 | 6,87 | 14,15 | 0 | 0 | 41 | |
| ● 8 dias | 1 | 8 | 23,25 | 30,37 | 6 | 0 | 75 | 0,968 [†] |
| | 2 | 8 | 22,50 | 42,23 | 0 | 0 | 103 | |
| ● 15 dias | 1 | 8 | 21,37 | 31,50 | 6,5 | 0 | 84 | 0,989 [†] |
| | 2 | 8 | 21,12 | 40,90 | 4 | 0 | 119 | |
| ● 22 dias | 1 | 8 | 38,62 | 37,14 | 27,50 | 7 | 110 | 0,132 [†] |
| | 2 | 8 | 16,12 | 14,35 | 12 | 3 | 42 | |
| ● 29 dias | 1 | 8 | 12,87 | 9,20 | 11,50 | 0 | 31 | 0,955 [‡] |
| | 2 | 7 | 18,85 | 18,62 | 11 | 6 | 57 | |
| ● 36 dias | 1 | 8 | 9,37 | 6,47 | 10 | 1 | 18 | 0,575 [†] |
| | 2 | 8 | 11,87 | 10,48 | 11 | 0 | 31 | |

ANEXO 57 - ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA GLOBAL DO TESTE DO CAMPO CLARO VERSUS ESCURO PARA TODAS AS VARIÁVEIS ESTUDADAS. ENTRADAS DO CAMPO ESCURO PARA O CLARO (E); TEMPO NO CAMPO ESCURO (TE); TEMPO NO CAMPO CLARO (TC); (GRUPO 1) NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A; (GRUPO 2) SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9%; MÍNIMO (MIN.); MÁXIMO (MAX). †MANN-WHITNEY TESTE. SIGNIFICÂNCIA $P < 0,05$. VALORES APRESENTADOS EM UNIDADES (E) OU EM SEGUNDOS (TE E TC).

| | Grupo | N | Média | Desvio Padrão | Mediana | Min. | Max | p^{\dagger} 1 versus 2 |
|------------|-------|----|--------|---------------|---------|------|-----|-----------------------------|
| • Latência | 1 | 48 | 28,91 | 60,59 | 10 | 1 | 300 | 0,620 [†] |
| | 2 | 47 | 38,04 | 82,07 | 8 | 1 | 300 | |
| • E | 1 | 48 | 4,45 | 4,44 | 3 | 0 | 15 | 0,500 [†] |
| | 2 | 47 | 3,80 | 4,05 | 2 | 0 | 16 | |
| • TE | 1 | 48 | 248,08 | 71,58 | 277 | 0 | 298 | 0,771 [†] |
| | 2 | 47 | 245,78 | 80,90 | 277 | 0 | 299 | |
| • TC | 1 | 48 | 23 | 38,05 | 10 | 0 | 217 | 0,205 [†] |
| | 2 | 47 | 16,17 | 26,08 | 6 | 0 | 119 | |

**ANEXO 58 - RANDOMIZAÇÃO DOS ANIMAIS DURANTE A SEGUNDA FASE DO ESTUDO
SEGUNDO OS RESULTADOS DO TESTE DO -20°C.**

| Animal | B ₁ | B ₂ | B _M | Cirurgia | 4D ₁ | 4D ₂ | 4D _M | 6D ₁ | 6D ₂ | 6D _M | Situação | Grupo |
|--------|----------------|----------------|----------------|----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------|-------|
| #1 | 12 | 8,09 | 10,04 | Amarra | 21,24 | 23,08 | 22,16 | 21,01 | 17,34 | 19,17 | Incluído | ASSI1 |
| #2 | 1 | 2,01 | 1,55 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #3 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #4 | 4 | 0 | 2 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #5 | 1,04 | 2,01 | 1,52 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #6 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #7 | 2 | 2 | 2 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #8 | 4 | 2,2 | 3,1 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #9 | 14,59 | 20,19 | 17,38 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #10 | 1 | 0 | 0,5 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #11 | 0,24 | 0,36 | 0,3 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #12 | 4 | 0,2 | 2,1 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #13 | 1,20 | 3,21 | 2,25 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #14 | 3,78 | 4,5 | 4,14 | Exposto | 6,54 | 12,58 | 9,56 | 9,27 | 10,34 | 9,80 | Incluído | EB1 |
| #15 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #16 | 1,41 | 2,33 | 1,87 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #17 | 6,7 | 11,15 | 8,92 | Amarra | 12,01 | 18,86 | 15,43 | 22,25 | 26,15 | 24,2 | Incluído | AB1 |
| #18 | 2,34 | 0 | 1,17 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #19 | 9,46 | 9,97 | 9,71 | Amarra | 11,02 | 18,77 | 14,89 | 10,06 | 20,27 | 15,16 | Incluído | ASSI2 |
| #20 | 3,3 | 5,93 | 4,61 | Amarra | 4,87 | 8,4 | 6,63 | 14,58 | 25,97 | 20,27 | Incluído | AB2 |
| #21 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #22 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #23 | 0 | 0,31 | 0,155 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #24 | 1,11 | 1,4 | 1,255 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #25 | 0,38 | 0,34 | 0,36 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #26 | 0,42 | 0 | 0,21 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #27 | 7,43 | 9,30 | 8,36 | Amarra | 11,36 | 27,20 | 19,28 | 10,56 | 12,79 | 11,67 | Excluído | - |
| #28 | 0 | 9,05 | 4,52 | Amarra | 29,85 | 26,02 | 27,93 | 16,78 | 34,49 | 25,63 | Incluído | AB3 |
| #29 | 1,73 | 11,17 | 6,45 | Amarra | 9,25 | 13,70 | 11,47 | 21,44 | 12,83 | 17,13 | Incluído | AB4 |
| #30 | 2,03 | 3,52 | 2,77 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #31 | 3,87 | 22,88 | 13,37 | Amarra | 0,92 | 14,08 | 7,5 | 3,11 | 21,7 | 12,40 | Excluído | - |
| #32 | 4,97 | 11,49 | 8,23 | Amarra | 21,22 | 18,53 | 19,87 | 30,63 | 19,21 | 24,92 | Incluído | AB5 |
| #33 | 6,76 | 3,5 | 5,13 | Amarra | 4,34 | 14,93 | 9,63 | 3,14 | 11,14 | 7,14 | Excluído | - |
| #34 | 17,15 | 10,86 | 14,00 | Exposto | 8,46 | 22,60 | 15,53 | 8,14 | 16,98 | 12,56 | Incluído | EB2 |
| #35 | 1,94 | 7,89 | 4,91 | Exposto | 6,18 | 17,86 | 12,02 | 9,84 | 9,67 | 9,75 | Incluído | EB3 |
| #36 | 2,39 | 3,04 | 2,71 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #37 | 10,79 | 5 | 7,89 | Amarra | 2,72 | 6,19 | 4,45 | 17,88 | 21,88 | 19,88 | Incluído | ASS3 |
| #38 | 3,03 | 15,02 | 9,02 | Exposto | 2,14 | 13,04 | 7,59 | 8,21 | 7,19 | 7,7 | Incluído | EB4 |
| #39 | 13,47 | 14,29 | 13,88 | Exposto | 20,04 | 23,47 | 21,75 | 11,72 | 9,53 | 10,62 | Incluído | ESSI1 |
| #40 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #41 | 0,26 | 0 | 0,13 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #42 | 3,81 | 3,48 | 3,64 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #43 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #44 | 3,99 | 6,07 | 5,03 | Amarra | 31,19 | 23,62 | 27,40 | 14,34 | 18,89 | 16,61 | Incluído | ASSI4 |
| #45 | 8,48 | 3,57 | 6,02 | Amarra | 12 | 17,58 | 14,79 | 17,17 | 15,56 | 16,36 | Incluído | ASSI5 |
| #46 | 0 | 2,58 | 1,29 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #47 | 13,68 | 11,61 | 12,64 | Exposto | 15,21 | 12,99 | 14,1 | 2,99 | 10,4 | 6,69 | Incluído | ESSI2 |
| #48 | 2,7 | 12,47 | 7,58 | Exposto | 3,99 | 2,66 | 3,32 | 4 | 10,45 | 7,22 | Incluído | ESSI3 |
| #49 | 10,46 | 20,52 | 15,49 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #50 | 6,32 | 9,39 | 7,85 | Amarra | 6,16 | 17,84 | 12 | 10,26 | 9,57 | 9,91 | Excluído | - |

ANEXO 59- RANDOMIZAÇÃO DOS ANIMAIS DURANTE A SEGUNDA FASE DO ESTUDO SEGUNDO OS RESULTADOS DO TESTE DO -20°C (CONTINUAÇÃO DO 27A). ESCORES DURANTE A PRIMEIRA AVALIAÇÃO BASAL (B₁); ESCORES DURANTE A SEGUNDA AVALIAÇÃO BASAL (B₂); ESCORES BASAIS MÉDIOS (B_M); PRIMEIRO ESCORE QUATRO DIAS APÓS A CIRURGIA (4D₁); SEGUNDO ESCORE QUATRO DIAS APÓS A CIRURGIA (4D₂); ESCORE MÉDIO QUATRO DIAS APÓS A CIRURGIA (4D_M); PRIMEIRO ESCORE SEIS DIAS APÓS A CIRURGIA (6D₁); SEGUNDO ESCORE SEIS DIAS APÓS A CIRURGIA (6D₂); ESCORE MÉDIO SEIS DIAS APÓS A CIRURGIA (6D_M); ANIMAL INCLUÍDO NÚMERO UM SUBMETIDO A AMARRA E TRATADO COM NEUROTOXINA BOTULÍNICA TIPO-A (AB₁); ANIMAL INCLUÍDO NÚMERO UM COM NERVO EXPOSTO SUBMETIDO A NEUROTOXINA BOTULÍNICA TIPO-A (EB₁); ANIMAL INCLUÍDO NÚMERO UM SUBMETIDO A AMARRA E TRATADO COM SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA (ASSI₁); ANIMAL INCLUÍDO NÚMERO UM SUBMETIDO A EXPOSIÇÃO DO NERVO E TRATADO COM SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA (ESSI₁).

| Animal | B ₁ | B ₂ | B _M | Cirurgia | 4D ₁ | 4D ₂ | 4D _M | 6D ₁ | 6D ₂ | 6D _M | Situação | Grupo |
|--------|----------------|----------------|----------------|----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------|-------|
| #51 | 2,6 | 3,2 | 2,9 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #52 | 0,89 | 4,97 | 2,93 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #53 | 3,39 | 4,73 | 4,06 | Amarra | 4,03 | 15,02 | 9,525 | 8,34 | 26,68 | 17,51 | Incluído | AB6 |
| #54 | 13,65 | 10,39 | 12,02 | Exposto | 0,95 | 0,61 | 0,78 | 0,84 | 1,12 | 0,98 | Incluído | EB5 |
| #55 | 0,72 | 0,79 | 0,755 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #56 | 9,38 | 1,63 | 5,505 | Amarra | 18,75 | 15,03 | 16,89 | 4,34 | 3,54 | 3,94 | Excluído | - |
| #57 | 1,04 | 10,27 | 5,655 | Exposto | 10,01 | 8,28 | 9,145 | 0 | 7,91 | 3,95 | Incluído | ESSI4 |
| #58 | 2,32 | 3,64 | 2,98 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #59 | 1,52 | 10,08 | 5,8 | Exposto | 0,97 | 1 | 0,985 | 2,26 | 0 | 1,13 | Incluído | EB6 |
| #60 | 0,33 | 2,59 | 1,46 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #61 | 3,3 | 7,09 | 5,195 | Amarra | 8,38 | 8,01 | 8,195 | 7,23 | 9,14 | 8,18 | Excluído | - |
| #62 | 7,52 | 2,87 | 5,195 | Amarra | 0,96 | 1,49 | 1,225 | 0,84 | 0 | 0,42 | Excluído | - |
| #63 | 1,88 | 3,72 | 2,8 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #64 | 4,65 | 17,03 | 10,84 | Exposto | 4,59 | 7,14 | 5,865 | 0 | 5,75 | 2,87 | Exposto | EB7 |
| #65 | 5,57 | 6,58 | 6,075 | Amarra | 10,4 | 11,79 | 11,09 | 7,08 | 13,77 | 10,42 | Incluído | AB7 |
| #66 | 2,58 | 0 | 1,29 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #67 | 0 | 7,23 | 3,615 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #68 | 0,97 | 3,16 | 2,065 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #69 | 0 | 9,43 | 4,715 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #70 | 1,02 | 0 | 0,51 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #71 | 0 | 0,23 | 0,115 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #72 | 9,42 | 8,04 | 8,73 | Amarra | 1,02 | 2,84 | 1,93 | 3,65 | 10,52 | 7,08 | Excluído | - |
| #73 | 4,2 | 11,21 | 7,705 | Amarra | 9,74 | 6,23 | 7,98 | 10,89 | 21,59 | 16,24 | Incluído | ASSI6 |
| #74 | 1,75 | 6,3 | 4,025 | Amarra | 0 | 1,77 | 0,885 | 0 | 23,98 | 11,99 | Incluído | ASSI7 |
| #75 | 0 | 0,4 | 0,2 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #76 | 0,38 | 0 | 0,19 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #77 | 0 | 1,13 | 0,565 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #78 | 0 | 0,7 | 0,35 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #79 | 1,8 | 1,66 | 1,73 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #80 | 13,44 | 5,62 | 9,53 | Amarra | 10,2 | 18,79 | 14,49 | 7,25 | 25,1 | 16,17 | Incluído | ASS8 |
| #81 | 1,88 | 0 | 0,94 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #82 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #83 | 0 | 17,24 | 8,62 | Exposto | 9,64 | 11,21 | 10,42 | 4,98 | 13,45 | 9,21 | Incluído | ESSI5 |
| #84 | 3,63 | 10,79 | 7,21 | Amarra | 11,09 | 16,85 | 13,97 | 8,16 | 32,02 | 20,09 | Incluído | AB8 |
| #85 | 1,42 | 13,17 | 7,295 | Exposto | 4,13 | 4,46 | 4,295 | 6,48 | 7,6 | 7,04 | Incluído | ESSI6 |
| #86 | 0,42 | 0 | 0,21 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #87 | 1,99 | 0,8 | 1,395 | - | - | - | - | - | - | - | Excluído | - |
| #88 | 0 | 9,43 | 4,71 | Exposto | 16,93 | 8,15 | 12,54 | 4,43 | 5,75 | 5,09 | Exposto | ESSI7 |
| #89 | 0 | 15,76 | 7,88 | Exposto | 0,66 | 7,16 | 3,91 | 0 | 9,83 | 4,91 | Exposto | ESSI8 |

ANEXO 60: - PESO DOS ANIMAIS NOS DIFERENTES MOMENTOS DA SEGUNDA FASE DO ESTUDO. VOLUME DE DROGA (NTBo-A e SSI) E NÚMERO DE UNIDADES DA NTBo-A APLICADAS. VALORES DESCRITOS EM GRAMAS E µL. ANIMAL NÚMERO UM SUBMETIDO A AMARRA E TRATADO COM NEUROTOXINA BOTULÍNICA TIPO-A (AB₁); ANIMAL NÚMERO UM COM NERVO EXPOSTO SUBMETIDO A NEUROTOXINA BOTULÍNICA TIPO-A (EB₁); ANIMAL NÚMERO UM SUBMETIDO A AMARRA E TRATADO COM SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA (ASSI₁); ANIMAL NÚMERO UM SUBMETIDO A EXPOSIÇÃO DO NERVO E TRATADO COM SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA (ESSI₁).

| Grupo | Animal | Peso Basal | Peso 6 dias | Peso 10 dias | Volume y litros | Unidades Botox | Identificação |
|------------------|--------|------------|-------------|--------------|-----------------|----------------|---------------|
| ● Amarra Botox | #1 | 192 | 220 | 234 | 6,60 | 3,30 | AB1 |
| | #2 | 192 | 230 | 246 | 6,90 | 3,45 | AB2 |
| | #3 | 158 | 165 | 180 | 4,97 | 2,47 | AB3 |
| | #4 | 157 | 186 | 193 | 5,58 | 2,79 | AB4 |
| | #5 | 134 | 155 | 174 | 4,65 | 2,32 | AB5 |
| | #6 | 152 | 150 | 151 | 4,5 | 2,25 | AB6 |
| | #7 | 122 | 145 | 162 | 4,35 | 2,17 | AB7 |
| | #8 | 153 | 181 | 201 | 5,4 | 2,7 | AB8 |
| ● Amarra SSI | #1 | 166 | 190 | 197 | 5,70 | - | ASSI1 |
| | #2 | 122 | 152 | 171 | 4,56 | - | ASSI2 |
| | #3 | 144 | 160 | 172 | 4,8 | - | ASSI3 |
| | #4 | 163 | 181 | 194 | 5,43 | - | ASSI4 |
| | #5 | 164 | 167 | 186 | 5,01 | - | ASSI5 |
| | #6 | 168 | 190 | 213 | 5,7 | - | ASSI6 |
| | #7 | 175 | 208 | 215 | 6,2 | - | ASSI7 |
| | #8 | 143 | 170 | 183 | 5,1 | - | ASSI8 |
| ● Controle Botox | #1 | 157 | 156 | 176 | 4,68 | 2,34 | EB1 |
| | #2 | 114 | 141 | 155 | 4,23 | 2,11 | EB2 |
| | #3 | 145 | 166 | 180 | 4,98 | 2,49 | EB3 |
| | #4 | 168 | 192 | 210 | 5,76 | 2,88 | EB4 |
| | #5 | 188 | 224 | 236 | 6,72 | 3,36 | EB5 |
| | #6 | 154 | 170 | 188 | 5,10 | 2,55 | EB6 |
| | #7 | 168 | 194 | 213 | 5,82 | 2,91 | EB7 |
| | #8 | - | - | - | - | - | - |
| ● Controle SSI | #1 | 128 | 154 | 171 | 4,62 | - | ESSI1 |
| | #2 | 152 | 182 | 199 | 5,46 | - | ESSI2 |
| | #3 | 153 | 146 | 170 | 4,36 | - | ESSI3 |
| | #4 | 179 | 215 | 222 | 6,40 | - | ESSI4 |
| | #5 | 159 | 183 | 187 | 5,49 | - | ESSI5 |
| | #6 | 126 | 161 | 182 | 4,81 | - | ESSI6 |
| | #7 | 145 | 186 | 185 | 5,58 | - | ESSI7 |
| | #8 | 166 | 178 | 199 | 5,34 | - | ESSI8 |

ANEXO 61 - VARIAÇÃO DO PESO NOS DIFERENTES GRUPOS DURANTE AS DIFERENTES ETAPAS NA SEGUNDA FASE DO ESTUDO. VALORES BASAIS (B); DIAS (D); PORCENTAGEM (%). OS RESULTADOS FORAM APRESENTADOS EM GRAMAS E PORCENTAGEM.

| Grupo | Animal | Peso 6d-B | Peso 10d - B | Peso 10d- 6d | Ganho de peso em % após 6 dias | Ganho de peso em % após 10dias |
|------------------|--------|-----------|--------------|--------------|--------------------------------|--------------------------------|
| ● Amarra Botox | #1 | 28 | 42 | 14 | 14,5 | 21,8 |
| | #2 | 38 | 54 | 16 | 19,7 | 28,1 |
| | #3 | 7 | 22 | 15 | 4,4 | 13,9 |
| | #4 | 29 | 36 | 7 | 18,4 | 22,9 |
| | #5 | 21 | 40 | 19 | 15,6 | 29,8 |
| | #6 | -2 | -1 | 1 | -1,3 | -0,6 |
| | #7 | 23 | 40 | 17 | 18,8 | 32,7 |
| | #8 | 28 | 48 | 20 | 18,3 | 31,3 |
| ● Amarra SSI | #1 | 24 | 31 | 7 | 14,4 | 18,6 |
| | #2 | 30 | 49 | 19 | 19,6 | 25,4 |
| | #3 | 16 | 29 | 12 | 11,1 | 20,1 |
| | #4 | 18 | 31 | 13 | 11 | 19 |
| | #5 | 3 | 22 | 19 | 1,8 | 13,4 |
| | #6 | 22 | 45 | 23 | 13 | 26,7 |
| | #7 | 33 | 40 | 7 | 12,7 | 22,8 |
| | #8 | 27 | 40 | 13 | 18,8 | 27,9 |
| ● Controle Botox | #1 | -1 | 19 | 18 | -0,6 | 12,1 |
| | #2 | 27 | 41 | 14 | 23,6 | 35,9 |
| | #3 | 21 | 35 | 14 | 14,4 | 24,1 |
| | #4 | 24 | 42 | 18 | 14,2 | 25 |
| | #5 | 36 | 48 | 12 | 19,1 | 25,5 |
| | #6 | 16 | 34 | 18 | 10,3 | 22 |
| | #7 | 26 | 45 | 19 | 15,4 | 26,7 |
| | #8 | - | - | - | - | - |
| ● Controle SSI | #1 | 26 | 43 | 17 | 20,3 | 33,5 |
| | #2 | 30 | 47 | 17 | 19,7 | 30,9 |
| | #3 | -7 | 17 | 24 | -4,5 | 11,1 |
| | #4 | 36 | 43 | 7 | 20,1 | 24,0 |
| | #5 | 24 | 28 | 4 | 15 | 17,6 |
| | #6 | 35 | 56 | 21 | 27,7 | 44,4 |
| | #7 | 41 | 40 | -1 | 28,2 | 27,5 |
| | #8 | 12 | 33 | 21 | 7,2 | 19,8 |

ANEXO 62– ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA DO PESO ENTRE OS DIFERENTES GRUPOS NOS DIFERENTES MOMENTOS DO ESTUDO. ANIMAIS SUBMETIDOS À AMARRA DO NERVO INFRA-ORBITAL E TRATADOS COM NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO A (GRUPO 1), ANIMAIS SUBMETIDOS À AMARRA DO NERVO INFRA-ORBITAL E TRATADOS COM SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9% (GRUPO 2), ANIMAIS SUBMETIDOS A EXPOSIÇÃO DO NERVO INFRA-ORBITAL E TRATADOS COM NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO A (GRUPO 3) E ANIMAIS SUBMETIDOS A EXPOSIÇÃO DO NERVO INFRA-ORBITAL E TRATADOS COM SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9% (GRUPO 4). SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA $p < 0.05$. [†]T- STUDENT TESTE, [‡]MANN-WHITNEY TESTE. VALORES APRESENTADOS EM GRAMAS E EM PORCENTAGEM DE GANHO DE PESO.

| | Grupo | n | Média | Desvio Padrão | Grupos | p ^{†,‡} |
|-----------------------------------|-------|---|--------|---------------|--------------------|--------------------|
| ● Peso Basal | 1 | 8 | 157,50 | 24,62 | 1 versus 2 | [†] 0,864 |
| | 2 | 8 | 155,63 | 17,67 | 1 versus 3 | [‡] 0,954 |
| | 3 | 7 | 156,29 | 23,09 | 1 versus 4 | [†] 0,556 |
| | 4 | 8 | 151,00 | 18,00 | 2 versus 3 | [‡] 0,816 |
| | | | | | 2 versus 4 | [†] 0,519 |
| | | | | 3 versus 4 | [‡] 0,451 | |
| ● Peso 6 dias | 1 | 8 | 179 | 31,85 | 1 versus 2 | [†] 0,895 |
| | 2 | 8 | 177,25 | 18,42 | 1 versus 3 | [‡] 0,867 |
| | 3 | 7 | 177,57 | 27,77 | 1 versus 4 | [†] 0,808 |
| | 4 | 8 | 175,63 | 21,77 | 2 versus 3 | [‡] 0,954 |
| | | | | | 2 versus 4 | [†] 0,874 |
| | | | | 3 versus 4 | [‡] 0,817 | |
| ● Peso 10 dias | 1 | 8 | 192,63 | 33,39 | 1 versus 2 | [†] 0,926 |
| | 2 | 8 | 191,38 | 16,70 | 1 versus 3 | [‡] 0,772 |
| | 3 | 7 | 194 | 27,25 | 1 versus 4 | [†] 0,810 |
| | 4 | 8 | 189,38 | 17,07 | 2 versus 3 | [‡] 0,954 |
| | | | | | 2 versus 4 | [†] 0,816 |
| | | | | 3 versus 4 | [‡] 0,728 | |
| ● Ganho de peso em % após 6 dias | 1 | 8 | 13,55 | 7,75 | 1 versus 2 | [†] 0,827 |
| | 2 | 8 | 12,80 | 5,50 | 1 versus 3 | [‡] 0,728 |
| | 3 | 7 | 13,77 | 7,60 | 1 versus 4 | [†] 0,514 |
| | 4 | 8 | 16,71 | 10,88 | 2 versus 3 | [‡] 0,602 |
| | | | | | 2 versus 4 | [†] 0,380 |
| | | | | 3 versus 4 | [‡] 0,298 | |
| ● Ganho de peso em % após 10 dias | 1 | 8 | 22,48 | 11,17 | 1 versus 2 | [†] 0,864 |
| | 2 | 8 | 21,73 | 4,87 | 1 versus 3 | [‡] 1 |
| | 3 | 7 | 24,47 | 7,02 | 1 versus 4 | [†] 0,514 |
| | 4 | 8 | 26,10 | 10,39 | 2 versus 3 | [‡] 0,452 |
| | | | | | 2 versus 4 | [†] 0,301 |
| | | | | 3 versus 4 | [‡] 0,908 | |

ANEXO 63 - TESTE DO - 20°C PARA OS ANIMAIS SUBMETIDOS À CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRA-ORBITAL E TRATADOS COM NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A (GRUPO 1). NÚMERO DO ANIMAL (#); ESCORES DO PRIMEIRO TESTE DO -20°C (1); ESCORES DO SEGUNDO TESTE DO -20°C (2); MÉDIA DOS ESCORES DA PRIMEIRA E SEGUNDA DETERMINAÇÃO DO TESTE DO -20°C (MÉDIA)

| Momento | Avaliação | Animal #1 | Animal #2 | Animal #3 | Animal #4 | Animal #5 | Animal #6 | Animal #7 | Animal #8 |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| • Basal | 1 | 6,70 | 3,30 | 0 | 1,73 | 4,97 | 3,39 | 5,57 | 3,63 |
| | 2 | 11,15 | 5,93 | 9,05 | 11,17 | 11,49 | 4,73 | 6,58 | 10,79 |
| | média | 8,92 | 4,61 | 4,52 | 6,45 | 8,23 | 4,06 | 6,07 | 7,21 |
| • 4 dias pós amarra | 1 | 12,01 | 4,87 | 29,85 | 9,25 | 21,22 | 4,03 | 10,4 | 11,09 |
| | 2 | 18,86 | 8,4 | 26,02 | 13,70 | 18,53 | 15,02 | 11,79 | 16,85 |
| | média | 15,43 | 6,63 | 27,93 | 11,47 | 19,87 | 9,52 | 11,09 | 13,97 |
| • 6 dias pós amarra | 1 | 22,25 | 14,58 | 16,78 | 21,44 | 30,63 | 8,34 | 7,08 | 8,16 |
| | 2 | 26,15 | 25,97 | 34,49 | 12,83 | 19,21 | 26,68 | 13,77 | 32,02 |
| | média | 24,20 | 20,27 | 25,63 | 17,13 | 24,92 | 17,51 | 10,42 | 20,09 |
| • 6 horas pós bloqueio | 1 | 9,15 | 6,30 | 7,14 | 14,52 | 9,63 | 7,38 | 9,12 | 3,02 |
| | 2 | 14,95 | 12,91 | 7,52 | 8,74 | 12,8 | 3,18 | 7,9 | 6,27 |
| | média | 12,05 | 9,60 | 7,33 | 11,63 | 11,21 | 5,28 | 8,51 | 4,64 |
| • 24 horas pós bloqueio | 1 | 3,57 | 19,01 | 7,68 | 6,49 | 5,66 | 11,15 | 3,11 | 1,16 |
| | 2 | 23,15 | 17,80 | 9,31 | 19,08 | 20,78 | 10,12 | 10,32 | 2,26 |
| | média | 13,36 | 18,40 | 8,49 | 12,78 | 13,22 | 10,63 | 6,71 | 1,71 |
| • 2 dias pós bloqueio | 1 | 7,94 | 22,87 | 7,66 | 19,31 | 5,44 | 15,09 | 16,15 | 2,76 |
| | 2 | 10,42 | 5,78 | 7,01 | 26,87 | 18,89 | 22,21 | 10,22 | 4,47 |
| | média | 9,18 | 14,32 | 7,33 | 23,09 | 12,16 | 18,65 | 10,18 | 3,61 |
| • 3 dias pós bloqueio | 1 | 7,92 | 28,39 | 3,3 | 12,45 | 9,3 | 22,65 | 6,35 | 3,16 |
| | 2 | 25,10 | 20,22 | 7,06 | 21,14 | 12,42 | 10,02 | 6,68 | 5,61 |
| | média | 16,51 | 24,30 | 5,18 | 16,79 | 10,86 | 16,33 | 6,51 | 4,38 |
| • 4 dias pós bloqueio | 1 | 15,82 | 26,13 | 32,55 | 36,79 | 14,65 | 27,35 | 8,58 | 9,6 |
| | 2 | 6,35 | 10,26 | 43 | 30,47 | 28,23 | 18,71 | 10,3 | 7,21 |
| | média | 11,81 | 18,18 | 37,77 | 33,63 | 21,44 | 23,03 | 9,44 | 8,40 |

ANEXO 64 - TESTE DO - 20°C PARA OS ANIMAIS SUBMETIDOS À CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRA-ORBITAL E TRATADOS COM SSI (GRUPO 2). NÚMERO DO ANIMAL (#); ESCORES DO PRIMEIRO TESTE DO -20°C (1); ESCORES DO SEGUNDO TESTE DO -20°C (2); MÉDIA DOS ESCORES DA PRIMEIRA E SEGUNDA DETERMINAÇÃO DO TESTE DO -20°C (MÉDIA).

| Momento | Avaliação | Animal #1 | Animal #2 | Animal #3 | Animal #4 | Animal #5 | Animal #6 | Animal #7 | Animal #8 |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| ● Basal | 1 | 12 | 9,46 | 10,79 | 3,99 | 8,48 | 4,2 | 1,75 | 13,44 |
| | 2 | 8,09 | 9,97 | 5 | 6,07 | 3,57 | 11,21 | 6,3 | 5,62 |
| | média | 10,04 | 9,71 | 7,89 | 5,03 | 6,02 | 7,70 | 4,02 | 9,53 |
| ● 4 dias pós amarra | 1 | 21,24 | 11,02 | 2,72 | 31,19 | 12 | 9,74 | 0 | 10,2 |
| | 2 | 23,08 | 18,77 | 6,19 | 23,62 | 17,58 | 6,23 | 1,77 | 18,79 |
| | média | 22,16 | 14,89 | 4,45 | 27,40 | 14,79 | 7,98 | 0,885 | 14,49 |
| ● 6 dias pós amarra | 1 | 21,01 | 10,06 | 17,88 | 14,34 | 17,17 | 10,89 | 0 | 7,25 |
| | 2 | 17,34 | 20,27 | 21,88 | 18,89 | 15,56 | 21,59 | 23,98 | 25,1 |
| | média | 19,17 | 15,16 | 19,88 | 16,61 | 16,36 | 16,24 | 11,99 | 16,17 |
| ● 6 horas pós bloqueio | 1 | 21,26 | 12,70 | 12,12 | 8,03 | 22,68 | 9,54 | 11,08 | 13,87 |
| | 2 | 27,07 | 17,50 | 22,08 | 10,02 | 21,33 | 17,06 | 7,49 | 15,96 |
| | média | 24,16 | 15,10 | 17,1 | 9,025 | 22,00 | 13,3 | 9,28 | 14,91 |
| ● 24 horas pós bloqueio | 1 | 9,63 | 13,07 | 13,93 | 10,92 | 18,07 | 15,45 | 5,05 | 11,5 |
| | 2 | 49,29 | 24,48 | 17,46 | 23,55 | 39,34 | 19,09 | 29,08 | 17,04 |
| | média | 29,46 | 18,77 | 15,69 | 17,23 | 28,70 | 17,27 | 17,06 | 14,27 |
| ● 2 dias pós bloqueio | 1 | 31,94 | 25,18 | 10,79 | 38,38 | 23,63 | 15,80 | 22,14 | 18,57 |
| | 2 | 30,33 | 16,78 | 24,16 | 21,75 | 10,91 | 10,91 | 19,05 | 13,73 |
| | média | 31,13 | 20,98 | 17,47 | 30,06 | 17,27 | 13,35 | 20,59 | 16,15 |
| ● 3 dias pós bloqueio | 1 | 53,73 | 27,34 | 9,1 | 22,42 | 18,78 | 33,04 | 12,82 | 17,6 |
| | 2 | 43,40 | 33,84 | 30,96 | 29,76 | 34,06 | 8,51 | 14,12 | 13,57 |
| | média | 48,56 | 30,59 | 20,03 | 26,09 | 26,42 | 20,77 | 13,47 | 15,58 |
| ● 4 dias pós bloqueio | 1 | 32,34 | 28,71 | 30,75 | 25,99 | 25,59 | 7,09 | 13,6 | 17,09 |
| | 2 | 31,48 | 7,73 | 12 | 22,7 | 19,11 | 13,45 | 21,48 | 15 |
| | média | 31,91 | 18,22 | 21,37 | 24,34 | 22,35 | 10,27 | 17,54 | 16,04 |

ANEXO 65- TESTE DO - 20°C PARA OS ANIMAIS SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO DO NERVO INFRA-ORBITAL E TRATADOS COM NTBo-A (GRUPO 3). NÚMERO DO ANIMAL (#); ESCORES DO PRIMEIRO TESTE DO -20°C (1); ESCORES DO SEGUNDO TESTE DO -20°C (2); MÉDIA DOS ESCORES DA PRIMEIRA E SEGUNDA DETERMINAÇÃO DO TESTE DO -20°C (MÉDIA).

| Momento | Avaliação | Animal #1 | Animal #2 | Animal #3 | Animal #4 | Animal #5 | Animal #6 | Animal #7 | Animal #8 |
|------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------|
| ● Basal | 1 | 3,78 | 17,15 | 1,94 | 3,03 | 13,65 | 1,52 | 4,65 | |
| | 2 | 4,50 | 10,86 | 7,89 | 15,02 | 10,39 | 10,08 | 17,03 | |
| | média | 4,14 | 14 | 4,91 | 9,02 | 12,02 | 5,8 | 10,84 | |
| ● 4 dias pós Amarra | 1 | 6,54 | 8,46 | 6,18 | 2,14 | 0,95 | 0,97 | 4,59 | |
| | 2 | 12,58 | 22,60 | 17,86 | 13,04 | 0,61 | 1 | 7,14 | |
| | média | 9,56 | 15,53 | 12,02 | 7,59 | 0,78 | 0,98 | 5,86 | |
| ● 6 dias pós Amarra | 1 | 9,27 | 8,14 | 9,84 | 8,21 | 0,84 | 2,26 | 0 | |
| | 2 | 10,34 | 16,98 | 9,67 | 7,19 | 1,12 | 0 | 5,75 | |
| | média | 9,80 | 12,56 | 9,75 | 7,7 | 0,98 | 1,13 | 2,87 | |
| ● 6 horas pós bloqueio | 1 | 11,66 | 16,1 | 7,92 | 13,2 | 1,48 | 0,47 | 7,25 | |
| | 2 | 7,11 | 12,12 | 13,73 | 1,76 | 3,59 | 3,6 | 9,83 | |
| | média | 9,38 | 14,11 | 10,82 | 7,48 | 2,53 | 2,03 | 8,54 | |
| ● 24horas pós bloqueio | 1 | 9,68 | 14,21 | 10,81 | 13,76 | 0 | 0,69 | 4,5 | |
| | 2 | 15,38 | 9,47 | 14,66 | 14,6 | 3,83 | 1,3 | 6,06 | |
| | média | 12,53 | 11,84 | 12,73 | 14,18 | 1,91 | 0,99 | 5,28 | |
| ● 2 dias pós bloqueio | 1 | 14,75 | 12,12 | 11,83 | 6,84 | 2,19 | 6,69 | 8,29 | |
| | 2 | 19,05 | 17,45 | 18,61 | 10,81 | 3,40 | 14,09 | 12,09 | |
| | média | 16,09 | 14,78 | 15,22 | 8,82 | 2,79 | 10,39 | 10,19 | |
| ● 3 dias pós bloqueio | 1 | 34,71 | 12,87 | 24,16 | 4,4 | 5,05 | 4,7 | 6,12 | |
| | 2 | 19,05 | 19,13 | 20,06 | 10,26 | 0,36 | 7,72 | 11,87 | |
| | média | 26,88 | 16 | 22,11 | 7,33 | 2,70 | 6,21 | 8,99 | |
| ● 4 dias pós bloqueio | 1 | 15,64 | 27,5 | 4,7 | 16,38 | 8,13 | 13,27 | 12,96 | |
| | 2 | 23,19 | 23,11 | 17,26 | 10,4 | 3,97 | 8,31 | 12,06 | |
| | média | 19,41 | 25,30 | 10,98 | 13,39 | 6,05 | 10,79 | 12,51 | |

ANEXO 66- TESTE DO - 20°C PARA OS ANIMAIS SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO DO NERVO INFRA-ORBITAL E TRATADOS COM SSI (GRUPO 4). NÚMERO DO ANIMAL (#); ESCORES DO PRIMEIRO TESTE DO -20°C (1); ESCORES DO SEGUNDO TESTE DO -20°C (2); MÉDIA DOS ESCORES DA PRIMEIRA E SEGUNDA DETERMINAÇÃO DO TESTE DO -20°C (MÉDIA).

| Momento | Avaliação | Animal #1 | Animal #2 | Animal #3 | Animal #4 | Animal #5 | Animal #6 | Animal #7 | Animal #8 |
|------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| ● Basal | 1 | 13,47 | 13,68 | 2,7 | 1,04 | 0 | 1,42 | 0 | 0 |
| | 2 | 14,29 | 11,61 | 12,47 | 10,27 | 17,24 | 13,17 | 9,43 | 15,76 |
| | média | 13,88 | 12,64 | 7,58 | 5,65 | 8,62 | 7,29 | 4,71 | 7,88 |
| ● 4 dias pós amarra | 1 | 20,04 | 15,21 | 3,99 | 10,01 | 9,64 | 4,13 | 16,93 | 0,66 |
| | 2 | 23,47 | 12,99 | 2,66 | 8,28 | 11,21 | 4,46 | 8,15 | 7,16 |
| | média | 21,75 | 14,1 | 3,32 | 9,14 | 10,42 | 4,29 | 12,54 | 3,91 |
| ● 6 dias pós amarra | 1 | 11,72 | 2,99 | 4 | 0 | 4,98 | 6,48 | 4,43 | 0 |
| | 2 | 9,53 | 10,4 | 10,45 | 7,91 | 13,45 | 7,6 | 5,75 | 9,83 |
| | média | 10,62 | 6,69 | 7,22 | 3,95 | 9,21 | 7,04 | 5,09 | 4,91 |
| ● 6 horas pós bloqueio | 1 | 8,84 | 3,57 | 6,8 | 2,94 | 10,13 | 2,21 | 10,96 | 0,59 |
| | 2 | 3,35 | 3,51 | 8,72 | 1,02 | 9,09 | 7,85 | 10,85 | 1,46 |
| | média | 6,09 | 3,54 | 7,76 | 1,98 | 9,61 | 5,03 | 10,90 | 1,02 |
| ● 24horas pós bloqueio | 1 | 4,7 | 5,23 | 8,56 | 1,35 | 7,23 | 6,39 | 9,67 | 2,43 |
| | 2 | 18,01 | 3,87 | 3,22 | 5,16 | 9,77 | 4,43 | 6,81 | 0 |
| | média | 11,35 | 4,55 | 5,89 | 3,25 | 8,5 | 5,41 | 8,24 | 1,215 |
| ● 2 dias pós bloqueio | 1 | 10,23 | 3,14 | 2,35 | 4,31 | 16,01 | 10,85 | 16,42 | 3,91 |
| | 2 | 15,65 | 3,72 | 4,95 | 1,58 | 20,43 | 14,32 | 17,71 | 2,19 |
| | média | 12,94 | 3,43 | 3,65 | 5,89 | 18,22 | 12,58 | 17,06 | 3,05 |
| ● 3 dias pós bloqueio | 1 | 11,63 | 1,14 | 1,09 | 5,33 | 12,56 | 8,21 | 10,21 | 0 |
| | 2 | 21,76 | 3,35 | 4,53 | 0,64 | 9,4 | 3,7 | 11,11 | 2,34 |
| | média | 16,69 | 2,24 | 2,81 | 2,98 | 10,98 | 5,95 | 10,65 | 1,17 |
| ● 4 dias pós bloqueio | 1 | 18,22 | 4,49 | 7,76 | 3,97 | 23,03 | 10,07 | 6,28 | 1,63 |
| | 2 | 8,06 | 3,49 | 13,08 | 5,38 | 12,27 | 4,25 | 18,51 | 2,04 |
| | média | 13,14 | 3,99 | 10,42 | 4,67 | 17,65 | 7,16 | 12,39 | 1,83 |

ANEXO 67- ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA DOS LIMIARES DE PERCEÇÃO AO FRIO (TESTE DO -20°C) ENTRE OS DIFERENTES GRUPOS NOS DIFERENTES MOMENTOS DO ESTUDO. ANIMAIS SUBMETIDOS À AMARRA DO NERVO INFRA-ORBITAL E TRATADOS COM NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO A (GRUPO 1); ANIMAIS SUBMETIDOS À AMARRA DO NERVO INFRA-ORBITAL E TRATADOS COM SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9% (GRUPO 2); ANIMAIS SUBMETIDOS A EXPOSIÇÃO DO NERVO INFRA-ORBITAL E TRATADOS COM NEUROTOXINA BOTULÍNICA DO TIPO-A (GRUPO 3); ANIMAIS SUBMETIDOS A EXPOSIÇÃO DO NERVO INFRA-ORBITAL E TRATADOS COM SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA 0,9% (GRUPO 4). SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA $P < 0.05$. [†]T- STUDENT TESTE, [‡]MANN-WHITNEY TESTE. VALORES APRESENTADOS EM SEGUNDOS.

| | Grupo | n | Média | Desvio Padrão | Grupos | P |
|-------------------------------------|-------|---|-------|---------------|------------|------------------|
| ● Basal | 1 | 8 | 6,25 | 1,79 | 1 versus 2 | 0,859 |
| | 2 | 8 | 7,49 | 2,26 | 1 versus 3 | 0,452 |
| | 3 | 7 | 8,67 | 3,81 | 1 versus 4 | 0,476 |
| | 4 | 8 | 8,53 | 3,19 | 2 versus 3 | 0,884 |
| | | | | | 2 versus 4 | 0,910 |
| | | | | 3 versus 4 | 1 | |
| ● 4 dias | 1 | 8 | 14,48 | 6,73 | 1 versus 2 | 0,991 |
| | 2 | 8 | 13,38 | 8,81 | 1 versus 3 | 0,310 |
| | 3 | 7 | 7,47 | 5,46 | 1 versus 4 | 0,642 |
| | 4 | 8 | 9,93 | 6,28 | 2 versus 3 | 0,460 |
| | | | | | 2 versus 4 | 0,808 |
| | | | | 3 versus 4 | 0,926 | |
| ● 6 dias | 1 | 8 | 20,02 | 5,06 | 1 versus 2 | 0,334 |
| | 2 | 8 | 16,44 | 2,41 | 1 versus 3 | <0,001 |
| | 3 | 7 | 6,39 | 4,69 | 1 versus 4 | <0,001 |
| | 4 | 8 | 6,84 | 2,24 | 2 versus 3 | <0,001 |
| | | | | | 2 versus 4 | <0,001 |
| | | | | 3 versus 4 | 0,997 | |
| ● 6 horas Após inoculação da droga | 1 | 8 | 8,78 | 2,85 | 1 versus 2 | 0,026 |
| | 2 | 8 | 15,61 | 5,41 | 1 versus 3 | 0,978 |
| | 3 | 7 | 7,84 | 4,34 | 1 versus 4 | 0,550 |
| | 4 | 8 | 5,74 | 3,53 | 2 versus 3 | 0,012 |
| | | | | | 2 versus 4 | 0,001 |
| | | | | 3 versus 4 | 0,811 | |
| ● 24 horas Após Inoculação da Droga | 1 | 8 | 10,66 | 5,05 | 1 versus 2 | 0,012 |
| | 2 | 8 | 19,80 | 5,87 | 1 versus 3 | 0,873 |
| | 3 | 7 | 8,49 | 5,59 | 1 versus 4 | 0,356 |
| | 4 | 8 | 6,05 | 3,22 | 2 versus 3 | 0,002 |
| | | | | | 2 versus 4 | <0,001 |
| | | | | 3 versus 4 | 0,829 | |
| ● 48 horas Após inoculação da droga | 1 | 8 | 12,31 | 6,27 | 1 versus 2 | 0,046 |
| | 2 | 8 | 20,50 | 6,77 | 1 versus 3 | 0,987 |
| | 3 | 7 | 11,18 | 4,67 | 1 versus 4 | 0,846 |
| | 4 | 8 | 9,60 | 6,32 | 2 versus 3 | 0,038 |
| | | | | | 2 versus 4 | 0,009 |
| | | | | 3 versus 4 | 0,967 | |
| ● 72 horas Após Inoculação da Droga | 1 | 8 | 12,60 | 7,03 | 1 versus 2 | 0,048 |
| | 2 | 8 | 25,18 | 11,04 | 1 versus 3 | 1 |
| | 3 | 7 | 12,88 | 8,99 | 1 versus 4 | 0,581 |
| | 4 | 8 | 6,68 | 5,52 | 2 versus 3 | 0,067 |
| | | | | | 2 versus 4 | 0,002 |
| | | | | 3 versus 4 | 0,571 | |
| ● 96 horas Após Inoculação da Droga | 1 | 8 | 20,46 | 10,87 | 1 versus 2 | 1 |
| | 2 | 8 | 20,25 | 6,40 | 1 versus 3 | 0,463 |
| | 3 | 7 | 14,06 | 6,35 | 1 versus 4 | 0,044 |
| | 4 | 8 | 8,90 | 5,39 | 2 versus 3 | 0,491 |
| | | | | | 2 versus 4 | 0,049 |
| | | | | 3 versus 4 | 0,638 | |