

WALDIR CARREIRÃO NETO

**Efeito da toxina botulínica tipo A sobre a expressão
de neuropeptídeos e o transporte mucociliar nasal
em coelhos**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Otorrinolaringologia

Orientador: Prof. Dr. Richard Louis Voegels

SÃO PAULO

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Carreirão Neto, Waldir

Efeito da toxina botulínica tipo A sobre a expressão de neuropeptídeos e o transporte mucociliar nasal em coelhos / Waldir Carreirão Neto. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Otorrinolaringologia.

Orientador: Richard Louis Voegels.

Descritores: 1.Toxinas botulínicas tipo A 2.Peptídeo relacionado com gene de calcitonina 3.Substância P 4.Mucosa nasal 5.Depuração mucociliar 6.Muco 7.Rinite 8.Inflamação neurogênica 9.Hipersensibilidade respiratória 10.Fibras nervosas amielínicas 11.Nociceptores 12.Coelhos

USP/FM/DBD-239/15

Esta pesquisa recebeu subsídio financeiro da
FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Auxílio Pesquisa Regular: Processo 2011/07465-3
e do
CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Bolsa Doutorado Direto: Processo 158722/2011-6

Dedico ...

À Deus ...

À minha esposa Marcela Camera Carreirão

Nada disso seria possível sem você. Minha companheira, minha fiel escudeira, meu AMOR. Sua compreensão e apoio incondicional durante todas as etapas desta tese foram fundamentais para nosso sucesso. Esta vitória também é sua e ela só tem significado porque tenho você ao meu lado.

Aos meus pais Waldir Carreirão Filho e Margareth Ferreira Carreirão

Vocês são a origem de tudo. Toda minha formação moral e ética devo a vocês. Isto, aliado a todo o amor que sempre recebi me fizeram uma pessoa melhor. Amo vocês.

Ao meu irmão Eduardo Carreirão

Não há nesse mundo melhor exemplo de “anjo na forma de pessoa”. Quem tem o privilégio do seu convívio sabe do que estou falando. Amo você meu irmão.

Ao meu irmão Marcelo Carreirão

Foram anos de afastamento por causa de nossa formação médica. Mas ao mesmo tempo, sempre estivemos ligados por nossa amizade. Agora, finalmente juntos... meu companheiro... meu melhor amigo...

À minha segunda mãe Maria Aparecida da Silva

Foi Deus que colocou você em nossa família. É praticamente impossível descrever com palavras toda dedicação e amor que recebemos de você e que sentimos por você. “Obrigado Cidinha...”

Aos meus avós Lygia Ferreira Nascimento (in memoriam), Norma Rocha Carreirão, Saint Clair Inácio Ferreira, Waldir Carreirão (in memoriam) e Syria Henrique Rocha (in memoriam)

Por me apoiarem e ajudarem a construir alicerces sólidos que me sustentam até hoje. A vocês, todo meu amor...

Aos queridos Fernando Camera, Leila Camera, Nara Carreirão Cantanhede, Renato Carreirão (in memoriam) e Carlos Cantanhede

Por, de alguma forma, me ajudarem nessa caminhada ...

AGRADECIMENTOS

Agradeço ...

Ao **Prof. Dr. Richard Louis Voegels**, pelos ensinamentos desde a residência médica até os dias de hoje. Sua postura sempre justa, ética e com respeito por aqueles que o cercam, além de sua enorme capacidade profissional, são alguns dos motivos que me fazem admirar sua pessoa. Um grande profissional que considero um amigo.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento**, por ter me aberto as portas da FMUSP e dado a oportunidade de aprender uma Otorrinolaringologia de excelência dentro do HCFMUSP.

Ao **Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva** pelo apoio e oportunidade de desenvolver esta pesquisa no Departamento de Patologia da FMUSP.

À **Profa. Dra. Thaís Mauad**, pelo apoio, atenção e ajuda ímpar na titulação dos anticorpos para análise imuno-histoquímica.

À **Dra Mariângela Macchione**, pelo acolhimento, ensino, apoio e amizade durante todas as fases da pós-graduação. Sinto que cresci como pesquisador durante este período, e grande parte disto devo à você. Agradeço pelo carinho, dedicação, paciência e confiança depositada em mim na condução desta pesquisa.

À **Profa. Dra. Naomi Kondo Nakagawa**, pelos conselhos, atenção e ajuda em diversas etapas do trabalho e principalmente na elaboração do *paper*.

Ao **Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz Silva**, pela ajuda, disponibilidade e paciência comigo na análise das imagens.

Ao **Prof. Dr. Luis Ubirajara Sennes**, por ter me dado a oportunidade de fazer parte do Programa de Pós-Graduação em Otorrinolaringologia da FMUSP, por sua competência frente ao Programa de Pós Graduação, por todos os ensinamentos desde a residência médica até os dias de hoje.

Ao **Prof. Dr. João Ferreira de Mello Júnior**, por todas as suas sugestões no desenvolvimento desta pesquisa, na qualificação da tese, na elaboração do *paper*, por sua amizade.

Ao **Dr. Fabio de Rezende Pinna**, por ser um grande amigo, pela sua competência, pelo conhecimento científico que detém, pelas valiosas sugestões durante a pesquisa.

Aos amigos que de alguma forma apoiaram esta pesquisa: **Robson Seriani, Dra. Regiane Carvalho de Oliveira, Dra. Mary Anne K. Olm, Prof. Dr. João Kogler, Ana L. B. Silveira.**

À **Angela Santos, Sandra M. Fernezlian e Esmeralda M. Eher** e a todos do Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Patologia da FMUSP, pelo apoio na confecção das lâminas.

Aos **funcionários do LIM 05, Biotério Central FMUSP, Museu de Imagens e Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental** pela ajuda e troca de experiências durante o período de realização desta pesquisa.

À **Marileide, Luci, Cristina, Marcia e Kátia**, secretárias da Otorrinolaringologia, sempre disponíveis e prontas a ajudar. Vocês também contribuíram para que esta pesquisa se tornasse uma realidade.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo financiamento deste projeto de pesquisa; e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ)** pela concessão de bolsa de estudo de doutorado direto.

SUMÁRIO

Lista de Siglas

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras e Gráficos

Lista de Quadros e Tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	06
3 REVISÃO DE LITERATURA	08
3.1 Neuroregulação da mucosa nasal	09
3.2 Neuropeptídeos da mucosa nasal	12
3.2.1 Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina	12
3.2.2 Substância P	13
3.2.3 Óxido nítrico sintase e óxido nítrico	14
3.3 Toxina botulínica	16
3.3.1 Histórico - O botulismo	16
3.3.2 Histórico - Desenvolvimento da toxina botulínica	17
3.3.3 Mecanismo de ação	19
3.3.4 A TXB-A no tratamento da rinite	21
3.3.5 A TXB-A e seus efeitos antinociceptivos	25
3.3.6 A TXB-A e seu efeito sobre o óxido nítrico	28
3.3.7 A TXB-A e o transporte mucociliar	28
4 MÉTODOS	31
4.1 Grupos experimentais	33
4.2 Avaliação da frequência de batimento ciliar	36
4.3 Preparo histopatológico	38
4.4 Detecção de células apoptóticas	38

4.5 Imuno-histoquímica	40
4.5.1 Hidratação	40
4.5.2 Recuperação antigênica	40
4.5.3 Bloqueio	41
4.5.4 Incubação com o anticorpo primário	41
4.6 Análise das lâminas	42
4.7 Estatística	43
5 RESULTADOS	45
5.1 Apoptose celular	46
5.2 Neuropeptídeos	49
5.3 Transporte mucociliar	55
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÃO	70
8 REFERÊNCIAS	72

APÊNDICES

Apêndice 1 - Carta do Comitê de Ética em Pesquisa

Apêndice 2 – Carta da Comissão de Ética no Uso de Animais

LISTA DE SIGLAS

BC	Biotério Central
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
EUA	Estados Unidos da América
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

LISTA DE ABREVIATURAS

AB	azul alciano
AB+	glicoproteína ácida
ACh	acetilcolina
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
APOP-CE	quantidade de células apoptóticas na camada externa
APOP-CI	quantidade de células apoptóticas na camada interna
ATP	trifosfato de adenosina
BSA	albumina de soro bovino
CGRP	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CGRP-CE	expressão do CGRP na camada externa
CGRP-CI	expressão do CGRP na camada interna
CI	cadeia leve
CNM	concha nasomaxilar
CNMs	conchas nasomaxilares
Cp	cadeia pesada
Cpc	cadeia pesada da TXB-A com terminação carboxila
Cpn	cadeia pesada da TXB-A com terminação amino
DAB	diaminobenzidina
dmc	densidade média de coloração
eNOS	enzima óxido nítrico sintase endotelial ou tipo III
ESP-CE	espessura média da camada externa
FBC	frequência do batimento ciliar
FSMT- A δ	fibras sensitivas rápidas mielinizadas tipo A δ
FSNMT-C	fibras sensitivas lentas não mielinizadas tipo C
GMPc	guanosina monofosfato cíclico
iNOS	enzima óxido nítrico sintase induzível ou tipo II
NANC	não adrenérgico, não colinérgico
nNOS	enzima óxido nítrico sintase neural ou tipo I

nNOS-CE	expressão da nNOS na camada externa
nNOS-CI	expressão da nNOS na camada interna
NO	óxido nítrico
NOS	enzima óxido nítrico sintase
NPY	neuropeptídeo Y
PAS	ácido periódico de Schiff
PAS+	glicoproteína neutra
PBS	tampão fosfato
POD	peroxidase
PPT-I	preprotaquinina A
RI	rinite idiopática
SF	soro fisiológico
SNA	sistema nervoso autônomo
SNAP 25	<i>synaptosomal-associated protein 25kDa</i>
SNARE	<i>soluble n-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>
SNC	sistema nervoso central
SP	substância P
SP-CE	expressão da SP na camada externa
SP-CI	expressão da SP na camada interna
TMC	transporte mucociliar
TRPV1	receptor de potencial transiente vanilóide tipo 1
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
TXB-A	toxina botulínica tipo A
VGDs	vesículas grandes e densas
VIP	peptídeo intestinal vasoativo
VPs	vesículas pequenas

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	centímetro
Hz	Hertz
kDa	quilodalton
kg	quilograma
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
n	quantidade de animais
UI	unidade internacional
x	vezes
δ	delta
°C	grau Celsius
μL	microlitro
μm	micrometro
/	por
=	igual a
<	menor que
≤	menor ou igual
%	porcento

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

- Figura 1** Mecanismo de ação da TXB-A. (1) Neurônio sem contato com a TXB-A e com complexo SNARE íntegro e ativado com a vesícula acoplada liberando ACh na fenda pré-sináptica; (2) Terminação carboxila da cadeia pesada (Cpc) da TXB-A liga-se à gangliosídeos (Gs) e inicia o processo de internalização da TXB-A em uma vesícula; (3) TXB-A internalizada numa vesícula dentro do neurônio; (4) Terminação amino da cadeia pesada (Cpn) que transloca a cadeia leve (Cl) para o citoplasma do neurônio; (5) Cl quebra a SNAP 25 e impede o acoplamento da vesícula que contém ACh 21
- Figura 2** (A) Esponja e cateter intravenoso; (B) Fragmento de esponja (seta); (C) Fragmento de esponja já cateterizado e pronto para inserção na fossa nasal do coelho 35
- Figura 3** (A) Fragmento da esponja com o cateter intravenoso já colocado na fossa nasal e agulha guia metálica sendo retirada; (B) Agulha guia metálica já retirada; (C) Seringa de 1mL com solução acoplada para embebição da esponja; (D) Fragmento da esponja já expandido e retirado da fossa nasal ao final do período de 30 minutos 35
- Figura 4** (A) Dissecção dos tecidos moles do dorso nasal; (B) Retirado o dorso nasal ósseo expondo-se as fossas nasais, conchas nasomaxilares (setas) e septo nasal (asterisco); (C) Conchas nasomaxilares retiradas e prontas para avaliação da FBC 36

Figura 5	Equipamento usado no Laboratório de Poluição Ambiental para mensuração da FBC das CNMs: (1) Estroboscópio; (2) câmera filmadora; (3) microscópio óptico; (4) monitor	37
Figura 6	Reação TUNEL para detecção de células apoptóticas em concha nasomaxilar (CNM). Barra da escala 10µm. (A) CNM sem intervenção do grupo controle; (B) CNM SF0,9% grupo controle; (C) CNM SF0,9% grupo tratamento; (D) CNM TXB-A grupo tratamento. Setas apontam células apoptóticas	47
Gráfico 1	Quantidade de células apoptóticas na camada externa (APOP-CE) das conchas nasomaxilares. As caixas representam o intervalo interquartil [25%-75%] e a linha horizontal dentro delas o valor da mediana. Dados uniformizados pelo comprimento da membrana basal (µm). Teste de Kruskal-Wallis utilizado para comparação e correção <i>post-hoc</i> realizada por meio do Teste de Dunn. *p=0,001.....	48
Gráfico 2	Quantidade de células apoptóticas na camada interna (APOP-CI) das conchas nasomaxilares. As caixas representam o intervalo interquartil [25%-75%] e a linha horizontal dentro delas o valor da mediana. Dados uniformizados pelo comprimento da membrana basal (µm). Teste de Kruskal-Wallis utilizado para comparação e correção <i>post-hoc</i> realizada por meio do Teste de Dunn. *p<0,001. †p=0,035. §p=0,022	48
Figura 7	Imuno-histoquímica para análise da expressão de CGRP em concha nasomaxilar (CNM). Barra da escala 10µm. (A) CNM sem intervenção do grupo controle; (B) CNM SF0,9% grupo controle; (C) CNM SF0,9% grupo tratamento; (D) CNM TXB-A grupo tratamento	50

Gráfico 3	Expressão de CGRP na camada externa (CGRP-CE). As caixas representam o intervalo interquartil [25%-75%] e a linha horizontal dentro delas o valor da mediana. Dados expressos em (densidade média de coloração (dmc) x μm^2)/ μm^2 ; *p=0,008	51
Gráfico 4	Expressão de CGRP na camada interna (CGRP-CI). As caixas representam o intervalo interquartil [25%-75%] e a linha horizontal dentro delas o valor da mediana. Dados expressos em (densidade média de coloração (dmc) x μm^2)/ μm^2 ; *p=0,008	51
Figura 8	Imuno-histoquímica para análise da expressão de SP em concha nasomaxilar (CNM). Barra da escala 10 μm . (A) CNM sem intervenção do grupo controle; (B) CNM SF0,9% grupo controle; (C) CNM SF0,9% grupo tratamento; (D) CNM TXB-A grupo tratamento	52
Gráfico 5	Expressão de SP na camada externa (SP-CE). Topo da caixa representa a média e hastes horizontais os valores do erro padrão médio. Dados expressos em (densidade média de coloração (dmc) x μm^2)/ μm^2 *p=0,021; †p=0,040	53
Gráfico 6	Expressão de SP na camada interna (SP-CI). As caixas representam o intervalo interquartil [25%-75%] e a linha horizontal dentro delas o valor da mediana. Dados expressos em (densidade média de coloração (dmc) x μm^2)/ μm^2 ; NS=diferença não significativa entre os grupos (p=0,051)	53
Figura 9	Imuno-histoquímica para análise da expressão de nNOS em concha nasomaxilar (CNM). Barra da escala 10 μm . (A) CNM sem intervenção do grupo controle; (B) CNM SF0,9% grupo controle; (C) CNM SF0,9% grupo tratamento; (D) CNM TXB-A grupo tratamento ...	55

Figura 10 Cortes de tecido de conchas nasomaxilares coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) e azul alciano (AB). Barra de escala 10µm. Setas brancas indicam glicoproteínas neutras (PAS+, vermelho). Setas pretas indicam glicoproteínas ácidas (AB+, azul)

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Indicações para uso terapêutico da TXB-A, aprovadas pelo <i>Food and Drug Administration</i> (FDA)	19
Quadro 2	Grupos de estudo	33
Tabela 1	Quantidade de células apoptóticas	47
Tabela 2	Dados sobre imuno-histoquímica para avaliação da expressão de CGRP e SP	49
Tabela 3	Dados sobre imuno-histoquímica para avaliação da expressão de nNOS	54
Tabela 4	Dados sobre transporte mucociliar	56

RESUMO

Carreirão Neto W. *Efeito da toxina botulínica tipo A sobre a expressão de neuropeptídeos e o transporte mucociliar nasal em coelhos* [tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015. 111págs.

INTRODUÇÃO: A toxina botulínica tipo A (TXB-A) tem sido testada no tratamento da rinite, principalmente nos casos de rinite idiopática. Sugere-se que um estado de hiper-reatividade do nervo trigêmeo esteja envolvido na fisiopatologia da rinite idiopática. O nervo trigêmeo possui fibras sensitivas não mielinizadas tipo C (FSNMT-C) que contém os neuropeptídeos substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). O óxido nítrico (NO) produzido pelas enzimas óxido nítrico sintase (NOS) também está envolvido nesse processo de neuroregulação nasal. O transporte mucociliar, mecanismo primário de defesa do sistema respiratório, é formado pelo batimento ciliar e muco nasal, e esses componentes podem ser influenciados por diferentes neuropeptídeos e neurotransmissores presentes na mucosa nasal. **OBJETIVO:** O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da TXB-A sobre a expressão da SP, CGRP e óxido nítrico sintase neural (nNOS), além de sua influência sobre o transporte mucociliar nasal em coelhos. **MÉTODOS:** Coelhos machos saudáveis da linhagem Nova Zelândia foram divididos em dois grupos: o grupo tratamento recebeu TXB-A (25UI) na concha nasomaxilar (CNM) do lado direito e soro fisiológico a 0,9% (SF0,9%) na CNM esquerda. O grupo controle recebeu SF0,9% na CNM direita e nenhuma intervenção na CNM esquerda. Foram investigados os efeitos da TXB-A sobre a expressão da SP, CGRP e nNOS no tecido de CNM por meio da imuno-histoquímica. Para esta análise, dividiu-se o tecido em camada externa (CE, acima da membrana basal) e camada interna (CI, abaixo da membrana basal). Avaliou-se também a presença de apoptose celular, a frequência de batimento ciliar (FBC), o perfil histoquímico do muco nasal (glicoproteínas ácidas e neutras) e a espessura do epitélio (ESP-CE). **RESULTADOS:** Foi observado um aumento significativo na quantidade de células apoptóticas na CNM do grupo tratamento que recebeu TXB-A em comparação aos controles ($p \leq 0,001$). A CNM do grupo tratamento que recebeu SF0,9% exibiu um aumento na quantidade de células apoptóticas na CI ao comparar com os controles (CNM SF0,9%, $p=0,035$) (CNM sem intervenção, $p=0,022$), e também um aumento da expressão de SP na CE em comparação aos controles (CNM SF0,9%, $p=0,021$) (CNM sem intervenção, $p=0,040$). A expressão de CGRP apresentou um aumento na CNM do grupo tratamento que recebeu TXB-A em comparação à CNM sem intervenção ($p=0,008$). A FBC, expressão de nNOS, perfil histoquímico do

muco nasal e ESP-CE não apresentaram diferenças significativas.

DISCUSSÃO: O aumento da expressão de CGRP e SP pode ter sido causado por inibição de sua exocitose vesicular pela TXB-A, levando ao seu acúmulo intracelular. Não foram observadas diferenças significativas na FBC ou perfil histoquímico do muco nasal, indicando que o aumento da expressão de CGRP e SP não foi associado à inflamação. O aumento da quantidade de células apoptóticas e da expressão de SP na CNM SF0,9% do grupo tratamento pode ter sido causado por um efeito central da TXB-A.

CONCLUSÃO: A administração nasal de TXB-A aumentou a expressão de CGRP e SP, possivelmente por acúmulo intracelular por causa da inibição da sua exocitose, mas sem alterar a FBC e o perfil histoquímico do muco nasal.

Descritores: 1.Toxinas botulínicas tipo A 2.Peptídeo relacionado com gene de calcitonina 3.Substância P 4.Mucosa nasal 5.Depuração mucociliar 6.Muco 7.Rinite 8.Inflamação neurogênica 9.Hipersensibilidade respiratória 10.Fibras nervosas amielínicas 11.Nociceptores 12.Coelhos

ABSTRACT

Carreirão-Neto W. *Effect of botulinum toxin type A on nasal neuropeptides and mucociliary clearance in rabbits* [thesis]. São Paulo. "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015. 111pp

INTRODUCTION: Botulinum toxin type A (BoNT-A) has been assessed in the treatment of rhinitis, especially in cases of idiopathic rhinitis. Trigeminal hyper-responsiveness appears to be involved in the pathological process of idiopathic rhinitis. Trigeminal nociceptive type C unmyelinated sensory fibers contain the neuropeptides calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P (SP). Nitric oxide (NO) produced by the enzyme nitric oxide synthase (NOS) are also involved in this nasal neuroregulation process. The mucociliary clearance, primary defense system of the respiratory system, is composed by the ciliary beat and nasal mucus. These components can be influenced by different nasal neuropeptides and neurotransmitters.

OBJECTIVE: The aim of this study was to evaluate the effect of BoNT-A on the expression of SP, CGRP and neural nitric oxide synthase (nNOS), and its influence on nasal mucociliary clearance in rabbits.

METHODS: Healthy New Zealand male rabbits were divided into two groups: the treatment group was challenged with BoNT-A (25UI) in the right nasomaxillary turbinate (NMT) and saline (SF0.9%) in the left NMT. The control group received SF0.9% in the right NMT and no-intervention in the left NMT. We investigated the effects of BoNT-A on SP, CGRP and nNOS expression in the NMT tissue by immunohistochemistry. Each area of interest was subdivided into an internal layer (IL: below the basement membrane) and outer layer (OL: above the basement membrane) for analysis. It was also assessed signs of cellular apoptosis, ciliary beat frequency (CBF), mucus histochemical profile (acidic and neutral glycoproteins) and epithelial thickness (EP-TH). **RESULTS:** It was observed a significant increase in the amount of apoptotic cells in the BoNT-A-challenged NMT compared with controls ($p \leq 0.001$). The NMT of treatment group which received only SF0.9% showed an increase in the amount of apoptotic cells in the IL compared with controls (NMT SF0.9%, $p = 0.035$) (NMT no-intervention, $p = 0.022$), and also an increase in the SP expression in the OL compared with controls (NMT SF0.9%, $p = 0.021$) (NMT no-intervention, $p = 0.040$). CGRP expression showed higher expression in the BoNT-A-challenged NMT compared with no-intervention NMT ($p = 0.008$). The CBF, nNOS expression, mucus histochemical profile and EP-TH did not show significant differences. **DISCUSSION:** The increased CGRP and SP expression could be due to inhibition of vesicular exocytosis by BoNT-A, leading to CGRP and SP intracellular accumulation. No significant

differences in CBF or mucus histochemical profile were observed, indicating that the increased CGRP and SP expression was not associated with inflammation. The increase in the amount of apoptotic cells and SP expression in the SF0.9% NMT of treatment group may be due to a central effect of BoNT-A. **CONCLUSION:** Nasal administration of BoNT-A increased SP and CGRP expression, possibly via inhibition of their release, but did not change the CBF or mucus profile.

Descriptors: 1.Botulinum toxins, type A 2.Substance P 3.Calcitonin gene-related peptide 4.Nasal mucosa 5.Mucociliary clearance 6.Mucus 7.Rhinitis 8.Neurogenic inflammation 9.Respiratory hypersensitivity 10.Nerve fibers unmyelinated 11. Nociceptors 12.Rabbits

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A rinite é definida como a inflamação da mucosa de revestimento nasal, caracterizada pela presença de um ou mais dos sintomas seguintes: obstrução nasal, rinorréia, prurido, espirros e hiposmia¹. Cerca de 25,7% das crianças brasileiras, entre 6 e 7 anos, e 29,6% dos adolescentes, entre 13 e 14 anos, apresentam sintomas nasais por ano relacionados à rinite².

A rinite pode ser didaticamente classificada de acordo com sua etiologia em: infecciosa, alérgica, não alérgica e outras¹. Por causa da sobreposição considerável de sinais e sintomas, pode ser difícil a diferenciação entre os subtipos de rinite com base apenas na história clínica e exame físico³. A rinite idiopática (RI) é caracterizada por não apresentar causa imunológica, infecciosa, farmacológica, hormonal ou ocupacional³⁻⁶. Dessa forma, o diagnóstico da RI só pode ser realizado quando todas as outras causas conhecidas forem excluídas³. Especula-se que a RI seja, na verdade, formada por diferentes subtipos de rinite, com diferentes etiologias e provavelmente com causas sobrepostas em sua fisiopatologia, mas sem critérios diagnósticos bem definidos³. Sugere-se, ainda, que um estado de hiper-reatividade do nervo trigêmeo possa estar envolvido na fisiopatologia de alguns casos de RI⁷.

O nervo trigêmeo inerva a mucosa nasal por meio de seus ramos oftálmico e maxilar⁸. Possui fibras sensitivas rápidas mielinizadas tipo A δ

(FSMT-A δ), e fibras sensitivas lentas não mielinizadas tipo C (FSNMT-C)⁸. Os vasos sinusóides venosos profundos e as anastomoses arteriovenosas da mucosa nasal são ricamente invadidos por terminações nervosas trigeminais, assim como as glândulas submucosas e seus vasos que possuem uma rede de fibras nervosas que cercam cada ácino. Essas terminações nervosas localizam-se entremeadas às junções apertadas entre as células do epitélio respiratório nasal⁶. Além disso, essa extensa rede formada pela inervação aferente trigeminal da mucosa nasal também possui uma função eferente. As FSNMT-C, quando estimuladas, desencadeiam um reflexo axonal que causa a liberação de diferentes neuropeptídeos, principalmente a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), o que origina a chamada inflamação neurogênica⁹. Dessa forma, uma injúria ou estímulo limitado a uma pequena área pode desencadear uma reação de proporção muito maior¹⁰. O CGRP causa, principalmente, vasodilatação, enquanto a SP possui como ação mais marcante a estimulação da secreção glandular⁷. Estes neuropeptídeos fazem parte do chamado sistema transmissor não adrenérgico, não colinérgico (NANC)¹¹. Alguns autores demonstraram haver diferença significativa na inervação da mucosa nasal entre indivíduos saudáveis e com RI, e, nestes últimos, encontraram expressão maior de neuropeptídeos como o CGRP e a SP^{12,13}. Um indício da importância desses neuropeptídeos na fisiopatologia da RI são os efeitos causados pela capsaicina – componente ativo da pimenta – na mucosa nasal. A capsaicina é capaz de induzir a degeneração específica das FSNMT-C e depletar neuropeptídeos dessas

fibras na mucosa nasal, após administrações repetidas¹⁴. Isto gera um estado de dessensibilização à própria capsaicina e a outros estímulos, e é capaz de provocar o alívio de sintomas em pacientes com RI¹⁵.

Recentemente, a toxina botulínica tipo A (TXB-A) tem sido testada para o tratamento da rinite, principalmente nos casos de RI, aliviando sintomas como a rinorréia¹⁶⁻²⁰. A TXB-A age quebrando as proteínas do chamado complexo *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor* (SNARE) localizadas na membrana pré-sináptica das células neurais, mais especificamente o *synaptosomal-associated protein 25kDa* (SNAP 25)²¹. Essas proteínas do complexo SNARE são facilitadoras do processo de fusão de vesículas que contêm neuropeptídeos e neurotransmissores com a membrana pré-sináptica de células neurais, e intermediam sua exocitose²². Esse mecanismo de bloqueio é mais conhecido e estudado no processo de exocitose da acetilcolina (ACh). Porém, a TXB-A também possui a capacidade de inibir a liberação de neuropeptídeos como a SP²³⁻²⁵ e o CGRP²⁶, podendo levar à inibição do processo de inflamação neurogênica¹¹. O papel desses neuropeptídeos na fisiopatologia da RI ainda não é claro, mas sugere-se que esteja envolvido no processo de hiper-reatividade da mucosa nasal^{3,12,27}. A ativação exacerbada dessas FSNMT-C, em pacientes com RI, pode causar uma resposta axonal reflexa e liberação maior de SP e CGRP, e resultar em sintomas como espirros, rinorréia e, até, dor¹². Por causa de seu envolvimento no mecanismo de transmissão da dor, a inibição da liberação

desses neuropeptídeos pela TXB-A parece, também, ser a responsável pela reconhecida propriedade antinociceptiva da toxina^{28,29}.

No mecanismo de neuroregulação da mucosa nasal, a ACh tem a capacidade de estimular receptores muscarínicos e incitar a secreção de muco pelas glândulas⁷ e o aumento da frequência do batimento ciliar (FBC)³⁰. A SP também é capaz de estimular a secreção de muco pelas glândulas e o extravasamento de plasma¹⁰. Sugere-se, ainda, que o óxido nítrico (NO), produzido pelas enzimas óxido nítrico sintase (NOS), seja outro estimulador importante do extravasamento de plasma³¹ e da FBC³². O batimento ciliar e o muco nasal fazem parte do chamado transporte mucociliar (TMC), sistema primário e essencial de defesa de todo sistema respiratório³³. O TMC nasal requer tanto uma produção adequada de muco, como um movimento ciliar coordenado para a manutenção da homeostase nasal^{33,34}. O conhecimento do mecanismo de depuração do TMC é de importância fundamental para o entendimento da fisiopatologia das rinites¹.

Ao considerar o mecanismo de ação da TXB-A, sugere-se que seus efeitos no epitélio respiratório possam ser causados por seu potencial em inibir a liberação de diferentes neuropeptídeos^{24,25,35-43} envolvidos na neuroregulação da mucosa nasal, além de sua, já reconhecida e bem estabelecida, capacidade de bloqueio colinérgico. Além disso, quanto à fisiologia do TMC, poucos estudos comentam os possíveis efeitos da TXB-A sobre o TMC⁴⁴. Dessa forma, sugere-se também a possibilidade da TXB-A interferir no funcionamento do TMC.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da TXB-A sobre a neuroregulação da mucosa nasal de coelhos, por meio da análise de sua influência na expressão de SP, CGRP e óxido nítrico sintase neural (nNOS) por imuno-histoquímica.

Determinar a influência da TXB-A no transporte mucociliar nasal de coelhos, por avaliação da FBC e do perfil histoquímico do muco nasal.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Neuroregulação da mucosa nasal

Axônios sensitivos localizados na mucosa nasal podem ser classificados de acordo com o tamanho, velocidade de condução, tipo de neurotransmissor que liberam e os diferentes tipos de estímulos aos quais são sensíveis. As FSNMT-C, de origem trigeminal, conduzem lentamente potenciais de ação e são geralmente responsivas aos estímulos mecânicos e químicos nocivos^{8,45}. Estas fazem parte do chamado sistema sensitivo NANC e, dessa forma, utilizam mediadores como os neuropeptídeos CGRP e SP¹¹. Esses neurônios de FSNMT-C são responsáveis pela sensação de dor após estímulo mecânico, térmico ou químico da mucosa nasal. Podem ser estimulados pela capsaicina, histamina, serotonina, bradicinina, ACh, nicotina, partículas da fumaça do cigarro e outras substâncias irritantes. Essas fibras sensitivas são densamente ramificadas na mucosa nasal. Inervam principalmente a parede de arteríolas e outros vasos arteriais⁴⁶. Também estão presentes nas paredes de vasos venosos e nos ácinos glandulares, estendendo-se, ainda, até o epitélio. Neste, suas fibras lisas tornam-se mais espessas, formando varicosidades neurosecretórias. Quando despolarizadas, essas fibras liberam os neuropeptídeos CGRP e SP, que se dispersam pelas regiões adjacentes. A liberação local de neuropeptídeos por essas fibras aferentes constitui um reflexo axonal¹⁰. Este

reflexo representa um mecanismo de defesa acionado muito rapidamente em situações adversas, o que foi demonstrado em estudos realizados na mucosa nasal de roedores⁴⁷. Após uma estimulação de fibras sensitivas nervosas, uma onda de despolarização é transmitida ao sistema nervoso central (SNC), mas de forma simultânea também ocorre a despolarização extensa da rede de neurônios periféricos. Destarte, ocorre a liberação de uma série de neuropeptídeos existentes nesses neurônios, que atingem difusamente os vasos submucosos e as glândulas⁴⁸.

No SNC, os neurônios nociceptivos trigeminais entram na ponte através da raiz sensorial, dirigem-se caudalmente no trato espinhal do trigêmeo, e terminam no *pars caudalis* do núcleo do trato espinhal e nos três segmentos cervicais superiores da medula espinhal⁴⁹. Os interneurônios do *pars caudalis* cruzam a linha média para entrar no trato trigeminotalâmico e terminam na porção medial do núcleo do tálamo. Estímulos térmicos e dolorosos intensos são apreciados ao nível do tálamo⁸. Conexões por meio de interneurônios são feitas com os neurônios motores dorsais do nervo vago, centros viscerais reticulares, e, posteriormente, com núcleos hipotalâmicos. Os neurotransmissores desses interneurônios são desconhecidos. No entanto, receptores da SP na medula ventrolateral regulam respostas ventilatórias⁵⁰ e sugerem que SP atue como neurotransmissor central⁸.

Hunter e Dey (1998)⁵¹ identificaram por imuno-histoquímica de gânglios trigeminais, marcados a partir da instilação de microesferas de látex

no epitélio nasal de ratos, que neurônios específicos do gânglio trigeminal se projetam ao epitélio nasal, e a maioria contém SP. De acordo com os autores apenas alguns gânglios continham sinais da presença de CGRP, o que sugere que o epitélio nasal é predominantemente alvo de neurônios trigeminais que contém SP. Por outro lado, no estudo de Grunditz et al. (1994)⁵², os autores sugerem que na lâmina própria, abaixo da membrana basal, os neurônios trigeminais que contém CGRP são mais comuns do que os neurônios com SP.

No mecanismo de neuroregulação da mucosa nasal, também está envolvida a NOS que produz o NO nas proximidades das glândulas submucosas e fibras nervosas, e age como um co-transmissor parassimpático, com propriedades de estímulo para a vasodilatação e secreção seromucosa glandular⁵³.

A chave para o manejo correto da rinite passa pelo entendimento dos fatores geradores desse estado contínuo de hiper-reatividade da mucosa nasal de alguns pacientes, nos quais um estímulo mínimo é capaz de desencadear uma cascata de sintomas. A alteração na inervação da rede vascular nasal pode ser um dos fatores envolvidos na manutenção desse estado¹³. Especula-se que esse aumento da inervação vascular, observado em pacientes com RI, também represente um aumento na liberação local de neurotransmissores e neuropeptídeos. Sendo assim, de forma análoga, essa mucosa poderia apresentar um quadro semelhante ao observado na rinite medicamentosa, onde uma sobrecarga de agentes estimulantes, no caso o

uso crônico de agonistas α -adrenérgicos, acaba causando um estado de obstrução nasal acentuada, pouco responsiva a outros estímulos vasoconstritores¹³.

3.2 Neuropeptídeos da mucosa nasal

3.2.1 Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

O CGRP é formado por uma cadeia de 37 aminoácidos e processado a partir do mesmo gene da calcitonina⁵⁴. O gene CALC-I codifica a calcitonina no seu éxon 4 e o CGRP no seu éxon 5⁵⁴. Na mucosa nasal, fibras nervosas sensitivas que contêm CGRP são encontradas, principalmente, ao redor de vasos arteriais, e estão, geralmente, acompanhadas de SP nas FSNMT-C^{55,56}. Também podem ser identificados em vasos venosos, e são pouco encontrados em ácinos glandulares. Suas fibras se estendem até o epitélio respiratório e seus sítios de ligação concentram-se nas arteríolas. Essa distribuição é consistente com seu papel fisiológico de vasodilatador arterial potente e de efeito duradouro¹⁰. Dessa forma, contribui com a secreção nasal e induz um estado de vasodilatação prolongado, com aumento do fluxo sanguíneo nasal arterial e potencializador do fluxo de plasma através dos capilares fenestrados. Além disso, o CGRP pode agir de forma sinérgica com outros agentes vasomotores e mediadores inflamatórios, aumentando o fluxo sanguíneo local⁵⁷. É capaz, ainda, de prolongar os efeitos da SP por reduzir a função da endopeptidase neutra, uma protease que inativa a SP⁵⁸.

Sítios de ligação não foram encontrados em células glandulares. Dessa forma, apesar de haver fibras nervosas nos ácinos glandulares, a liberação do CGRP nas glândulas provavelmente não é capaz de estimular o processo de exocitose e liberação de muco glandular, por causa da ausência local de receptores específicos^{10, 55}.

3.2.2 Substância P

A SP é um produto do gene preprotaquinina A (PPT-I). Esse gene contém sete éxons, e a SP é codificada pelo éxon 3. Faz parte da família das taquicininas, que têm origem no mesmo gene PPT-I e possuem o mesmo peptídeo precursor. É sintetizado no núcleo de neurônios, especialmente em FSNMT-C¹². Possui o potencial de induzir vasodilatação, aumentar a permeabilidade vascular, a contração da musculatura lisa brônquica, a secreção de muco, exocitose de células serosas, degranulação de mastócitos, síntese de citocinas e fibroblastos, proliferação de células musculares lisas e quimiotaxia leucocitária¹⁰. Na mucosa nasal humana, as fibras nervosas sensitivas com SP apresentam a mesma distribuição do CGRP^{59, 60}. Fazem parte do chamado sistema NANC. Este sistema excitatório NANC pode ser ativado por estímulos mecânicos e químicos, e gera impulsos antidrômicos e um reflexo axonal local com a liberação de neuropeptídeos^{27,61,62}.

Os receptores de SP podem ser identificados espalhados pelo epitélio, glândulas e vasos⁵⁹. Dessa forma, a SP é capaz de estimular células epiteliais e células caliciformes⁵⁹. Possui também a propriedade de

estimular a vasodilatação e o extravasamento de plasma na pele e trato respiratório pelo aumento da permeabilidade capilar, o que contribui para a formação de edema tecidual^{10,27,63}. Possui, ainda, uma ação broncoconstritora poderosa. Sugere-se que a SP esteja diretamente envolvida na fisiopatologia da asma por causa de seus efeitos de vasodilatador, estimulador de secreção mucosa, broncoconstritor e indutor de inflamação na via aérea⁶². Isto ocorre por apresentar, também, a capacidade de estimular a função de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos. Possui, ainda, um efeito quimiotáxico potente nos neutrófilos e monócitos humanos com produção de citocinas (interleucina 6), estimulação para a degranulação de mastócitos e, em doses altas, é capaz de induzir a ativação de eosinófilos⁶⁴⁻⁶⁷.

3.2.3 Óxido nítrico sintase e óxido nítrico

O NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina por meio de uma ação enzimática. É uma molécula pequena e lipofílica, o que explica sua habilidade de se difundir de forma rápida e livre através das membranas celulares⁶⁸.

O NO é uma molécula importante e potente, relacionada à vasodilatação. Existem evidências que o NO possui ação neurotransmissora, broncodilatadora e reguladora do sistema mucociliar. Sugere-se, também, que possua ação antimicrobiana e antitumoral, além da possibilidade de influenciar a regulação da captação de oxigênio nas vias aéreas inferiores⁶⁹. Apresenta propriedades imunomoduladoras, porquanto pode inibir a adesão

leucocitária de células endoteliais vasculares em processos inflamatórios e aumentar a atividade de células *natural killer*⁷⁰.

O NO parece estar envolvido na estimulação da FBC por meio dos receptores β 2-adrenérgicos⁷¹. Também se sugere que a indução do aumento do cálcio intracelular ($[Ca^{+2}]_i$) por trifosfato de adenosina (ATP) extracelular sirva como gatilho e ative a via estimulatória da FBC do NO em traqueia de coelhos⁷². Por outro lado, em estudos realizados com ovelhas, o aumento da FBC durante o aumento do $[Ca^{+2}]_i$ não demonstrou dependência da atividade da NOS. De forma similar, drogas administradas com NO em sua composição não alteraram a linha de base da FBC^{73,74}.

As NOS são enzimas responsáveis pela produção de NO e seus produtos, e essas podem ser classificadas em três tipos: neural (nNOS) ou tipo I; induzível (iNOS) ou tipo II; endotelial (eNOS) ou tipo III⁷⁰. O nome das enzimas, nNOS e eNOS, foi atribuído por causa do local em que foram primeiramente identificadas⁶⁸. As enzimas nNOS e eNOS são ditas constitutivas por estarem presentes em condições normais, e seu funcionamento é cálcio dependente. A enzima iNOS é cálcio independente e é ativada em resposta à inflamação, e está presente em macrófagos, células dendríticas e hepatócitos⁶⁹. Dessa forma, sugere-se que nNOS e eNOS possuam um papel importante na manutenção da homeostase e fisiologia normal da mucosa nasal, enquanto a iNOS, possivelmente, participe como mediador em processos inflamatórios como da rinite alérgica, por exemplo⁷⁰.

O NO participa como mediador da liberação e atividade de neuropeptídeos das fibras nervosas do sistema NANC sobre a musculatura vascular lisa e o endotélio. Por causa de sua distribuição histológica, o NO parece possuir participação mais evidente na regulação do fluxo sanguíneo nasal, por sua propriedade de vasodilatador, que o caracteriza como um mediador importante no processo exudativo vascular neurogênico da mucosa nasal³¹.

3.3 Toxina Botulínica

3.3.1 Histórico - O botulismo

No final do século 18, a quantidade de casos de intoxicação alimentar fatal crescia no sudoeste da Alemanha, na região de Württemberg, por causa das condições precárias de higiene na produção de alimentos no campo, consequência da pobreza causada pela devastação trazida pela guerra Napoleônica⁷⁵. Em 1815, relatos e resultados de autópsias de pacientes intoxicados que vieram a óbito foram realizados por Johann Georg Steinbuch e Justin Kerner. Ao analisar esses relatos e considerar suas observações acuradas e consistentes, em 1817, o médico e professor Johan Heinrich Ferdinand Autenrieth, da Universidade de Tübingen, decidiu divulgá-los e estas, então, foram as primeiras publicações sobre o assunto^{76,77}. Justin Kerner prosseguiu seus estudos e publicou monografias, em 1820⁷⁸ e 1822⁷⁹. Em suas observações e experimentos, Justin Kerner foi capaz de produzir uma descrição completa dos sintomas, desenvolver

estudos científicos experimentais, detalhar hipóteses sobre a etiologia e a fisiopatologia da ação da toxina, sugerir formas de prevenção e tratamento do botulismo e desenvolver ideias de possível utilização terapêutica da toxina botulínica⁸⁰. Porém, somente em 1895, no vilarejo belga de Elezelles, o microbiologista Emile Pierre Marie Van Ermengem conseguiu isolar, pela primeira vez, um micro-organismo anaeróbico que denominou *Bacillus botulinus*, mais tarde renomeado para *Clostridium botulinum*⁸¹.

O botulismo humano está associado às toxinas botulínicas (TXB) tipo A, B, E e F. Essa doença é caracterizada por paralisia flácida progressiva, de nervos autonômicos e motores, e geralmente ocorre em um sentido de proximal para distal, inicia por músculos inervados pelos pares cranianos e termina nos membros inferiores. Nos casos mais graves pode ocorrer paralisia da musculatura respiratória que leva à falha na ventilação e morte se não for providenciado suporte imediato⁸².

3.3.2 Histórico - Desenvolvimento da toxina botulínica

A TXB é uma proteína complexa produzida pelo *Clostridium botulinum*⁸². Durante a Segunda Guerra Mundial, por causa da possibilidade da TXB vir a ser utilizada como arma de guerra, cresceu o interesse e a pesquisa sobre a mesma nos Estados Unidos da América (EUA). Formou-se, então, um centro de pesquisa em armas biológicas chamado *Fort Detrick*⁸³. Foi a partir daí que os estudos sobre a TXB ganharam força e, em 1946, Lamanna et al.⁸⁴ conseguiram obter uma forma mais purificada e cristalina da TXB-A. Mais tarde, em 1957, Duff et al.⁸⁵ aumentaram o grau

de pureza da TXB-A e, em seguida, Schantz e Johnosn⁸³, ao aperfeiçoar o método de purificação, obtiveram uma quantidade suficiente de TXB-A purificada para aplicação em pesquisa nos diversos campos da ciência.

Na década de 60, Scott et al.⁸⁶ iniciaram estudos com a TXB-A para o tratamento de estrabismo induzido em macacos rhesus, e os primeiros resultados foram publicados em 1973. Nesse estudo, a TXB-A foi capaz de reduzir a atividade daqueles músculos oculares extrínsecos hiperativos, e permitir um realinhamento ocular melhor. Mais tarde, em 1980, Scott⁸⁷ publicou o primeiro estudo sobre a aplicação da TXB-A em seres humanos para o tratamento do estrabismo, com resultados também positivos. No Quadro 1 estão as indicações atuais para o uso terapêutico da TXB-A.

Quadro1: Indicações para uso terapêutico da TXB-A, aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA).

Estado atual	Indicações
Indicações da TXB-A, aprovadas pelo FDA, para uso terapêutico	Estrabismo Blefaroespasma Espasmo hemifacial Distonia cervical Uso cosmético Hiperhidrose axilar Enxaqueca crônica Hiperatividade neurogênica do músculo detrusor
Indicações fora de bula da TXB-A	Desordens do trato urinário inferior Desordens do trato gastrointestinal Espasticidade Disfonia espasmódica Sialorréia Desordens da articulação temporomandibular Dor musculoesquelética crônica Vaginismo Cicatrização de feridas Neuropatia diabética

TXB-A = toxina botulínica tipo A
 FONTE: Modificado de Chen⁸⁸

3.3.3 Mecanismo de ação

A TXB é formada por uma mistura complexa de proteínas que contém a neurotoxina botulínica e várias outras proteínas não tóxicas associadas⁸⁹. A neurotoxina botulínica é um polipeptídeo de peso molecular 150kDa. Possui uma cadeia pesada (Cp) de 100kDa ligada a uma cadeia leve (Cl) de 50kDa. A ligação ocorre por meio de pontes não covalentes de dissulfeto (Cys 445 e Cys 436)⁸². Nessa formatação, a TXB apresenta-se relativamente inativa. É ativada quando a ligação entre a Cp e a Cl é quebrada por proteólise⁸⁹.

Existem sete sorotipos diferentes de TXB denominados A, B, C, D, E, F e G. Apesar de todos esses sorotipos inibirem a liberação da ACh na fenda sináptica, suas proteínas alvo intracelulares, a característica de ação e a potência variam substancialmente. A TXB-A tem sido o subtipo mais estudado para fins terapêuticos⁸⁹.

A Cp da TXB-A é dividida em um domínio de terminação amino (Cpn) e em um domínio de terminação carboxila (Cpc)⁸². O Cpc da TXB-A é responsável por acoplá-la a receptores específicos da membrana pré-sináptica da terminação nervosa, o que desencadeia um processo de endocitose e internalização da TXB-A em uma vesícula. Em seguida, dentro desta vesícula, o Cpn é responsável por translocar a Cl para fora da vesícula, liberando-a livremente para dentro do citoplasma⁸². A Cl da TXB-A quebra o SNAP 25, que é uma das proteínas do complexo SNARE localizadas na membrana pré-sináptica das células neurais²¹ (Figura 1). As proteínas do complexo SNARE são as responsáveis por acoplar e intermediar o processo de fusão da vesícula que contém neurotransmissores como a ACh à membrana pré-sináptica de células neurais, e promover sua liberação na fenda sináptica²². Dessa forma, a proteólise do SNAP 25 pela TXB-A impede a liberação de ACh na fenda sináptica, e causa, por exemplo, em neurônios motores eferentes que tiveram contato com a TXB-A, a paresia da musculatura estriada correspondente⁸⁹.

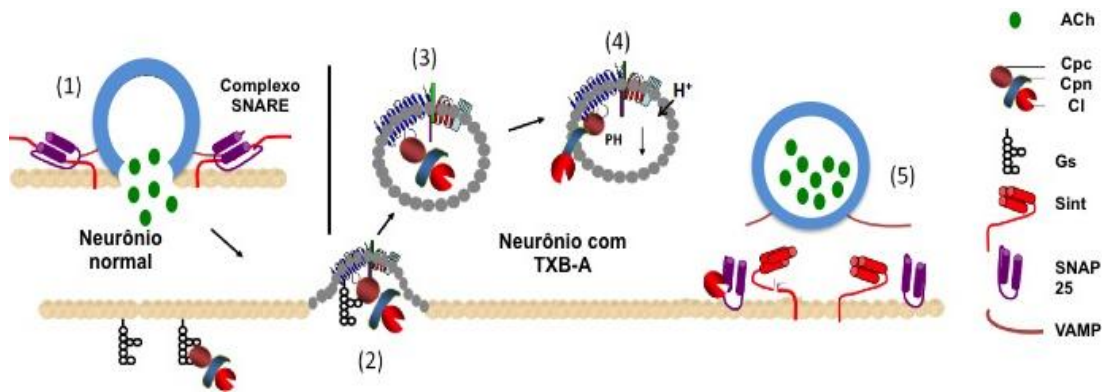


Figura 1: Mecanismo de ação da TXB-A. (1) Neurônio sem contato com a TXB-A e com complexo SNARE íntegro e ativado com a vesícula acoplada liberando ACh na fenda pré-sináptica; (2) Terminação carboxila da cadeia pesada (Cpc) da TXB-A liga-se à gangliosídeos (Gs) e inicia o processo de internalização da TXB-A em uma vesícula; (3) TXB-A internalizada numa vesícula dentro do neurônio; (4) Terminação amino da cadeia pesada (Cpn) que transloca a cadeia leve (Cl) para o citoplasma do neurônio; (5) Cl quebra a SNAP 25 e impede o acoplamento da vesícula que contém ACh.

FONTE: Modificado de Chen⁸⁸.

A TXB-A também possui efeitos no sistema nervoso autônomo (SNA). Estados como hiper-hidrose e hipersalivação são tratadas com sucesso com a TXB-A, evidenciando que o tecido glandular exócrino também é afetado⁸⁹. Portanto, a TXB-A pode afetar as fibras eferentes do SNA, e, aparentemente, seu mecanismo de ação sobre o SNA é o mesmo que ocorre na sinapse do sistema neuromuscular estriado⁸⁹.

3.3.4 A TXB-A no tratamento da rinite

A TXB-A está sendo testada para o tratamento da rinite, principalmente com o objetivo de reduzir a hipersecreção nasal ou rinorréia. Shaari et al.⁹⁰, em 1995, demonstraram que a TXB-A embebida em gaze e aplicada em uma das fossas nasais de cachorros, era capaz de reduzir a

secreção nasal, quando comparada com a fossa nasal contralateral tratada com soro fisiológico a 0,9% (SF0,9%).

Kim et al.¹⁷, em 1998, foram os primeiros a testar a TXB-A para tratamento da rinite em seres humanos. Selecionaram pacientes com rinite idiopática e injetaram TXB-A nos cornetos médio e inferior, em um total de quatro unidades em cada fossa nasal. Ao avaliar uma escala de cinco pontos quanto aos sintomas, a rinorréia e a quantidade de lenços nasais utilizados por dia por paciente foi reduzida de forma significativa em relação aos pacientes do grupo controle que receberam SF0,9%. Esta melhora manteve-se por um período de quatro semanas.

Rohrbach et al.⁹¹, em 2001, utilizaram 20 unidades de TXB-A em cada fossa nasal de *guinea pig*, administradas de forma tópica por meio de esponjas expansíveis (Merocel, Medtronic Xomed, Minneapolis, MN, EUA) e, compararam com a fossa nasal contralateral na qual nada foi colocado, e com um grupo controle para o qual foi administrado SF0,9% em apenas uma das fossas nasais. Detectaram sinais estatisticamente significativos de degeneração das glândulas nasais e de seus ductos, além de sinais de apoptose no tecido glandular que teve contato com a TXB-A. Esses sinais de degeneração tenderam a desaparecer após 12 semanas do tratamento com a toxina. De forma similar, Wang et al.¹⁹ também detectaram sinais de degeneração do epitélio glandular e dos ductos glandulares da mucosa nasal de *guinea pig* cuja mucosa nasal foi tratada com TXB-A.

Apesar da TXB-A ter sido descrita primeiramente como opção terapêutica para os casos de rinite idiopática, alguns autores relataram, também, seu benefício no tratamento da rinite alérgica. Ünal et al.⁹², em 2003, ao aplicar 20UI de TXB-A em cada corneto inferior de pacientes com rinite alérgica, demonstraram haver uma melhora significativa em relação aos sintomas de rinorréia, obstrução nasal e espirros, em comparação ao grupo controle que recebeu SF0,9%. Wen et al.³⁵, em 2007, analisaram o efeito da TXB-A na mucosa nasal de ratos na qual a rinite alérgica foi induzida mediante sensibilização com ovalbumina. A aplicação tópica nasal por meio de cotonóides de 10UI de TXB-A em cada fossa nasal, foi capaz de reduzir a expressão de SP e peptídeo intestinal vasoativo (VIP) no epitélio respiratório e abaixo dele, ao redor de vasos sanguíneos e perto de glândulas serosas. Yang et al.⁹³, em 2008, avaliaram os efeitos da injeção de 25UI de TXB-A em cada corneto inferior de pacientes com rinite alérgica. Utilizaram para comparação outros dois grupos, em que um deles recebeu a injeção de corticosteroide triancinolona e o outro de SF0,9%, ambos aplicados também nos cornetos inferiores. A aplicação de TXB-A resultou em melhora significativa em relação ao grupo que recebeu corticosteroide quanto aos sintomas de rinorréia e obstrução nasal. Os efeitos benéficos da TXB-A perduraram por 20 semanas.

Rohrbach e Laskawi (2001)⁹⁴ descreveram pela primeira vez, em um relato de caso, a aplicação da TXB-A por meio de esponjas expansíveis não absorvíveis (Merocel, Medtronic Xomed, Minneapolis, MN, EUA) em seres humanos. Utilizaram 20UI de TXB-A em uma paciente com hipersecreção

nasal por causa de RI, deixando as esponjas expansíveis por 30 minutos em cada fossa nasal. A paciente relatou redução da secreção nasal e apresentou melhora do fluxo aéreo nasal avaliado por rinomanometria. Mais tarde, em 2009, Rohrbach et al.¹⁶, ao utilizar esse mesmo método de aplicação da toxina, minimamente invasivo, demonstraram que alguns pacientes com rinite idiopática apresentaram melhora da rinorréia e também dos espirros. Porém, naqueles pacientes que não mostraram melhora, sugerem que isso possa ter ocorrido por causa da presença de outros neuroreguladores envolvidos na fisiopatologia da rinite idiopática, além da própria ACh, como alguns neuropeptídeos também presentes na mucosa nasal. Porém, há indícios de que a TXB-A influencie também a expressão de alguns desses neuropeptídeos. Comentam, ainda, que esse talvez seja um dos motivos pelo qual alguns pacientes não respondam ao tratamento tópico nasal com o anticolinérgico brometo de ipatrópio, mas sim, de modo satisfatório, ao tratamento com TXB-A. Por outro lado, Sapci et al.²⁰, em 2008, apresentaram respostas semelhantes no tratamento de pacientes com rinite idiopática ao utilizar brometo de ipatrópio e TXB-A. Esses resultados conflitantes denotam a incerteza sobre a real função e importância que possuem os neuropeptídeos na neuroregulação nasal e fisiopatologia da RI. Heppt et al.¹², ao avaliar indivíduos com rinite idiopática e comparar amostras de sua mucosa nasal com controles saudáveis, detectaram aumento da expressão dos neuropeptídeos CGRP, neuropeptídeo Y (NPY), VIP e SP, e a diferença nestes dois últimos mostrou ser estatisticamente significativa. Dessa forma, na RI, também denominada na literatura como

rinite vasomotora, intrínseca ou não alérgica não infecciosa, o papel real desses neurotransmissores e neuropeptídeos ainda é incerto. Especula-se que este grupo denominado de rinite idiopática, seja na verdade formado por subgrupos de rinite de diferentes etiologias, provavelmente sobrepostas em alguns casos, mas sem critérios diagnósticos bem definidos³.

A fisiopatologia precisa da RI é desconhecida. Um fator possível, associado à sua gênese, seria a disfunção de receptores de estímulos nocivos da mucosa nasal associados às FSMT-A δ e, principalmente, às FSMT-C. O uso tópico nasal de capsaicina, por exemplo, é eficaz no tratamento da rinite idiopática, pois é capaz de causar a depleção dos neuropeptídeos CGRP e SP após repetidas instilações na mucosa nasal, por causa da propriedade de degeneração seletiva dessas FSMT-C¹⁵. Esses achados sugerem que o funcionamento destes receptores de estímulos nocivos possui um papel importante na fisiopatologia da RI⁶. Sendo assim, a influência da TXB-A sobre os neuropeptídeos da mucosa nasal talvez seja tão importante quanto sua ação de bloqueio colinérgico no que se refere ao tratamento da RI. Este, talvez seja um dos motivos pelo qual alguns pacientes com rinite idiopática não apresentem alívio dos sintomas ao utilizar o brometo de ipatrópio nasal (um anticolinérgico), mas apresentem uma resposta razoável ao tratamento com TXB-A.

3.3.5 A TXB-A e seus efeitos antinociceptivos

A evidência clínica inicial da capacidade da TXB-A aliviar os sintomas da dor ocorreu quando as pessoas que receberam TXB-A para o tratamento

de rugas glabulares relataram uma melhora também na intensidade e frequência dos episódios de enxaqueca⁹⁵. Essas observações marcaram a entrada da toxina botulínica no campo da pesquisa da dor, e atraíram uma grande quantidade de cientistas para investigar a possibilidade de sua aplicação no tratamento da dor crônica⁹⁶.

Sugere-se que o mecanismo da antinocicepção, induzido pela TXB-A, envolva a prevenção da liberação de neuropeptídeos como a SP e CGRP dos neurônios sensitivos primários^{24,43}. Morris et al.²⁶, ao avaliar o efeito da TXB-A em artérias uterinas de *guinea pig*, relataram que neuropeptídeos como VIP e CGRP, armazenados em vesículas grandes e densas (VGDs), são parcialmente bloqueados pela TXB-A. Já as vesículas pequenas (VPs) que contêm apenas ACh são completamente bloqueadas.

Rapp et al.³⁹ observaram que a TXB-A inibe a liberação de CGRP de terminações nervosas de neurônios sensitivos de bexigas de ratos, estimuladas com capsaicina.

Cui et al.⁹⁷, em 2004, foram os primeiros a demonstrar que a injeção subcutânea de TXB-A na pata traseira de ratos diminui a dor inflamatória induzida por formalina. Este é um achado importante, visto que a dor produzida pela formalina não tem relação com a tensão muscular, pois primeiro estimula de forma direta os receptores nociceptivos, e somente depois origina dor em razão do processo inflamatório⁹⁸. Isto indica que o efeito antinociceptivo da TXB-A é causado não apenas pelo bem

reconhecido efeito na junção neuromuscular, mas também por seu efeito inibitório no sistema nociceptivo⁹⁸.

Wheeler et al.⁹⁹ citam que a TXB-A, quando injetada intra-articular, tem a capacidade de aliviar a dor em articulações dolorosas de pacientes com ou sem sinais de inflamação. Isto ocorre por causa da capacidade de a TXB-A se ligar às FSNMT-C, bloquear a liberação de vesículas que contêm SP, CGRP e glutamato, todos mediadores da dor, capazes de gerar a transmissão neural de estímulos dolorosos e causar a sensibilização desses receptores de dor⁹⁹.

Guoa et al.¹⁰⁰ citam que o modelo de dor inflamatória da capsaicina¹⁰¹ baseia-se no estímulo de neurônios sensoriais das chamadas FSNMT-C. A capsaicina liga-se ao canal catiônico do receptor de potencial transiente vanilóide tipo 1 (TRPV1) dessas FSNMT-C. Este modelo pode causar dor intensa em razão da liberação de SP e CGRP. Porém, depois de repetidas administrações, é capaz de reduzir o limiar doloroso mecânico e térmico, por depleção destes neuropeptídeos¹⁰². Bach-Rojecky et al. (2005)¹⁰² relataram que o pré-tratamento com TXB-A, durante seis dias antes do contato com a capsaicina, atenua de forma significativa o estímulo doloroso induzido.

Bach-Rojecky et al.¹⁰³, ao utilizar o modelo experimental de neuropatia diabética em ratos, demonstraram redução da hiperalgesia após a aplicação de TXB-A periférica (pata traseira) e central (intratecal) em dose única. O efeito antinociceptivo da TXB-A durou até quatro semanas. A redução da dor bilateral, após a aplicação periférica da toxina unilateral e a

eficácia, e início rápido da ação, após injeção intratecal de dose baixa da TXB-A, permitem sugerir, de acordo com os autores, um possível envolvimento do SNC na ação antinociceptiva da TXB-A. Sugerem, ainda, a possibilidade de haver transporte axonal retrógrado de TXB-A, muito provavelmente dentro dos neurônios sensoriais, o que explica o efeito antinociceptivo da TXB-A contralateral ao lado aplicado. Da mesma forma, Antonucci et al. (2008)¹⁰⁴ relataram a primeira evidência bioquímica da presença de SNAP 25 quebrada pela TXB-A em pontos distantes do local da injeção, sugerindo, também, um transporte axonal de TXB-A nos neurônios.

3.3.6 A TXB-A e seu efeito sobre o NO

Rohrbach et al.¹⁰⁵ avaliaram o efeito da TXB-A sobre a nNOS, e concluíram que, aparentemente, a TXB-A não possui efeito sobre o processo fisiológico de regulação e modulação nasal gerido pelo NO. Por outro lado, Ellies et al. demonstraram que a TXB-A reduz a expressão de nNOS em glândulas parótidas⁴¹ e submandibulares⁴⁰ de camundongos.

3.3.7 A TXB-A e o transporte mucociliar

A mucosa nasal é predominantemente revestida por epitélio colunar ciliado pseudoestratificado. Este epitélio é rico em células ciliadas, recobertas por uma camada fina de muco. O TMC ocorre graças às propriedades reológicas deste muco e ao batimento ciliar, que compõe o sistema primário e essencial de defesa de todo sistema respiratório³³. A

depuração do TMC é de importância fundamental na fisiopatologia das rinites¹.

O mecanismo do batimento ciliar ocorre de dois modos: o primeiro, sob condições fisiológicas, mantém taxas mais baixas de batimento ciliar e requer apenas ATP e, provavelmente, envolve somente mecanismos da própria estrutura ciliar; o segundo, deflagrado sob condições de estresse, possui taxas mais altas de batimento ciliar e envolve, adicionalmente, um mecanismo de controle regulado por mensageiros secundários¹⁰⁶. Essa capacidade de resposta ciliar às mais variadas condições ambientais só é possível por causa da grande variedade de receptores capazes de induzir eventos intracelulares nas células ciliadas, levando a esse aumento da FBC. Isso inclui receptores purinérgicos, adrenérgicos e colinérgicos.

A ACh aumenta a FBC por meio de seus receptores colinérgicos muscarínicos, principalmente M1 e M3³⁰. Isto resulta em uma série de reações e eventos moleculares, destacando-se entre eles um aumento do $[CA^{2+}]_i$. De forma semelhante à ACh, a SP em palatos excisados de rã, age também aumentando a FBC de forma direta e também indireta, mediante estimulação da liberação da própria ACh¹⁰⁷. O sulfato de atropina (anticolinérgico) é capaz de reduzir a FBC¹⁰⁷.

Ao considerar a fisiologia do TMC e, apesar da TXB-A possuir a capacidade de inibir a exocitose de ACh e potencial de interferir na expressão de diferentes neuropeptídeos^{24,25,35-43} envolvidos na neuroregulação da mucosa nasal, poucos artigos comentam os possíveis

efeitos da TXB-A sobre o TMC. Fisher et al.⁴⁴, em 1998, em uma revisão de pacientes com disfonia espasmódica tratados com TXB-A, suspeitaram da interferência da TXB-A na dinâmica do TMC, porque alguns desses pacientes apresentavam queixas de sensação de estase da secreção laríngea, após a aplicação da TXB-A no músculo tireoaritenóideo. Por isso, aventaram a possibilidade da TXB-A prejudicar o batimento ciliar, o que poderia resultar no acúmulo de secreção local por interferência no TMC. Porém, nesse estudo, nenhuma medida objetiva para a avaliação da FBC foi utilizada para comprovar a hipótese sugerida.

4 MÉTODOS

4 MÉTODOS

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP) sob o protocolo 326/10 (Apêndices 1 e 2).

Foram utilizados trinta e três coelhos da linhagem Nova Zelândia (albinos, machos, adultos), pesando entre 3kg e 4kg, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (BC-FMUSP). Os animais foram alimentados e mantidos de acordo com normas já padronizadas, havendo controle de temperatura, umidade e ciclo de luz adequada para essa espécie¹⁰⁸. Animais que apresentavam sinais clínicos e de exame físico que sugerissem doença nasossinusal, como rinorréia purulenta, foram excluídos da pesquisa. Os animais foram anestesiados e manuseados no Laboratório de Habilidades de Otorrinolaringologia da FMUSP.

Para anestésiar os animais foi utilizado, por via intramuscular, cloridrato de midazolam (2mg/kg), citrato de fentanila (0,05mg/kg) e cloridrato de xilazina (2mg/kg). Uma vez anestesiado, o animal foi posicionado em decúbito dorsal sobre calha cirúrgica apropriada. Neste momento também foi administrado antibiótico via intramuscular (enrofloxacino 2,5mg/kg/dia) e mantido por 2 dias seguidos após o experimento.

4.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos, um controle (n=14) e outro tratamento (n=19). Nos animais do grupo controle, a fossa nasal esquerda não sofreu intervenção, e a fossa nasal direita recebeu SF0,9%. Nos animais do grupo tratamento, a fossa nasal esquerda recebeu SF0,9%, e a fossa nasal direita recebeu TXB-A (Botox, Allergan, Irvine, CA, EUA) (Quadro 2).

Quadro 2: Grupos de estudo.

Grupo Controle		Grupo Tratamento	
FN direita	FN esquerda	FN esquerda	FN direita
SF0,9%	sem intervenção	SF0,9%	TXB-A

FN = fossa nasal; SF0,9% = soro fisiológico a 0,9%; TXB-A = toxina botulínica tipo A.

Uma única intervenção foi realizada durante o estudo, e os animais foram analisados após 14 dias. O SF0,9% e a TXB-A (25UI) foram aplicados logo após os animais serem anestesiados. Todas as soluções foram aplicadas com um mesmo volume (0,6mL), na fossa nasal correspondente, por meio de um fragmento de esponja expansível não absorvível de acetato de polivinil hidroxilato (Merocel 440400, Medtronic Xomed, Minneapolis, MN, EUA) com 4,0cmx0,8cmx0,5cm, que revestia completamente um cateter intravenoso número 18 (1,3mmx45mm). Apenas a extremidade com o adaptador para acoplamento da seringa ficou voltado para fora da esponja e

da fossa nasal (Figuras 2 e 3). Após colocada a esponja na fossa nasal de forma atraumática, a agulha guia do cateter foi retirada, restando apenas a cânula de fluoroetilenopropileno dentro da esponja. Em seguida, uma seringa de 1mL contendo 0,6mL da solução correspondente foi acoplada e a esponja embebida de forma retrógrada e uniforme, à medida que se retirava a cânula de dentro da esponja, evitando desperdício da solução. A esponja, após ser embebida, expandiu-se e preencheu os espaços da fossa nasal correspondente, permitindo contato com toda a superfície da concha nasomaxilar (CNM, que corresponde à concha nasal inferior de seres humanos). A esponja embebida permaneceu na fossa nasal por 30 minutos.

Após a recuperação anestésica os animais foram reencaminhados ao BC-FMUSP, onde foram alojados em gaiolas individuais, e receberam dieta padrão e cuidados conforme rotina habitual. Após 14 dias os animais foram submetidos à nova indução anestésica via intramuscular com midazolam (2mg/kg) e citrato de fentanila (0,05mg/kg). Em seguida foram submetidos à eutanásia mediante infusão intravascular de tiopental sódico (100mg/kg). Estas drogas, nas respectivas dosagens, não apresentam influência direta sobre a FBC¹⁰⁹. Na sequência procedeu-se a retirada das conchas nasomaxilares (CNMs) por acesso cirúrgico através do dorso nasal (Figura 4) e sob visibilização por meio de microscópio (Zeiss OPMI, Carl Zeiss, Oberkochen, BW, Alemanha), sem manipular a face medial das CNMs.

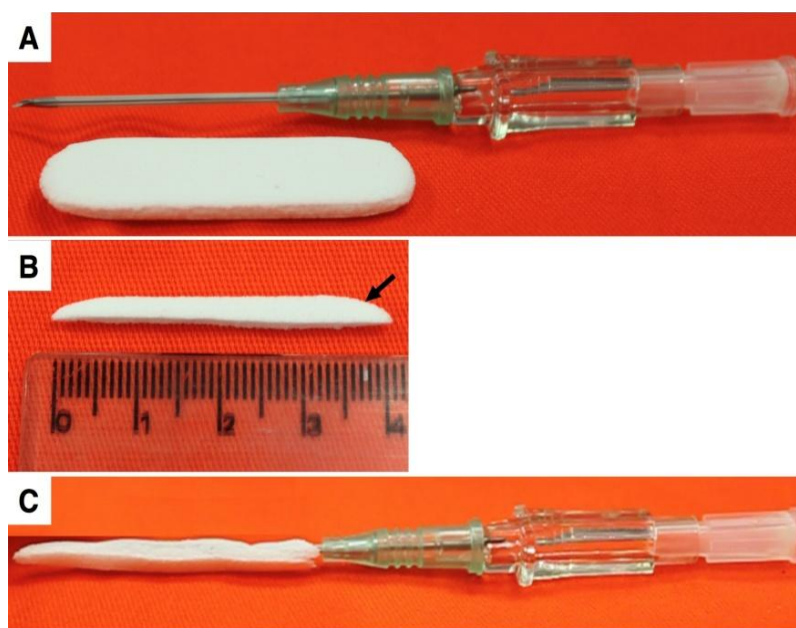


Figura 2: (A) Esponja e cateter intravenoso; (B) Fragmento de esponja (seta); (C) Fragmento de esponja já cateterizado e pronto para inserção na fossa nasal do coelho.

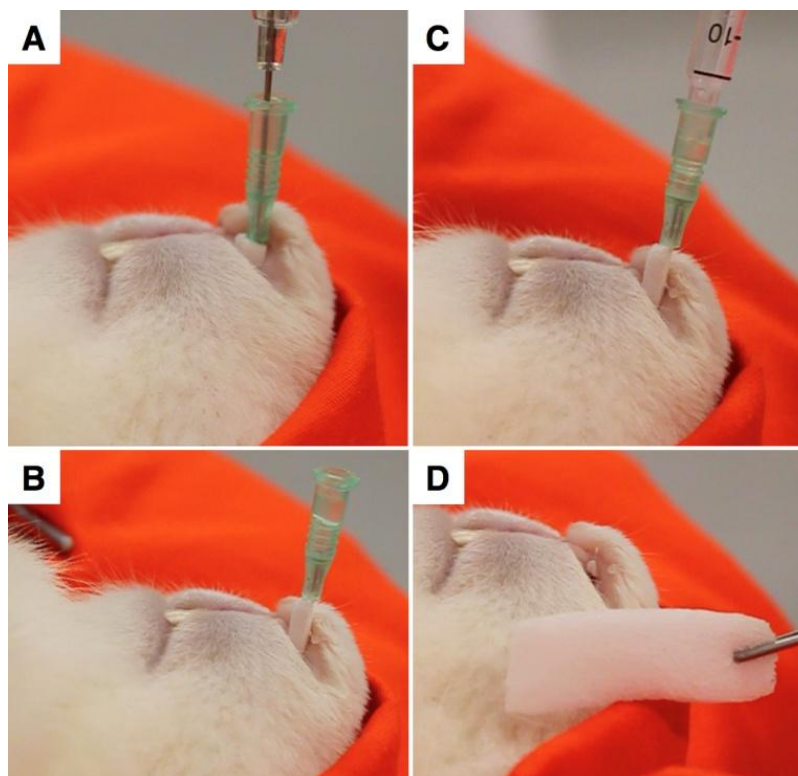


Figura 3: (A) Fragmento da esponja com o cateter intravenoso já colocado na fossa nasal e agulha guia metálica sendo retirada; (B) Agulha guia metálica já retirada; (C) Seringa de 1mL com solução acoplada para embebição da esponja; (D) Fragmento da esponja já expandido e retirado da fossa nasal ao final do período de 30 minutos.

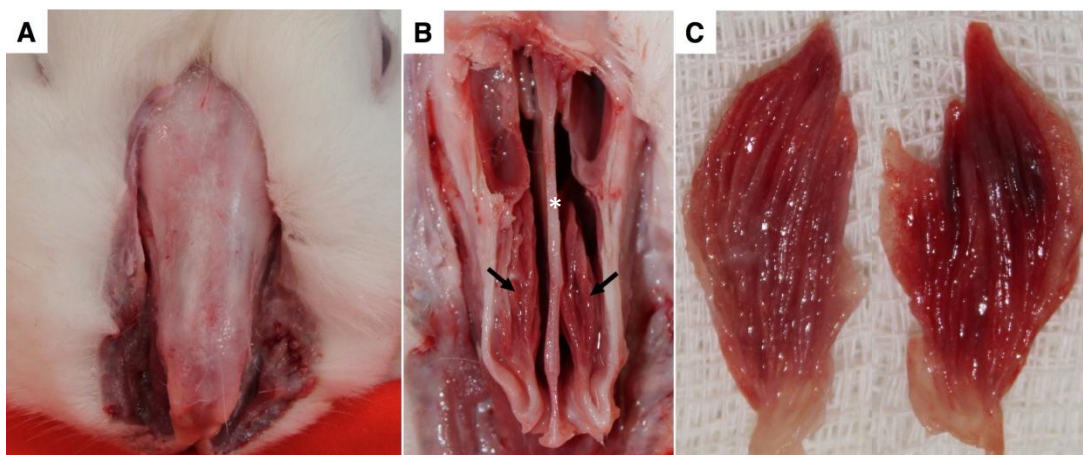


Figura 4: (A) Dissecção dos tecidos moles do dorso nasal; (B) Retirado o dorso nasal ósseo expondo-se as fossas nasais, conchas nasomaxilares (setas) e septo nasal (asterisco); (C) Conchas nasomaxilares retiradas e prontas para avaliação da FBC.

4.2 Avaliação da frequência de batimento ciliar

Imediatamente após terem sido retiradas, as CNMs foram levadas para o Laboratório de Poluição Atmosférica da FMUSP para mensuração da FBC. As medidas foram realizadas na face medial da cada CNM. Todas as leituras foram realizadas nos 30min após a eutanásia dos animais. De forma aleatória era selecionada em qual CNM (direita ou esquerda) seria realizada a leitura da FBC primeiro. O método utilizado foi semelhante ao descrito por Braga¹¹⁰ e já aplicado em outros estudos¹¹¹. Utilizou-se um equipamento composto por câmera filmadora (Sony Triniton, 3CCD, Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio óptico (Olympus, BX50, Tóquio, Japão), sob o qual foi colocada a CNM (Figura 5).



Figura 5: Equipamento usado no Laboratório de Poluição Atmosférica para mensuração da FBC das CNMs: (1) Estroboscópio; (2) câmera filmadora; (3) microscópio óptico; (4) monitor.

Um estroboscópio que emite pulsos de luz com frequência inicial de 30,30Hz foi direcionado para a superfície do epitélio. A imagem iluminada pela luz estroboscópica e capturada pela câmera filmadora foi transmitida para um monitor, que permitiu a observação do epitélio e do batimento ciliar. Ao observar o batimento ciliar, a frequência da luz estroboscópica foi reduzida gradativamente até não ser mais possível identificar o movimento dos cílios (o equipamento possui um programa de computador que permite controlar a frequência da luz emitida), que significou que o batimento ciliar estava em concordância com a frequência dos pulsos de luz emitidos pelo

estroboscópio. A frequência foi então anotada e o processo repetido por mais duas vezes em áreas diferentes do epitélio. Em seguida, cada CNM foi colocada em formol tamponado a 10% por 24 horas. Posteriormente, as CNMs foram colocadas em etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 5% por 14 dias para descalcificação¹¹².

4.3 Preparo histopatológico

As CNMs foram cortadas transversalmente em três níveis diferentes, embebidas em parafina e processadas de acordo com a rotina histológica. Foram realizados cortes com 5µm de espessura. As lâminas foram preparadas e coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) e azul alciano (AB) com pH de 2,5. Por meio desta técnica, as glicoproteínas neutras foram coradas na cor vermelha (PAS+) e as glicoproteínas ácidas foram coradas na cor azul (AB+)¹¹³. Isto permitiu uma análise quantitativa e qualitativa (perfil histoquímico) do muco nasal.

4.4 Detecção de células apoptóticas

A análise da quantidade de células apoptóticas foi realizada por intermédio do teste *terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling* (TUNEL, Roche, Indianapolis, IN, EUA). Durante o processo de apoptose ocorre a clivagem do DNA genômico. O teste do

TUNEL marca, preferencialmente, segmentos de DNA clivados durante a apoptose. Esse teste foi realizado de acordo com a rotina do Laboratório de Imuno-histoquímica da FMUSP¹¹⁴. As lâminas foram desparafinadas em três banhos de xilol durante 5min cada (um à 60°C e dois à temperatura ambiente), reidratadas em gradiente de etanol (100%, 95%, 90%, 80%, 70%) e incubadas em proteinase K por 15min à 30min em temperatura ambiente. Após a lavagem em dois banhos de 3min cada em tampão fosfato (PBS), foram incubadas em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 0,3% e em metanol, por 30min, à temperatura ambiente. A seguir, foram lavadas duas vezes em PBS e após a secagem da área em torno da amostra, foram pipetados 50µL da mistura de reação TUNEL. Em seguida, as amostras foram incubadas sob parafilme em câmara úmida a 37°C por 60min e então lavadas três vezes em PBS. A área em torno da amostra foi secada para pipetar 50µL do conversor de peroxidase (POD). Em seguida, as amostras foram incubadas sob parafilme em câmara úmida a 37°C por 30min e lavadas três vezes em PBS, por 3min cada. Posteriormente, a reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB) a 0,2% com H₂O₂ a 0,05% em PBS. Em seguida, foram lavadas três vezes em PBS por 3min cada. Na sequência, as amostras foram contracoradas por verde de metila, após lavagem em água destilada, desidratação por etanol e banho em xilol. Por fim, as lâminas foram montadas com lamínulas de vidro e Permount.

4.5 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica foi realizada para avaliar a expressão dos neuropeptídeos no epitélio respiratório das CNMs dos diferentes grupos de estudo. A imuno-histoquímica utilizada para a pesquisa dos anticorpos contra SP, CGRP e nNOs seguiu o método biotina-estreptavidina peroxidase¹¹⁵. Cortes histológicos de 3µm de espessura foram realizados em lâminas sinalizadas (3-Aminopropil-trietoxi-silano) (Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) e seguiu-se o protocolo abaixo descrito.

4.5.1 Hidratação

As lâminas foram desparafinadas com xilol quente (65°C) por 15min e três banhos com xilol frio. Em seguida, foram lavadas com dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool a 95 %, um banho de álcool a 70% e hidratadas em água corrente. Também foi realizado um banho de 3min em ácido fórmico, e, em seguida, novamente lavadas em água corrente e ultrapura.

4.5.2 Recuperação antigênica

Seguiu-se a recuperação antigênica realizada em alta temperatura em Panela Pascal, com tampão citrato e pH 6,0 à 123°C por 3min. A temperatura e o tempo de recuperação foram de 125°C e 1min, respectivamente. Após este período, as lâminas foram lavadas em água corrente e ultrapura.

4.5.3 Bloqueio

Seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 10 volumes a 3% e metanol volume a volume, por quatro vezes de 5min cada. Na sequência, procedeu-se a lavagem em água corrente, ultrapura e PBS com pH 7,2 a 7,4. Para o bloqueio da biotina endógena foi utilizada caseína por 5min e três banhos de PBS na sequência.

4.5.4 Incubação com o anticorpo primário

Após a realização dos bloqueios, o anticorpo primário da SP (código MAB356, Millipore, Billerica, MA, EUA) título 1:300; o anticorpo primário da nNOs (código ab72428, Abcam, Cambridge, CB, Inglaterra) título 1:3200; e, o anticorpo primário do CGRP (código ab81887, Abcam, Cambridge, CB, Inglaterra), título 1:750; foram diluídos em albumina de soro bovino (BSA) e aplicados sobre as amostras e controles positivos. Para o controle negativo foi utilizado apenas o BSA. Em seguida, as lâminas foram incubadas à 4°C. Na etapa seguinte, as lâminas foram lavadas em PBS e o *Kit* Vectastain ABC biotilado (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) foi utilizado como anticorpo secundário. Deste *Kit*, para o anticorpo CGRP utilizou-se o código PK-6102; para SP o código PK-6104 e para nNOs o código PK-6105. Todas as lâminas foram incubadas por 30min à 37°C. Seguiu-se a revelação por meio do cromógeno 3,3 DAB líquido por 5min (nesta etapa foi preciso acompanhar a revelação ao microscópio). As lâminas foram lavadas de forma abundante em água corrente e contracoradas com hematoxilina de

Harris (Merck, Darmstadt, HE, Alemanha). Em seguida, as mesmas foram lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e montadas com resina para microscopia Entellan (Merck, Darmstadt, HE, Alemanha).

4.6 Análise das lâminas

Para a quantificação das áreas coradas, todas as lâminas foram digitalizadas (Pannoramic Scan, 3DHitech, Budapeste, BP, Hungria), com aumento de 200x. Nesse momento as imagens digitalizadas foram renumeradas de forma aleatória. Dessa forma o pesquisador responsável pela análise das imagens não sabia a qual grupo pertencia cada uma delas. Com auxílio do programa Pannoramic Viewer (3DHitech, Budapeste, BP, Hungria) as imagens foram exportadas em sua resolução máxima (1024x1024) para arquivos no formato TIFF e posteriormente convertidas para JPG. Utilizou-se o programa Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, MD, EUA) para análise das imagens como descrito anteriormente^{116,117}. Em cada lâmina foram selecionadas, de forma aleatória, sete áreas de interesse (AI). Cada AI foi subdividida em duas camadas para análise: 1) a camada interna (CI: área entre a membrana basal e a superfície da cartilagem ou osso); 2) a camada externa (CE: área entre a superfície do epitélio e a membrana basal). A espessura média da CE (ESP-CE, distância média entre a superfície do epitélio e a membrana basal) também foi analisada. No programa Image Pro Plus 4.5 foi definido o espectro de cores, determinado como “positivo” para cada marcador e salvo na forma de um

padrão. Para isso, diferentes amostras de imagens de cada anticorpo e das lâminas PAS+ e AB+ de cada grupo (6-8 lâminas cada), assim como controles negativos, foram analisadas por patologistas experientes do Departamento de Patologia da FMUSP. Para os resultados da expressão dos anticorpos o padrão foi aplicado de forma a obter a área de positividade (AP; μm^2) e a densidade óptica integrada (IOD; 0-255), utilizando-se uma fórmula matemática (elaborada pelo Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz Silva, do Departamento de Patologia da FMUSP) que reunia esses dados, a saber:

$$\{[255 - (IOD / AP)] \times AP\} / AT$$

Na qual: AT = área total analisada (μm^2)

Nas imagens das lâminas PAS+ e AB+ o padrão foi aplicado de forma a obter a AP, e os dados foram uniformizados pelo comprimento da membrana basal (μm). A análise da quantidade de células apoptóticas foi realizada célula a célula e os dados uniformizados também pelo comprimento da membrana basal (μm).

4.7 Estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa SPSS 20 (IBM, Chicago, IL, EUA). De acordo com a distribuição de cada variável, utilizou-se o teste de análise de variância (ANOVA) ou Kruskal-Wallis. Foi

aplicado o teste Tukey como *post hoc* do teste ANOVA, e o teste de Dunn¹¹⁸ no caso do teste de Kruskal-Wallis, ajustando-se o valor de p.

O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Apoptose celular

A quantidade de células apoptóticas apresentou um aumento significativo no grupo tratamento (Tabela 1 e Figura 6). Na camada externa, a quantidade de células apoptóticas (APOP-CE) (Gráfico 1) apresentou aumento significativo nas CNMs do grupo tratamento que recebeu TXB-A ao comparar com as CNMs do grupo controle que receberam SF0,9% ($p=0,001$) e as CNMs que não sofreram intervenção ($p=0,001$). A quantidade de células apoptóticas na camada interna (APOP-CI) (Gráfico 2) também apresentou aumento significativo nas CNMs do grupo tratamento que recebeu TXB-A ao comparar com as CNMs do grupo controle que receberam SF0,9% ($p<0,001$) e que não sofreram intervenção ($p<0,001$). A APOP-CI nas CNMs do grupo tratamento que receberam SF0,9% também apresentaram aumento significativo ao comparar com as CNMs do grupo controle que receberam SF0,9% ($p=0,035$) e às que não sofreram intervenção ($p=0,022$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os demais grupos.

Tabela 1 – Quantidade de células apoptóticas.

	Controle (n=14)		Tratamento (n=19)		p
	SF0,9%	Sem intervenção	SF0,9%	TXB-A	
APOP-CE	1,1x10 ⁻³ [0,26-2,69]	1,1x10 ⁻³ [0,39-1,72]	2,6 x10 ⁻³ [1,14-3,96]	6,1 x10 ⁻³ [2,74-10,97]	<0,001*
APOP-CI	0,9 x10 ⁻³ [0,67-1,90]	0,9 x10 ⁻³ [0,42-1,92]	2,2 x10 ⁻³ [1,62-3,99]	3,5 x10 ⁻³ [2,20-4,23]	<0,001*

n = quantidade de animais; SF0,9% = soro fisiológico a 0,9%; TXB-A = toxina botulínica tipo A; APOP-CE = quantidade de células apoptóticas na camada externa; APOP-CI = quantidade de células apoptóticas na camada interna; Valores expressos em mediana e quartis [25%-75%];

Dados uniformizados pelo comprimento da membrana basal (quantidade de células apoptóticas/ μ m);
 Teste de Kruskal-Wallis utilizado para comparação dos dados;

*diferença estatisticamente significativa

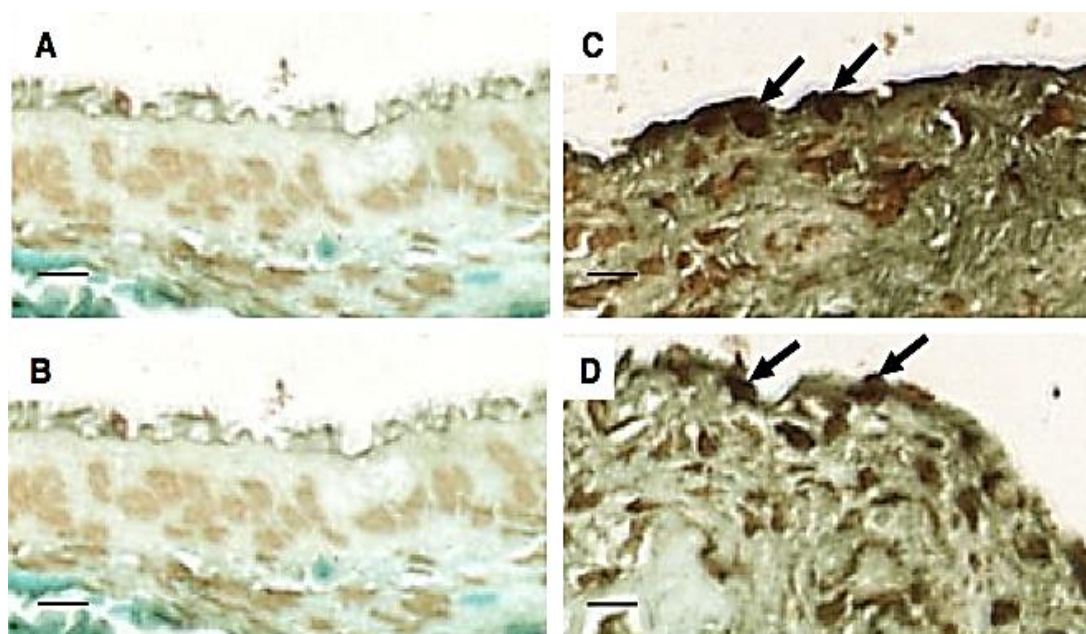


Figura 6: Reação TUNEL para detecção de células apoptóticas em concha nasomaxilar (CNM). Barra da escala 10 μ m. (A) CNM sem intervenção do grupo controle; (B) CNM SF0,9% grupo controle; (C) CNM SF0,9% grupo tratamento; (D) CNM TXB-A grupo tratamento. Setas apontam células apoptóticas.

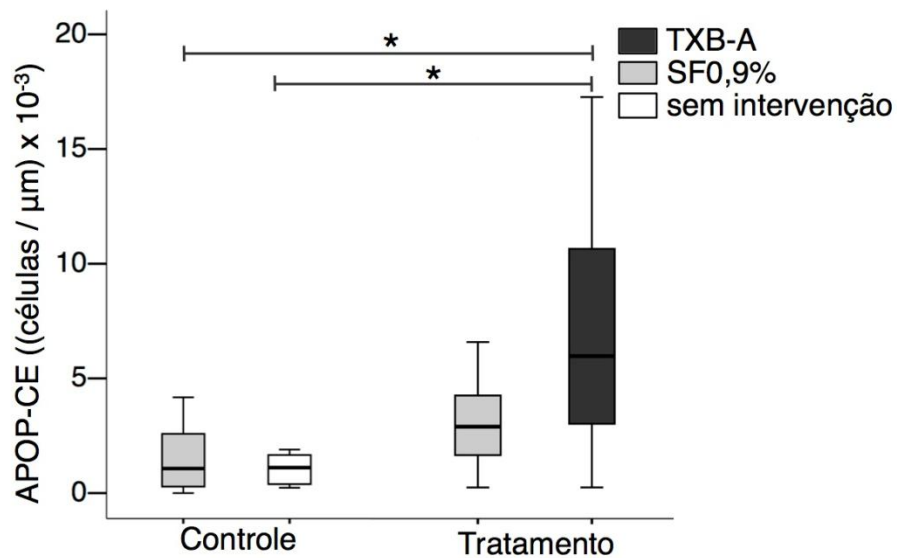


Gráfico 1: Quantidade de células apoptóticas na camada externa (APOP-CE) das conchas nasomaxilares. As caixas representam o intervalo interquartil [25%-75%] e a linha horizontal dentro delas o valor da mediana. Dados uniformizados pelo comprimento da membrana basal (μm). Teste de Kruskal-Wallis utilizado para comparação e correção *post-hoc* realizada por meio do Teste de Dunn. * $p=0,001$.

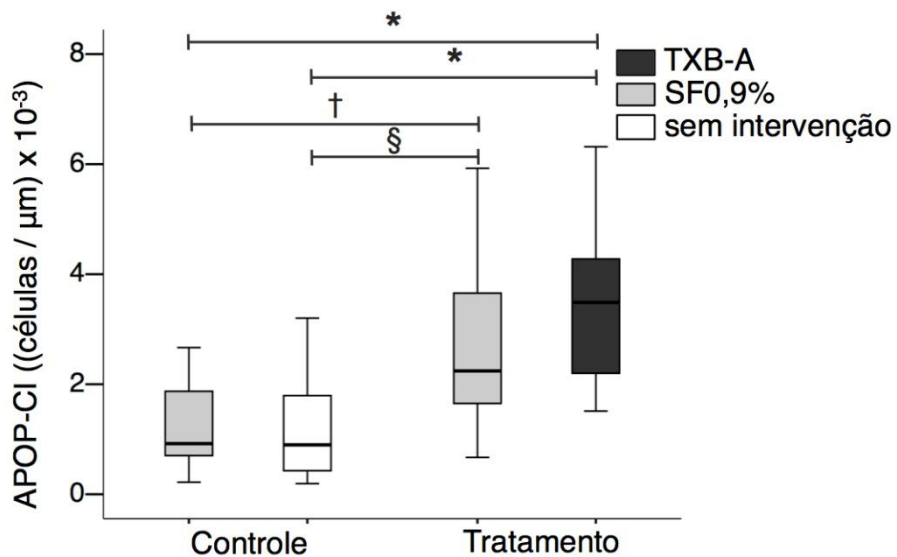


Gráfico 2: Quantidade de células apoptóticas na camada interna (APOP-CI) das conchas nasomaxilares. As caixas representam o intervalo interquartil [25%-75%] e a linha horizontal dentro delas o valor da mediana. Dados uniformizados pelo comprimento da membrana basal (μm). Teste de Kruskal-Wallis utilizado para comparação e correção *post-hoc* realizada por meio do Teste de Dunn. * $p<0,001$. † $p=0,035$. § $p=0,022$.

5.2 Neuropeptídeos

O CGRP e a SP apresentaram aumento de sua expressão na mucosa nasal dos animais do grupo tratamento (Tabela 2).

Tabela 2 – Dados sobre imuno-histoquímica para avaliação da expressão de CGRP e SP.

	Controle (n=14)		Tratamento (n=19)		p
	SF0,9%	Sem intervenção	SF0,9%	TXB-A	
SP-CE	31,3 ± 17,0	33,4 ± 12,6	57,2 ± 34,5	45,7 ± 24,3	0,013*
SP-CI	1,4 [0,6-1,9]	1,3 [0,5-1,7]	2,5 [1,2-2,5]	1,8 [1,3-1,8]	0,051
CGRP-CE	47,1 [24,2-62,1]	36,8 [26,8-49,7]	67,0 [45,7-76,7]	67,5 [47,9-106,4]	0,006*
CGRP-CI	5,6 [1,6-10,2]	3,0 [1,7-5,7]	6,6 [4,1-10,7]	10,1 [5,1-17,4]	0,010*

n = quantidade de animais; SF0,9% = soro fisiológico a 0,9%; TXB-A = toxina botulínica tipo A; Dados da expressão de SP na camada externa (SP-CE) com distribuição normal, descritas como média ± desvio padrão; utilizado teste ANOVA na análise estatística; Dados da expressão de SP na camada interna (SP-CI), CGRP na camada externa (CGRP-CE) e interna (CGRP-CI) com distribuição não normal, descritas como mediana e quartis [25%-75%] utilizado teste de Kruskal Wallis na análise estatística; Dados expressos em: (densidade média de coloração x μm^2)/ μm^2 ; *diferença estatisticamente significativa.

A expressão de CGRP na camada externa (CGRP-CE) e na camada interna (CGRP-CI) apresentou aumento significativo nas CNMs do grupo tratamento que recebeu TXB-A ao comparar com as CNMs do grupo controle que não sofreu intervenção ($p=0,008$) (Figura 7 e Gráficos 3 e 4).

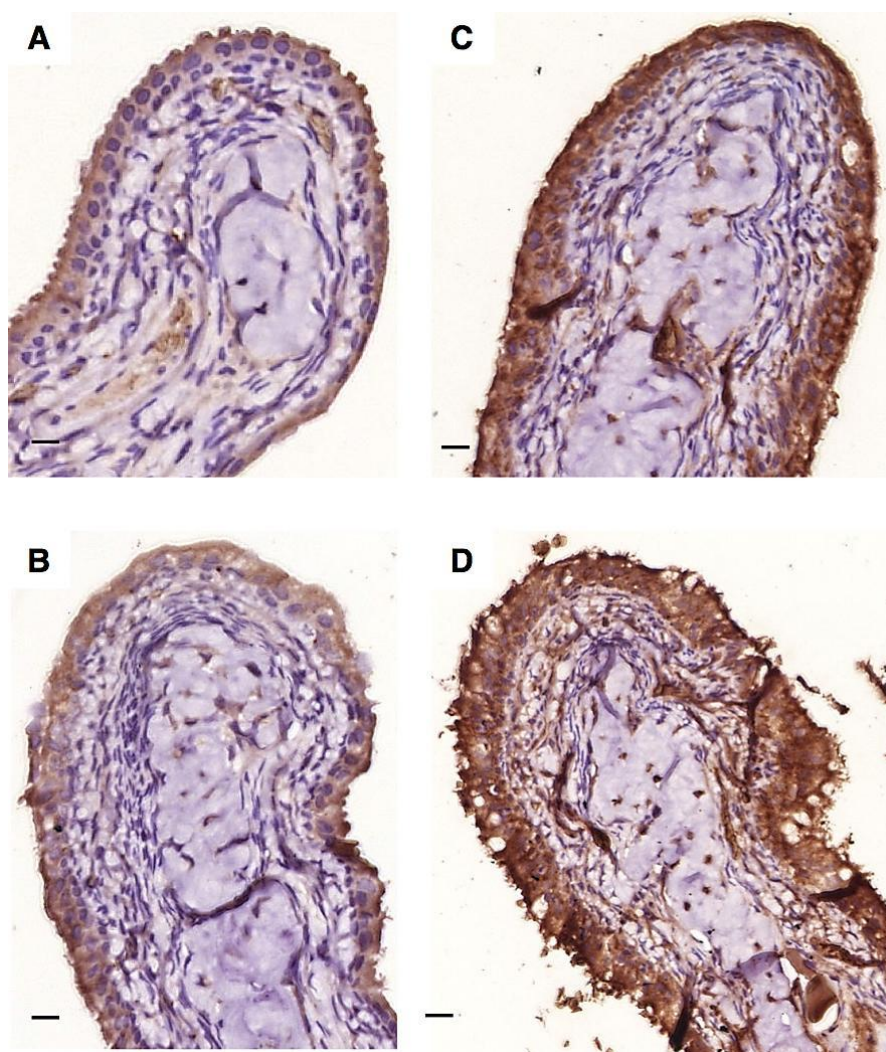


Figura 7: Imuno-histoquímica para análise da expressão de CGRP em concha nasomaxilar (CNM). Barra da escala 10 μ m. (A) CNM sem intervenção do grupo controle; (B) CNM SF0,9% grupo controle; (C) CNM SF0,9% grupo tratamento; (D) CNM TXB-A grupo tratamento.

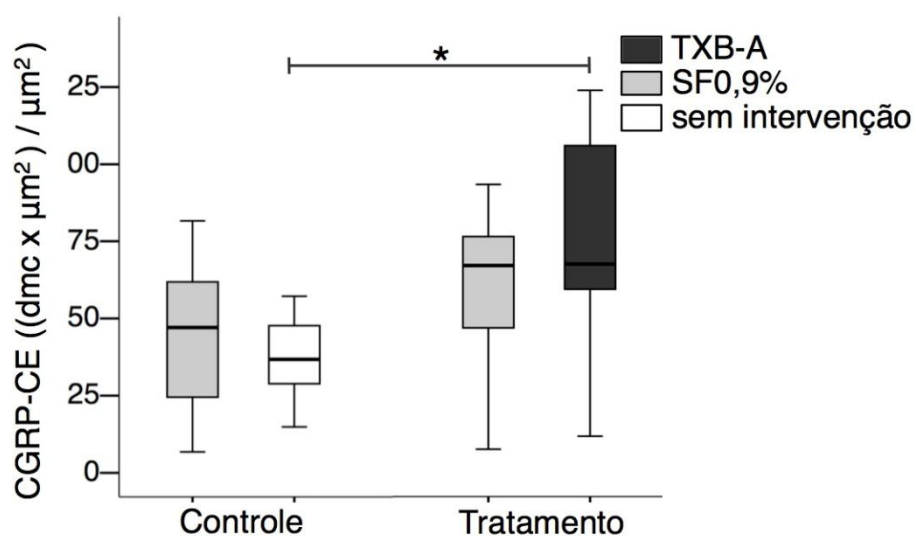


Gráfico 3: Expressão de CGRP na camada externa (CGRP-CE). As caixas representam o intervalo interquartil [25%-75%] e a linha horizontal dentro delas o valor da mediana. Dados expressos em (densidade média de coloração (dmc) x μm^2)/ μm^2 ; * $p=0,008$.

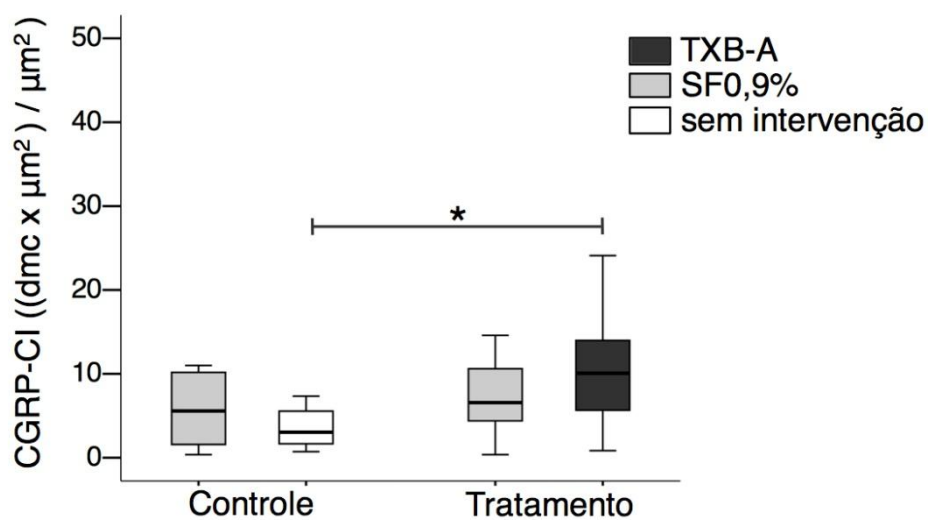


Gráfico 4: Expressão de CGRP na camada interna (CGRP-CI). As caixas representam o intervalo interquartil [25%-75%] e a linha horizontal dentro delas o valor da mediana. Dados expressos em (densidade média de coloração (dmc) x μm^2)/ μm^2 ; * $p=0,008$.

A expressão de SP na camada externa (SP-CE) apresentou aumento significativo nas CNMs do grupo tratamento que recebeu SF0,9% ao comparar com as CNMs do grupo controle que recebeu SF0,9% ($p=0,021$) e que não sofreu intervenção ($p=0,040$) (Figura 8 e Gráfico 5). A expressão de SP na camada interna (SP-CI) não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,051$) (Gráfico 6).

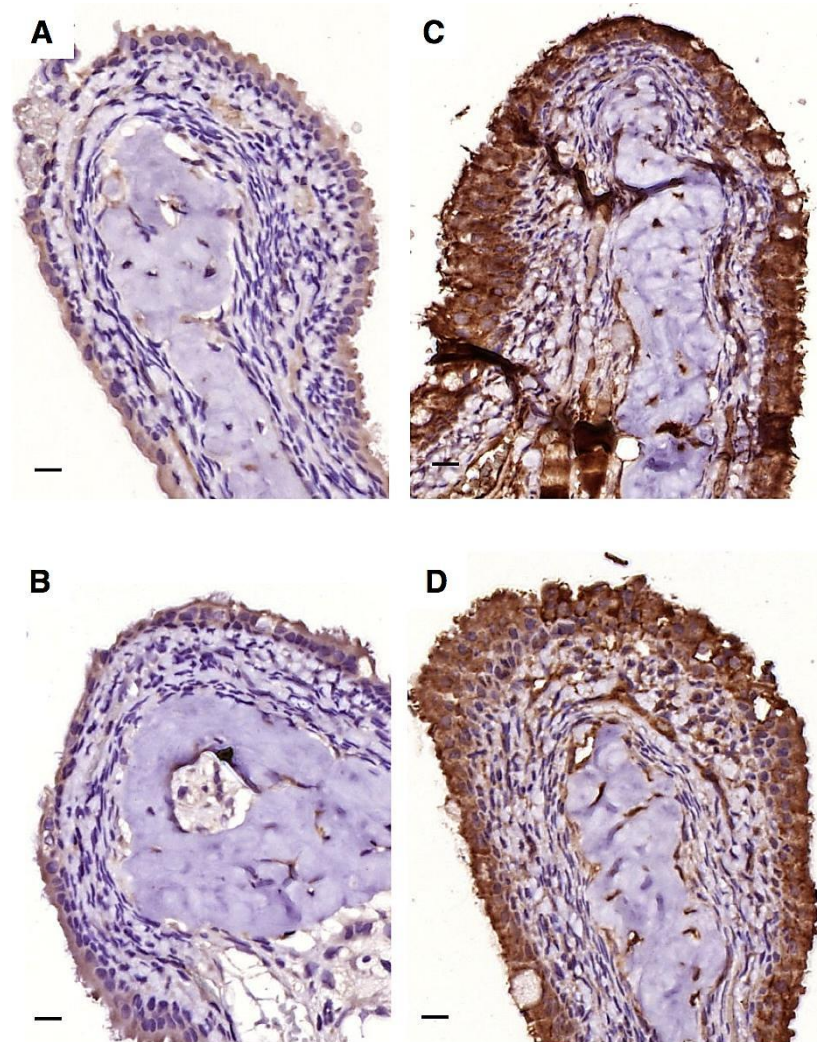


Figura 8: Imuno-histoquímica para análise da expressão de SP em concha nasomaxilar (CNM). Barra da escala 10µm. (A) CNM sem intervenção do grupo controle; (B) CNM SF0,9% grupo controle; (C) CNM SF0,9% grupo tratamento; (D) CNM TXB-A grupo tratamento.

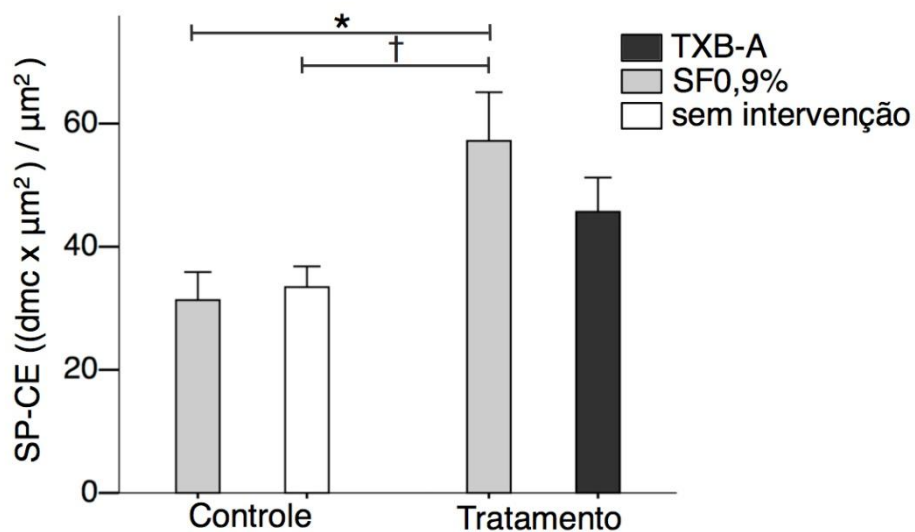


Gráfico 5: Expressão de SP na camada externa (SP-CE). Topo da caixa representa a média e hastes horizontais os valores do erro padrão médio. Dados expressos em (densidade média de coloração (dmc) x μm^2)/ μm^2 * $p=0,021$; † $p=0,040$.

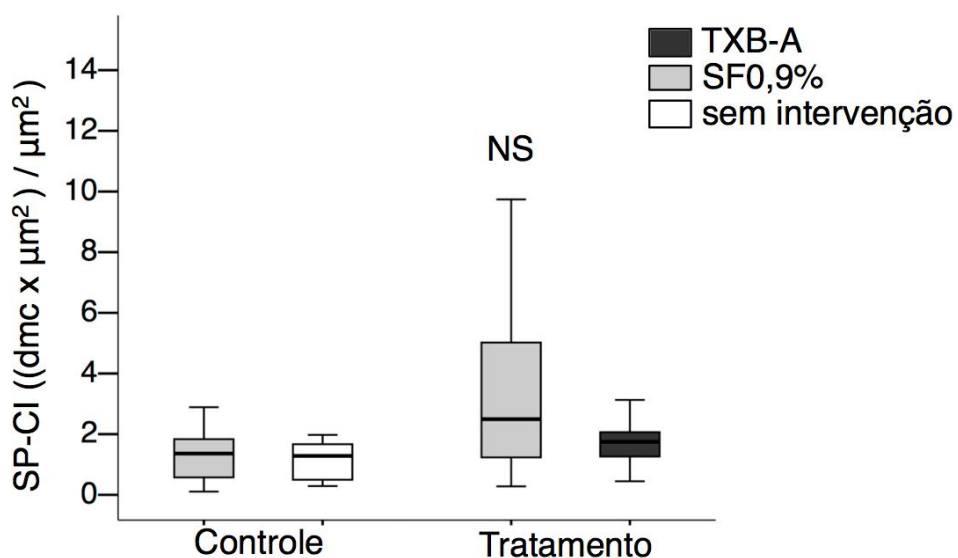


Gráfico 6: Expressão de SP na camada interna (SP-CI). As caixas representam o intervalo interquartil [25%-75%] e a linha horizontal dentro delas o valor da mediana. Dados expressos em (densidade média de coloração (dmc) x μm^2)/ μm^2 ; NS=diferença não significativa entre os grupos ($p=0,051$).

A expressão de nNOS na camada externa (nNOS-CE) e na camada interna (nNOS-CI) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Tabela 3 e Figura 9).

Tabela 3 – Dados sobre imuno-histoquímica para avaliação da expressão de nNOS.

	Controle (n=14)		Tratamento (n=19)		p
	SF0,9%	Sem intervenção	SF0,9%	TXB-A	
nNOS-CE	30,1 [17,4-41,1]	26,2 [17,1-35,3]	25,4 [19,4-36,4]	24,0 [16,7-41,0]	0,888
nNOS-CI	2,0 [1,7-2,8]	1,5 [0,8-2,7]	1,6 [0,7-2,8]	1,3 [0,5-2,5]	0,537

n = quantidade de animais; SF0,9% = soro fisiológico a 0,9%; TXB-A = toxina botulínica tipo A; nNOS-CE = expressão da enzima óxido nítrico sintase neural na camada externa; nNOS-CI = expressão da enzima óxido nítrico sintase neural na camada interna
Dados da nNOS-CE e nNOS-CI com distribuição não normal, descritas como mediana e quartis [25%-75%];

Utilizado teste de Kruskal Wallis na análise estatística.

Dados expressos em (densidade média de coloração x μm^2)/ μm^2 .

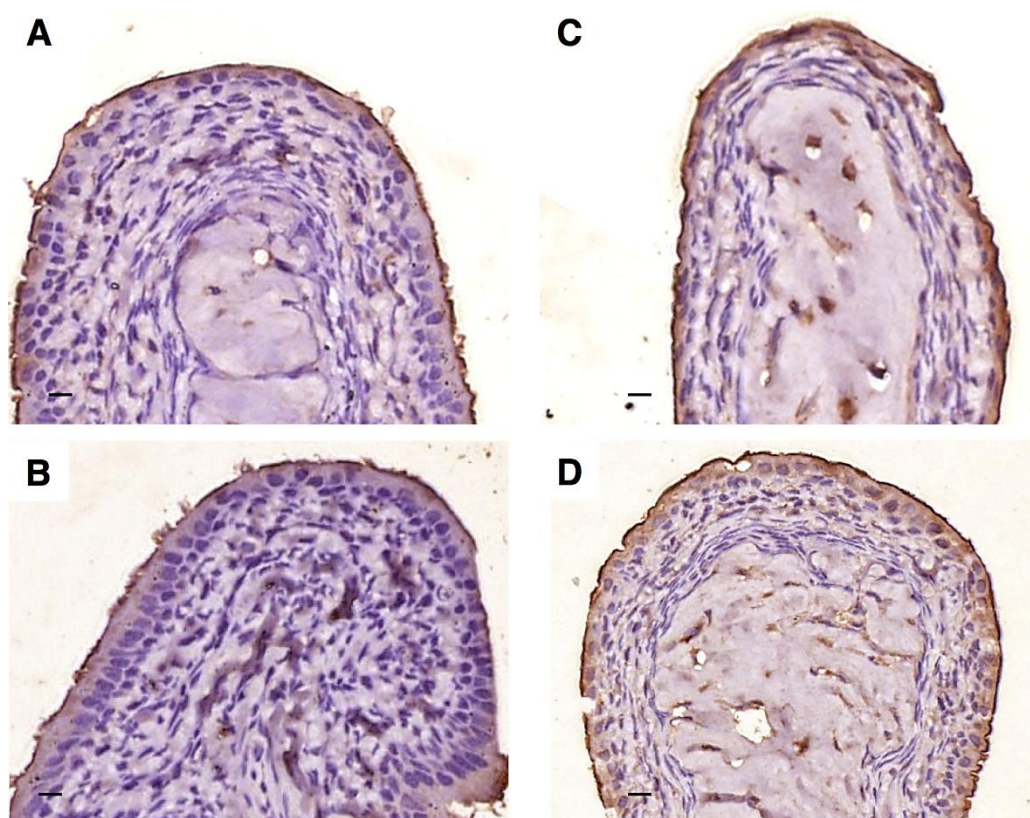


Figura 9: Imuno-histoquímica para análise da expressão de nNOS em concha nasomaxilar (CNM). Barra da escala 10 μ m. (A) CNM sem intervenção do grupo controle; (B) CNM SF0,9% grupo controle; (C) CNM SF0,9% grupo tratamento; (D) CNM TXB-A grupo tratamento.

5.3 Transporte mucociliar

A Tabela 4 apresenta os dados relacionados à análise de variáveis relacionadas ao transporte mucociliar por grupo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

A Figura 10 mostra cortes de tecido de CNMs coradas com PAS e AB.

Tabela 4 – Dados sobre transporte mucociliar.

	Controle (n=14)		Tratamento (n=19)		p
	SF0,9%	Sem intervenção	SF0,9%	TXB-A	
FBC	12,7 ± 0,6	12,8 ± 0,8	13,5 ± 1,1	12,9 ± 1,7	0,126
ESP-CE	16,1 [12,7-18,5]	13,3 [12,3-15,5]	13,9 [12,6-15,8]	13,4 [11,7-16,6]	0,392
AB+	10,5 x10 ⁻² [1,3-31,2]	3,6 x10 ⁻² [2,3-8,6]	14,0 x10 ⁻² [2,9-37,5]	7,6 x10 ⁻² [2,9-39,5]	0,281
PAS+	31,4 x10 ⁻² [18,3-57,6]	32,4 x10 ⁻² [14,3-56,8]	52,9 x10 ⁻² [26,1-103,9]	53,7 x10 ⁻² [27,0-113,2]	0,192
PAS+/AB+	46,2 x10 ⁻² [19,5-87,6]	41,3 x10 ⁻² [15,9-61,7]	74,8 x10 ⁻² [33,2-116,8]	63,2 x10 ⁻² [38,9-144,6]	0,215

n = quantidade de animais; SF0,9% = soro fisiológico a 0,9%; TXB-A = toxina botulínica tipo A; FBC = frequência de batimento ciliar; ESP-CE = espessura média da camada externa; AB+ = glicoproteínas ácidas; PAS+ = glicoproteínas neutras

Dados da análise da FBC expressos em hertz (Hz) apresentaram distribuição normal, sendo descritas como média ± desvio padrão; utilizado teste ANOVA na análise estatística.

Demais variáveis com distribuição não normal, descritas como mediana e quartis [25%-75%]; utilizado teste de Kruskal Wallis na análise estatística.

AB+, PAS+ e a soma das duas (PAS+/AB+) expressos em área positiva corada (µm²) pelo comprimento da membrana basal (µm);

Espessura da camada externa (ESP-CE) corresponde à distância média entre a membrana basal e a superfície do epitélio (µm).

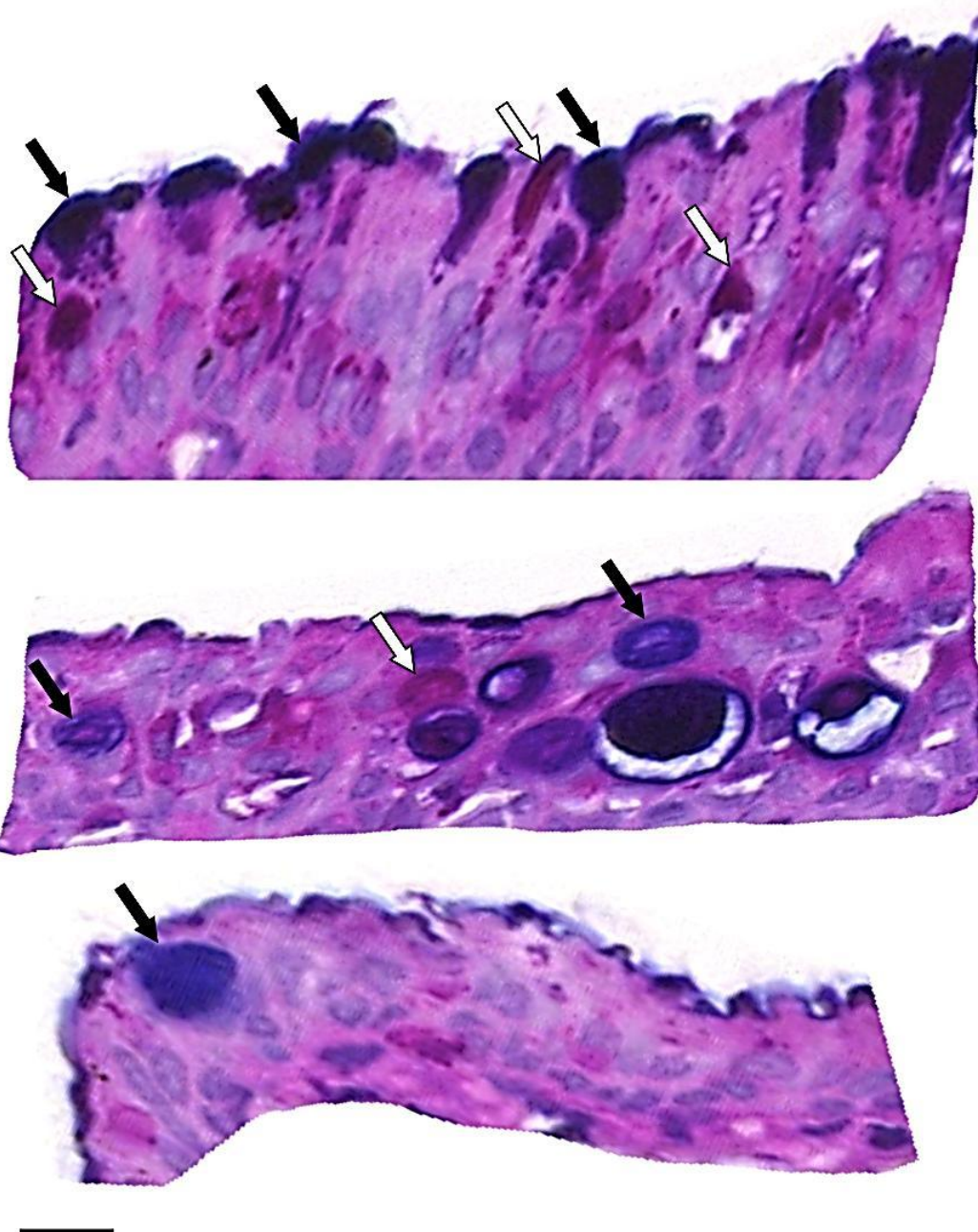


Figura 10: Cortes de tecido de conchas nasomaxilares coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) e azul alciano (AB). Barra de escala 10 μ m. Setas brancas indicam glicoproteínas neutras (PAS+, vermelho). Setas pretas indicam glicoproteínas ácidas (AB+, azul).

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os resultados da presente pesquisa mostram que a TXB-A foi capaz de aumentar a expressão do CGRP e SP na CNM de coelhos, sem interferir na FBC, no perfil histoquímico do muco nasal e na espessura do epitélio nasal.

Vários estudos demonstram que a TXB-A, além de inibir a liberação vesicular de ACh, também é capaz de inibir a exocitose de CGRP^{26,43, 119} e SP^{5,16} em diferentes órgãos e sistemas. Chuang et al. (2004)¹¹⁹ ao utilizar ácido acético em bexiga de ratos para induzir dor e um estado de hiper-reatividade vesical, demonstraram que a TXB-A foi capaz de reduzir a resposta dolorosa e também apresentar sinais que sugeriram um efeito anti-inflamatório. Nesse estudo, a imuno-histoquímica mostrou aumento da expressão do CGRP no tecido da bexiga tratada com TXB-A em comparação com os controles. Os autores sugerem que este achado poderia ser explicado pela inibição da exocitose de CGRP pela TXB-A, que resultaria em seu acúmulo intracelular.

Em 2009, Chuang et al.¹²⁰, utilizaram metodologia semelhante, e, da mesma forma, demonstraram um aumento significativo da expressão do CGRP em bexiga de ratos tratados com um preparado de TXB-A associado a lipossomos, quando compararam com os controles, e, ainda, a redução da hiper-reatividade vesical e a reação inflamatória causada pelo ácido

acético¹²⁰. De forma similar, Lande et al. (1989)¹²¹, aplicaram TXB-A em tecido muscular de roedores, e observaram o acúmulo de CGRP na região pré-sináptica em neurônios eferentes por meio da imunofluorescência, causado pela inibição da exocitose de CGRP¹²¹. Outros estudos realizados em tecidos nervosos eferentes paralisados com TXB-A também demonstraram um acúmulo de CGRP pré-sináptico, sugerindo igualmente como causa o acúmulo por inibição de sua liberação¹²². Por outro lado, em neurônios motores nos quais a TXB-A foi aplicada, sugere-se que esse aumento também possa ser causado pela elevação da síntese de CGRP, em razão de este, aparentemente, apresentar propriedade de estimular, na junção neuromuscular, a síntese de receptores pós-sinápticos de acetilcolina¹²². Além disso, CGRP também parece estar relacionado com o aumento da produção de fatores de crescimento muscular, e esses processos estariam diretamente relacionados com o mecanismo de recuperação da inervação eferente e atividade muscular após a paralisia causada pela TXB-A¹²³.

No presente estudo poder-se-ia argumentar que o aumento da expressão de CGRP e SP encontrado esteja relacionado com a inflamação provocada pela TXB-A. No entanto, observou-se o aumento da expressão destes neuropeptídeos sem alterações fisiológicas associadas, como: o perfil histoquímico de muco, a FBC e a espessura do epitélio respiratório. Outros estudos também mostraram que a TXB-A não estimula a inflamação na mucosa nasal normal⁹¹. Os resultados aqui obtidos indicam que o CGRP e a SP provavelmente não foram liberados pelo efeito de bloqueio da exocitose

da TXB-A, e, então, foram acumulados nas vesículas pré-sinápticas, o que explica o aumento em sua expressão. Outra hipótese que poderia explicar o aumento na expressão de CGRP e SP seria a possibilidade do manuseio das fossas nasais pela colocação da esponja expansível ser a causadora de um processo inflamatório local. Porém, a fossa nasal do grupo controle, que também foi manipulada com a esponja expansível e recebeu SF0,9%, não apresentou aumento significativo da expressão de CGRP, SP e nem alteração das demais variáveis.

A ativação das FSNMT-C na mucosa nasal desencadeia uma resposta eferente na forma de um arco reflexo, e estimula a liberação de CGRP e SP, e causa sintomas como espirros, rinorréia e dor¹². Este fenômeno é conhecido como inflamação neurogênica¹²⁴, e tem como seus mediadores principais o CGRP e SP¹²⁵. Chien et al. (2012)¹¹ demonstraram o potencial da TXB-A de inibir a inflamação neurogênica induzida por capsaicina no pulmão de ratos, indicando sua ação supressora do sistema NANC. O estudo sugere que o mecanismo por trás desses efeitos seja o bloqueio na liberação de SP e também de outros mediadores da inflamação neurogênica por clivagem do SNAP-25 causado pela TXB-A¹¹. A hipótese é que o mecanismo por meio do qual a TXB-A reduza os sintomas da RI possa ser causado não somente pelo seu potencial de bloqueio colinérgico, mas também por sua influência na expressão desses neuropeptídeos, relacionados ao processo de inflamação neurogênica como a SP e o CGRP.

Os resultados obtidos na presente pesquisa mostram um aumento na quantidade de células apoptóticas nas CNMs do grupo tratamento. Este achado confirma a ação da TXB-A sobre a mucosa nasal. De forma similar, Rohrbach et al.⁹¹ demonstraram, também por meio da técnica de identificação de células apoptóticas TUNEL, que cortes de CNMs de *guinea pig* tratadas com TXB-A com esponjas expansíveis apresentaram sinais significativamente maiores de apoptose celular quando comparados ao grupo controle⁹¹. No presente estudo, também se mostrou que na fossa nasal do grupo controle, que recebeu SF0,9% por intermédio das mesmas esponjas expansíveis utilizadas no grupo tratamento, não se detectou um aumento significativo da quantidade de células apoptóticas, o que descarta a possibilidade do contato da fossa nasal com a esponja ser um fator de estímulo para o aparecimento de apoptose celular neste estudo. Por outro lado, os resultados mostram que além das CNMs do grupo tratamento que receberam TXB-A de forma direta terem apresentado aumento significativo na quantidade de células apoptóticas, aquelas do grupo tratamento, que receberam SF0,9%, também exibiram aumento significativo na quantidade dessas células apoptóticas quando comparado com o grupo controle. A expressão de SP também apresentou resultados semelhantes. Apesar de não poder ser descartada a hipótese da TXB-A ter passado através do septo nasal, por difusão, para a fossa nasal contralateral, suspeita-se da possibilidade deste achado ter sido causado por um possível efeito central da TXB-A. Há indícios de que a TXB-A seja capaz de produzir efeito antinociceptivo não apenas por meio de sua ação direta em terminações

nervosas sensitivas periféricas, mas também de forma indireta provocando mudanças na plasticidade no SNC¹²⁶⁻¹²⁹. Porém, alguns autores referem, ainda, que a TXB-A apresenta ação direta sobre o SNC^{104,126} mesmo quando aplicada periféricamente. Bach-Rojecky et al.¹²⁶ demonstraram efeito antinociceptivo bilateral após injeção unilateral de TXB-A em patas traseiras de ratos nas quais a dor foi estimulada mediante administração intramuscular de solução salina ácida (pH 4,0±0,1). Ao utilizar a colchicina (um inibidor de transporte axonal) e a transecção do nervo ciático, os autores detectaram sinais de que o transporte axonal é fundamental para a ação antinociceptiva da TXB-A. Os achados de Bach-Rojecky et al.¹²⁶ sugerem que os efeitos antinociceptivos contralaterais à aplicação da TXB-A são causados pela ação central direta da TXB-A, por meio de seu transporte axonal anterógrado (em direção à sinapse) a partir da terminação nervosa periférica até o SNC¹²⁶.

Luisetto et al. (2006)¹³⁰ foram os primeiros a demonstrar o efeito antinociceptivo periférico após injeção de TXB-A no SNC (ventrículo lateral) de camundongos. Antonucci et al. (2008)¹⁰⁴ injetaram TXB-A no hipocampo de camundongos e detectaram SNAP-25 clivado no hipocampo contralateral. Além disso, injetaram TXB-A no colículo superior de ratos e detectaram SNAP-25 clivado na retina, e este efeito foi bloqueado pela colchicina. Estes achados indicam a capacidade da TXB-A de ser transportada de forma retrógrada (em direção ao corpo celular) através dos axônios neurais e também de poderem ser submetidas à transcitose (transporte através do corpo celular do neurônio, de um lado ao outro, envolvendo processo de

endocitose e exocitose). Estes achados reforçam a ideia de que a TXB-A possui a capacidade de agir no SNC após ser aplicada periféricamente. Ao utilizar a via da visão como modelo experimental, Restani et al. (2011)¹³¹ mostraram que a TXB-A é capaz de ser transportada de forma anterógrada através dos axônios neurais e também sofrer transcitose. Após a injeção de TXB-A no olho de ratos, níveis significativamente elevados de SNAP-25 clivado foram detectados no colículo superior (transporte anterógrado) e em células do *tectum* (transcitose)¹³¹. Todas essas evidências demonstram novas vias de propagação da TXB-A, dando mais suporte à hipótese do efeito central da TXB-A no presente estudo.

Seguindo a ideia de um possível efeito central da TXB-A aplicada periféricamente e de sua eficácia no tratamento da RI, existem evidências de que uma disfunção central possa estar envolvida na fisiopatologia da RI. Sugere-se que as FSNMT-C e seu reflexo axonal possam apresentar alterações associadas a um estado de hiper-responsividade trigeminal em um subtipo de pacientes com RI⁷. Destarte, um estado de ativação aferente prolongado causaria o aumento na regulação de TRPV1, de modo que esses neurônios sejam mais facilmente despolarizados em resposta a estímulos nocivos e causem uma “sensibilização periférica”. Essa sensibilização periférica torna mais fácil a condução de estímulos dolorosos através das FSNMT-C até os centros corticais. Essa hiperestimulação central a partir de um foco periférico acaba causando um processo de “sensibilização central”, por meio de um estado de hiperexcitabilidade da medula espinhal. Dessa forma, um estímulo mecânico mínimo ou o frio

podem ser percebidos como dor (alodínia)⁶. Estudos sugerem uma prevalência maior de RI em indivíduos com síndrome do cansaço crônico associado e hiperalgesia sistêmica^{132,133}. Nesse mecanismo, um estímulo periférico mínimo pode causar dor ou desconforto, e a generalização desse processo pode significar o aparecimento da dor crônica da fibromialgia e da síndrome do cansaço crônico⁶.

Virtualmente todos os neurônios que contenham CGRP também possuem SP¹³⁴. Porém, esses dois neuropeptídeos nem sempre são encontrados nos mesmos tipos de vesículas. O CGRP é caracteristicamente encontrado apenas em VGDs, enquanto a SP pode, também, ser encontrada em VPs¹³⁵. Apesar de muitas etapas do processo de exocitose serem comuns às VGDs e VPs, aquelas influenciadas pela sensibilidade ao cálcio (Ca^{2+}) são diferentes¹³⁶. A liberação de ACh de VPs é altamente dependente do complexo SNARE, mas a liberação de neuropeptídeos de VGDs envolve proteínas do complexo SNARE que podem interagir de forma diferente com fatores reguladores como o Ca^{2+} ²⁶. Purkiss et al. (2000)²³ demonstraram que a capsaicina induz a liberação de SP de neurônios ganglionares da raiz dorsal da medula mediante dois mecanismos: um que requer Ca^{2+} extracelular e SNAP-25 intacto; e, outro independente do Ca^{2+} extracelular e que não envolve SNAP-25. De forma similar, Meng et al. (2007)¹³⁴ observaram que a elevação da concentração de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pode reverter de forma parcial os efeitos de bloqueio da TXB-A na liberação de CGRP estimulado pela capsaicina^{134,137,138}.

Essas observações podem explicar algumas diferenças encontradas nos resultados do presente estudo entre a SP e o CGRP. O CGRP apresentou um aumento significativo em sua expressão nas CNMs do grupo tratamento que receberam TXB-A de forma direta, como era esperado. Por outro lado, a SP apresentou aumento em sua expressão nas CNMs do grupo tratamento que recebeu apenas SF0,9%. Se for considerada a hipótese da TXB-A aplicada em uma das fossas nasais ter sido capaz de atravessar o septo nasal e atingir a CNM da fossa nasal contralateral, esperar-se-ia um aumento da expressão de SP em ambos os lados e até mais expressivo na CNM que recebeu a TXB-A de forma direta, considerando o efeito periférico da TXB-A. Porém, se for assumida a hipótese de um possível efeito central da TXB-A, o fato de que a SP pode ser encontrada em VPs da medula espinhal, e também por causa da tendência da TXB-A ser mais efetiva no bloqueio de VPs em comparação às VGDs, surge outra hipótese: a de que esse efeito central da TXB-A poder ser mais evidente sobre a SP do que o CGRP. Dessa forma, haveria maior tendência de retenção e acúmulo intracelular de SP nas CNMs do grupo tratamento que recebeu apenas SF0,9% ao comparar com o CGRP. Porém, o mecanismo de excitação das VPs não é uniforme, podendo variar dependendo de seu conteúdo¹³⁶. Dessa forma, sua sensibilidade à TXB-A também pode ser variável. Estudos futuros são necessários para elucidar esse achado.

Outra característica da neuroanatomia nasal que poderia explicar algumas diferenças encontradas na expressão de SP e CGRP no presente estudo é o fato de os neurônios do gânglio trigeminal, que contêm SP se

projetarem, principalmente, para o epitélio nasal⁵¹ (acima da membrana basal), enquanto os neurônios trigeminais que contêm CGRP sejam mais comuns na lâmina própria (abaixo da membrana basal)⁵². Isto explicaria o fato de a TXB-A ter afetado a expressão de SP de forma significativa apenas na CE (acima da membrana basal).

Um achado interessante aqui encontrado foi a expressão de SP não apresentar aumento significativo no tecido das CNMs do grupo tratamento que recebeu TXB-A diretamente. Uma possível explicação é a inibição da exocitose de CGRP na fossa nasal do grupo tratamento que recebeu TXB-A diretamente ter reduzido a quantidade disponível de CGRP e, dessa forma, ter estimulado de modo indireto o catabolismo local de SP por intermédio da endopeptidase neutra, uma enzima de superfície celular responsável pela clivagem e inativação da SP⁵⁸. O CGRP também é clivado pela endopeptidase neutra e possui a propriedade de reduzir a atividade desta enzima sobre a SP⁵⁸. Estudos sugerem que a atividade da endopeptidase neutra possa também induzir uma redução da síntese de SP em fibroblastos da pele¹³⁹. A hipótese é de que a redução da liberação de CGRP tenha provocado um aumento da atividade enzimática da endopeptidase neutra sobre a SP na CNM do grupo tratamento que recebeu TXB-A, e que isto possa ter induzido uma redução do estímulo local para produção de SP, reduzindo, dessa forma, a quantidade de SP acumulada e, conseqüentemente, a sua expressão. No entanto, novos estudos são necessários para esclarecer este fato.

No presente estudo não foram observadas diferenças significativas na FBC entre os grupos. Ma et al.¹⁰⁶, no entanto, referem que o mecanismo de batimento ciliar pode funcionar de dois modos: um estado basal de batimento que requer apenas ATP e um estado estimulado com taxas maiores de batimento que é implementado em resposta aos mais variados estímulos e envolve, também, a participação de mensageiros secundários. Esses mensageiros secundários são liberados por células em resposta a estimulantes extracelulares como a ACh e a SP. Aiello E et al.¹⁰⁷ demonstraram que a Ach age diretamente e a SP direta e indiretamente, estimulando a liberação de Ach, causando um aumento da FBC¹⁰⁷. Zagoory et al.¹⁴⁰, por sua vez, demonstraram que o processo de estimulação da FBC pela ACh é altamente dependente dos mensageiros secundários Ca^{2+} , guanosina monofosfato cíclico (GMPc) e adenosina monofosfato cíclico (AMPc)¹⁴⁰. Contudo, a avaliação da FBC no presente estudo foi realizada sem a utilização de estimulantes e os resultados coletados são dessa forma referentes ao estado basal da FBC, que aparentemente não parece ser significativamente influenciado pelos efeitos de bloqueio na exocitose de ACh e neuropeptídeos causado pela TXB-A. São necessários estudos futuros para esclarecer o possível efeito da TXB-A sobre o estado estimulado da FBC.

Os resultados aqui obtidos não mostraram efeito da TXB-A sobre a expressão de nNOS. Rohrbach et al.¹⁰⁵ também não encontraram diferença na expressão de nNOS na CNM de *guinea pig* tratados com TXB-A, em comparação aos controles tratados com SF0,9%. Olgart et al.¹⁴¹

apresentaram algumas evidências de que a liberação neuronal de NO não seja realizada por intermédio de vesículas¹⁴¹. Estes achados sugerem que a liberação de NO de neurônios autonômicos ocorre de forma independente ao mecanismo vesicular de exocitose mediado pelo complexo SNARE. Portanto, o NO parece ser sintetizado de acordo com sua demanda, principalmente de NOS não vesicular do que liberado de fontes presentes em vesículas sinápticas²⁶. Estas características podem explicar a falta de efeito da TXB-A sobre a expressão de nNOS no presente estudo.

Uma das limitações deste estudo é que o modelo experimental não utilizou animais com rinite induzida e sim coelhos saudáveis. Sendo assim, os dados referem-se ao estado basal e não evocado das diferentes variáveis. Como citado anteriormente, isto pode ter influenciado na medida da FBC. Além disso, pode também ter influenciado na análise do perfil histoquímico do muco nasal e da espessura do epitélio. Mais pesquisas para avaliar o efeito da TXB-A sobre as condições patológicas poderão determinar se a TXB-A tem efeito, por exemplo, na redução da quantidade de muco ácido, além de diminuir o espessamento do epitélio, presentes em condições patológicas da mucosa nasal. Identificou-se, também, o aumento da expressão de SP e CGRP no grupo tratamento, provavelmente causado por inibição da exocitose desses neuropeptídeos e sua retenção nas terminações nervosas, como citado em outros estudos¹¹⁹⁻¹²¹. Porém, isto não foi diretamente provado no presente estudo. Não se pode excluir outros mecanismos possíveis como o aumento da produção ou redução da degradação desses neuropeptídeos.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou a capacidade da TXB-A afetar a expressão de SP e CGRP nas CNMs de coelhos saudáveis. Foi identificado um aumento na expressão de SP e CGRP, possivelmente causado pela inibição da exocitose desses neuropeptídeos causada pela TXB-A, que provocou seu acúmulo no interior das terminações nervosas.

A FBC e o perfil histoquímico do muco nasal, importantes elementos do transporte mucociliar, não foram alterados pela exposição à TXB-A.

A expressão de nNOS e a espessura do epitélio também não foram alterados pela exposição à TXB-A.

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS¹

1. Solé D, Sakano E. III Consenso Brasileiro sobre rinites. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2012;75(6):1-52.
2. Solé D, Mallol J, Camelo-Nunes IC, Wandalsen GF, Latin American ISAAC Study Group. Prevalence of rhinitis-related symptoms in Latin American children – Results of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) phase three. *Pediatr Allergy Immunol.* 2010;21:127-36.
3. Burns P, Powe DG, Jones NS. Idiopathic rhinitis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2012;20:1-8.
4. Lund VJ, Aaronson D, Bousquet J, Dahl R, Davies RJ, Durham SR, et al. International Consensus Report on the diagnosis and management of rhinitis. International Rhinitis Management Working Group. *Allergy.* 1994;49(19 Suppl):1-34.
5. Carney AS, Jones NS. Idiopathic rhinitis: idiopathic or not? *Clin Otolaryngol.* 1996;21:198-202.
6. Baraniuk JN. Pathogenic mechanisms of idiopathic nonallergic rhinitis. *World Allergy Organ J.* 2009;2(6):106-14.
7. Baraniuk JN, Merck SJ. Neuroregulation of human nasal mucosa. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1170:604-9.
8. Tai C-F, Baraniuk JN. Upper airway neurogenic mechanisms. *Allergy Clin Immunol.* 2002;2(1):11-9.

¹ Esta tese está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

9. Silberstein SD. Neurotoxins in the neurobiology of pain. *Headache*. 2003;43(Suppl1):S2-8.
10. Baraniuk JN, Kaliner M. Neuropeptides and nasal secretion. *Am J Physiol*. 1991;261(4 Pt 1):L223-35.
11. Chien C-T, Lee H-M, Wu C-CJ, Li P-C. Inhibitory effect of botulinum toxin type A on the NANC system in rat respiratory models of neurogenic inflammation. *Arch Biochem Biophys*. 2012;524(2):106-13.
12. Heppt W, Peiser C, Cryer A, Dinh QT, Zweng M, Witt C, et al. Innervation of human nasal mucosa in environmentally triggered hyperreflexic rhinitis. *J Occup Environ Med*. 2002;44:924-9.
13. Figueroa JM, Mansilla E, Suburo AM. Innervation of nasal turbinate blood vessels in rhinitic and nonrhinitic children. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:1959-66.
14. Lundblad L, Hua XY, Lundberg JM. Mechanisms for reflexive hypertension induced by local application of capsaicin and nicotine to the nasal mucosa. *Acta Physiol Scand*. 1984;121(3):277-82.
15. Blom HM, Rijswijk JBV, Garrelds IM, Mulder PG, Timmermans T, Wijk RGv. Intranasal capsaicin is efficacious in non-allergic, non-infectious perennial rhinitis. A placebo-controlled study. *Clin Exp Allergy*. 1997;27:796-801.
16. Rohrbach S, Junghans K, Köhler S, Laskawi R. Minimally invasive application of botulinum toxin type A in nasal hypersecretion. *Head Face Med*. 2009;5(18):1-7.
17. Kim K-S, Kim S-S, Yoon J-H, Han JW. The effect of botulinum toxin type A injection for intrinsic rhinitis. *J Laryngol Otol*. 1998;112(3):248-51.
18. Özcan C, Vayisoglu Y, Dogu O, Görür K. The effects of intranasal injection of botulinum toxin A on the symptoms of vasomotor rhinitis. *Am J Otolaryngol*. 2006;27(5):314-8.

19. Wang J, Chen F, Meng M, Zhang X, Chen Y, Huang W, et al. The influence of botulinum toxin type A on vasomotor rhinitis and morphological study. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*. 2003;17(11):643-5.
20. Sapci T, Yazici S, Evcimik MF, Bozkurt Z, Karavus A, Ugurlu B, et al. Investigation of the effects of intranasal botulinum toxin type a and ipratropium bromide nasal spray on nasal hypersecretion in idiopathic rhinitis without eosinophilia. *Rhinology*. 2008;46(1):45-51.
21. Blasi J, Chapman ER, Link E, Binz T, Yamasaki S, Camilli PD, et al. Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature*. 1993;365(6442):160-3.
22. Jahn R, Scheller RH. SNAREs - engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:631-43.
23. Purkiss J, Welch M, Doward S, Foster K. Capsaicin-stimulated release of substance P from cultured dorsal root ganglion neurons: Involvement of two distinct mechanisms. *Biochem Pharmacol*. 2000;59:1403-6.
24. Welch MJ, Purkiss JR, Foster KA. Sensitivity of embryonic rat dorsal root ganglia neurons to *Clostridium botulinum* neurotoxins. *Toxicon*. 2000;38(2):245-58.
25. Ishikawa H, Mitsui Y, Yoshitomi T, Mashimo K, Aoki S, Mukuno K, et al. Presynaptic effects of botulinum toxin type A on the neuronally evoked response of albino and pigmented rabbit iris sphincter and dilator muscles. *Jpn J Ophthalmol*. 2000;44:106-9.
26. Morris JL, Jobling P, Gibbins IL. Differential inhibition by botulinum neurotoxin A of cotransmitters released from autonomic vasodilator neurons. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281:2124-32.
27. Barnes PJ, Baraniuk JN, Belvisi MG. Neuropeptides in the Respiratory Tract. *Am Rev Respir Dis*. 1991;144:1391-9.
28. Favre-Guilmard C, Auguet M, Chabrier P-E. Different antinociceptive effects of botulinum toxin type A in inflammatory and peripheral polyneuropathic rat models. *Eur J Pharmacol*. 2009;617:48-53.

29. Aoki KR. Review of a proposed mechanism for the antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Neurotoxicology*. 2005;26(5):785-93.
30. Zagoory O, Braiman A, Gheber L, Priel Z. Role of calcium and calmodulin in ciliary stimulation induced by acetylcholine. *Am J Cell Physiol*. 2001;280:100-9.
31. Lane AP, Prazma J, Gibbons PJ, Rose AS, Pillsbury HC. The role of nitric oxide in the neural control of nasal fluid production. *Am J Rhinol*. 1997;11:303-11.
32. Runer T, Cervin A, Lindberg S, Uddman R. Nitric oxide is a regulator of mucociliary activity in the upper respiratory tract. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998;119(3):278-87.
33. Antunes MB, Cohen NA. Mucociliary clearance - a critical upper airway host defense mechanism and methods of assessment. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007;7(1):5-10.
34. Sleight MA, Blake JR. The propulsion of mucus by cilia. *Am Rev Respir Dis*. 1988;137:726-41.
35. Wen W-D, Yuan F, Wang J-L, Hou Y-P. Botulinum toxin therapy in the ovalbumin-sensitized rat. *Neuroimmunomodulation*. 2007;14:78-83.
36. Wen W-D, Yuan F, Hou Y-P. The mechanism of inhibitory effect on parotid gland secretion with local injection of botulinum toxin type A in the rat. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2009;44(1):38-40.
37. Wang L, Tai NZ, Fan ZH. Effect of botulinum toxin type A on the expression of substance P, calcitonin gene-related peptide, transforming growth factor beta-1 and alpha smooth muscle actin A in wound healing in rats. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*. 2009;25(1):50-3.
38. Hou YP, Zhang YP, Song YF, Zhu CM, Wang YC, Xie GL. Botulinum toxin type A inhibits rat pyloric myoelectrical activity and substance P release in vivo. *Can J Physiol Pharmacol*. 2007;85(2):209-14.
39. Rapp DE, Turk KW, Bales GT, Cook SP. Botulinum toxin type A inhibits calcitonin gene-related peptide release from isolated rat bladder. *J Urol*. 2006;175:255-63.

40. Ellies M, Schütz S, Quondamatteo F, Laskawi R. The effect of local injection of botulinum toxin A on the immunoreactivity of nNOS in the rat submandibular gland: An immunohistochemical study. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2006;70(1):59-63.
41. Ellies M, Schütz S, Quondamatteo F, Laskawi R. Immunohistochemical Investigations of the Influence of botulinum toxin A on the Immunoreactivity of nNOS in the parotid gland of the rat. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006;64(3):397-401.
42. Lucioni A, Bales GT, Lotan TL, McGehee DS, Cook SP, Rapp DE. Botulinum toxin type A inhibits sensory neuropeptide release in rat bladder models of acute injury and chronic inflammation. *BJU Int* 2008;101(3):366-70.
43. Durham PL, 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(1):35-42.
44. Fisher KV, Giddens CL, Gray SD. Does botulinum toxin alter laryngeal secretions and mucociliary transport. *J Voice.* 1998;12(3):389-98.
45. Naclerio RM, Bachert C, Baraniuk JN. Pathophysiology of nasal congestion. *Int J Gen Med.* 2010;3:47-57.
46. Uddman R, Sundler F. Innervation of the upper airways *Clin Chest Med.* 1986;7:201-9.
47. Hua KY. Tachikinins and calcitonin gene related peptide in relation to peripheral functions at capsaicin-sensitive neurons. *Acta Physiol Scand.* 1986;127:1-45.
48. Green R, Fowler J, Macglashan D, Weinreich D. IgE-challenged human lung mast cells excite vagal sensory neurons in vitro. *J Appl Physiol.* 1988;64:2249-53.
49. Calliet R. Head and face pain syndromes. Philadelphia: Davies FA, 1992.
50. Chen Z, Hedner J, Hedner T. Local effects of substance P on respiratory regulation in the rat medulla oblongata. *J Appl Physiol.* 1990;68:693-9.

51. Hunter DD, Dey RD. Identification and neuropeptide content of trigeminal neurons innervating the rat nasal epithelium *Neurosci*. 1998;83(2):591-9.
52. Grunditz T, Uddman R, Sundler F. Origin and peptide content of nerve fibers in the nasal mucosa of rats. *Anat Embryol*. 1994;189:327-37.
53. Beule AG. Physiology and pathophysiology of respiratory mucosa of the nose and the paranasal sinuses. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2010;9:1-24.
54. Steenbergh PH, Hoppener JW, Zandberg J, Visser A, Lips CJ, H SJ. Structure and expression of the human calcitonin/CGRP genes. *FEBS Lett*. 1986;209:97-103.
55. Baraniuk JN, Castellino S, Merida M, Kaliner M. Calcitonin gene related peptide in human nasal mucosa. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1990;258:L81-L8.
56. Lundberg JM, Lundblad L, MArtling CR. Coexistence of multiple peptides and classic transmitters in airway neu- rons: functional and pathophysiologic aspects. *Am Rev Respir Dis*. 1987;136:16-22.
57. Brain SD, Williams TJ. Inflammatory edema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. *Br J Pharmacol*. 1985;86:855-60.
58. Greves PL, Nyberg F, Terenius L, Hokfelt T. Calcitonin gene-related peptide is a potent inhibitor of substance P degradation. *Eur J Pharmacol*. 1985;115:309-11.
59. Baraniuk JN, J.D.Lundgren, Okayama M, Goff J, Mullol J, Merida M, et al. Substance P and neurokinin A in human nasal mucosa. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1991;4(4):228-36.
60. Baraniuk JN, Lundgren JD, Goff J, Mullol J, Castellino S, Merida M, et al. Calcitonin gene-related peptide in human nasal mucosa. *Am J Physiol*. 1990;258:L81-L8.
61. Joos GF, Pauwels RA, Straeten MEVd. The role of neuropeptides as neurotransmitters of non-adrenergic, non-cholinergic nerves in bronchial asthma. *Bull Eur Physiopathol Respir*. 1987;23(6):619-37.

62. Joos GF, Germonpre PR, Kips JC, Pauwels RA. Sensory neuropeptides and the human lower airways: present state and future directions. *Eur Respir J*. 1994;7:1161-71.
63. Barnes PJ. Neuropeptides in Human Airways: Function and Clinical Implications. *Am Rev Respir Dis*. 1987;136:S77-S83.
64. McGillis JP, Mitsuhashi M, Payan DG. Immunomodulation by tachykinin neuropeptides. *Ann NY Acad Sci*. 1990;594:85-94.
65. Kroegel C, Giembycz MA, Barnes PJ. Characterization of eosinophil activation by peptides. Differential effects of substance P, mellitin, and f-Met-leu-Phe. *J Immunol*. 1990;145:2581-7.
66. Lotz M, Vaughan JH, Carson DA. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science*. 1988;241:1218-21.
67. Carolan EJ, Casale TB. Effects of neuropeptides on neutrophil migration through noncellular and endothelial barriers. *J Allergy Clin Immunol*. 1993;92:589-98.
68. Conboy PJ, Jones NS. The nose and nitric oxide: a review. *Clin Otolaryngol*. 2000;25:337-41.
69. Phillips PS, Sacks R, Marcellis GN, Cohen NA, Harvey RJ. Nasal nitric oxide and sinonasal disease: A systematic review of published evidence. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011;144(2):159-69.
70. Oh SJ, Min YG, Kim JW, Lee SJ, Jarin PR. Expression of nitric oxide synthases in nasal mucosa from a mouse model of allergic rhinitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2003;112(10):899-903.
71. Yeates DB. Inhibitory and excitatory neural regulation of the mucociliary transport system. In: Baum GL, Priel Z, Roth Y, Liron N, Ostfeld EJ, editors. *Cilia, mucus, and mucociliary interactions*. New York: Marcel Dekker; 1998. p. 27-38.
72. Uzlaner N, Priel Z. Interplay between the NO pathway and elevated $[Ca^{2+}]_i$ enhances ciliary activity in rabbit trachea. *J Physiol*. 1999;516(1):179-90.

73. Chilvers MA, O'Callaghan C. Local mucociliary defence mechanisms. *Paediatr Respir Rev.* 2000;1:27-34.
74. Wanner A, Salathé M, O'Riordan TG. Mucociliary clearance in the airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154:1868-902.
75. Erbguth FJ. Historical notes on botulism, clostridium botulinum, botulinum toxin, and the idea of the therapeutic use of the toxin. *Mov Disord.* 2004;19(Suppl 8):S2-S6.
76. Steinbuch JG. Vergiftung durch verdorbene würste. *Tübinger Blätter für Naturwissenschaften und Arzneykunde.* 1817;3:26-52.
77. Kerner J. Vergiftung durch verdorbene Würste. . *Tübinger Blätter für Naturwissenschaften und Arzneykunde.* 1817;3:1-25.
78. Kerner J. Neue beobachtungen über die in Württemberg so häufig vorkommenden tödlichen vergiftungen durch den genuss geräucherter Würste. *Tübingen:Osiander,* 1820.
79. Kerner J. Das Fettgift oder die Fettsäure und ihre Wirkungen auf den thierischen Organismus, ein Beytrag zur Untersuchung des in verdorbenen Würsten giftig wirkenden Stoffes. *Stuttgart, Tübingen: Cotta,* 1822.
80. Erbguth FJ, Naumann M. Historical aspects of botulinum toxin: Justinus Kerner (1786–1862) and the “sausage poison”. *Neurology.* 1999;53:1850-3.
81. Ermengem EPV. A new anaerobic bacillus and its relation to botulism. *Rev Infect Dis.* 1979;1:701-19.
82. Chen ZP, Morris-Jr JG, Rodriguez RL, Shukla AW, Tapia-Núñez J, Okun MS. Emerging opportunities for serotypes of botulinum neurotoxins. *Toxins.* 2012;4:1196-222.
83. Schantz EJ, Johnson EA. Botulinum toxin: the story of its development for the treatment of human disease. *Perspect Biol Med.* 1997;40(3):317-27.
84. Lamanna C, Eklund HW, McElroy OE. Botulinum toxin (type A); including a study of shaking with chloroform as a step in the isolation procedure. *J Bacteriol.* 1946;52:1-13.

85. Duff JT, Wright GG, Klerer DE. Studies on immunity to toxins of *Clostridium botulinum*. I. A simplified procedure for isolation of type A toxin. *J Bacteriol*. 1957;73:42-7.
86. Scott AB, Rosen-Baum A, Collins CC. Pharmacologic weakening of extraocular muscles. *Invest Ophthalmol*. 1973;12:924-7.
87. Scott AB. Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. *Ophthalmology*. 1980;87:1044-9.
88. Chen S. Clinical Uses of Botulinum Neurotoxins: Current Indications, Limitations and Future Developments. *Toxins*. 2012;4:913-39.
89. Dressler D, Saberi FA. Botulinum toxin: mechanisms of action. *Eur Neurol*. 2005;53:3-9.
90. Shaari CM, Sanders I, Wu B-L, Biller HF. Rhinorrhea is decreased in dogs after nasal application of botulinum toxin. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995;112:566-71.
91. Rohrbach S, Olthoff A, Laskawi R, Giefer B, Götz W. Botulinum toxin type A induces apoptosis in nasal glands of guinea pigs. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2001;110:1045-50.
92. Ünal M, Sevim S, Doğu O, Vayisoğlu Y, Kanik A. Effect of botulinum toxin type A on nasal symptoms in patients with allergic rhinitis: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Acta Otolaryngol*. 2003;123(9):1060-3.
93. Yang TY, Jung YG, Kim YH, Jang TY. A comparison of the effects of botulinum toxin A and steroid injection on nasal allergy. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008;139:367-71.
94. Rohrbach S, Laskawi R. Minimally invasive application of botulinum toxin type A in nasal hypersecretion. *ORL*. 2001;63:382-4.
95. Binder WJ, Blitzer A, Brin MF. Treatment of hyperfunctional lines of the face with botulinum toxin A. *Dermatol Surg*. 1998;24(11):1198-205.
96. Dolly JO, O'Connell MA. Neurotherapeutics to inhibit exocytosis from sensory neurons for the control of chronic pain. *Curr Opin Pharmacol*. 2012;12:100-08.

97. Cui M, Khanijou S, Rubino J, Aoki KR. Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduces formalin-induced pain. *Pain*. 2004;107:125-33.
98. Aoki KR. Pharmacology and immunology of botulinum toxin serotypes. *J Neurol*. 2001;248(Supl. 1):3-10.
99. Wheeler A, Smith HS. Botulinum toxins: Mechanisms of action, antinociception and clinical applications. *Toxicology*. 2013;306:124-46.
100. Guoa B-L, Zhenga C-X, Suia B-D, Lia Y-Q, Wanga Y-Y, Yangc Y-L. A closer look to botulinum neurotoxin type A-induced analgesia. *Toxicon*. 2013;71:134-9.
101. Lomas LM, Terner JM, Picker MJ. Sex differences in NMDA antagonist enhancement of morphine antihyperalgesia in a capsaicin model of persistent pain: Comparisons to two models of acute pain. *Pharmacol Biochem Behav*. 2008;89:127-36.
102. Bach-Rojecky L, Lacković Z. Antinociceptive Effect of Botulinum Toxin Type A in Rat Model of Carrageenan and Capsaicin Induced Pain. *Croat Med J*. 2005;46(2):201-8.
103. Bach-Rojecky L, Salković-Petrisić M, Lacković Z. Botulinum toxin type A reduces pain supersensitivity in experimental diabetic neuropathy: Bilateral effect after unilateral injection. *Eur J Pharmacol*. 2010;633(1-3):10-4.
104. Antonucci F, Rossi C, Gianfranceschi L, Rossetto O, Caleo M. Long-distance retrograde effects of botulinum neurotoxin A. *J Neurosci*. 2008;28(14):3689-96.
105. Rohrbach S, Olthoff A, Laskawi R, Götz W. Neuronal nitric oxide synthase-immunoreactivity. A neuromodulating system independent of peripheral nasal gland denervation in guinea pig nasal mucosal tissue after treatment with botulinum toxin type A. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2002;64:330-4.
106. Ma W, Silberberg SD, Priel Z. Distinct axonemal processes underlie spontaneous and stimulated airway ciliary activity. *J Gen Physiol*. 2002;120:875-85.

107. Aiello E, Kennedy J, Hernandez C. Stimulation of frog ciliated cells in culture by acetylcholine and substance P. *Comp Biochem Physiol C*. 1991;99(3):497-506.
108. Manning PJ, Daniel RH, Christian NE. *The biology of the laboratory rabbit*. 2 ed. San Diego: Academic Press; 1994. 483 p.
109. Iida H, Matsuura S, Shirakami G, Tanimoto K, Fukuda K. Differential effects of intravenous anesthetics on ciliary motility in cultured rat tracheal epithelial cells. *Can J Anesth*. 2006;53(3):242-9.
110. Braga PC. In vivo observation and counting methods for ciliary motion. *Methods in Bronchial Mucology*. New York: Raven Press; 1988. p. 269-77.
111. Pazetti R, Pêgo-Fernandes PM, Lorenzi-Filho G. Effects of cyclosporine A and bronchial transection on mucociliary transport in rats. *Ann Thorac Surg*. 2008;85:1925-9.
112. Pires-Neto RC, Lichtenfelds AJ, Soares SR, Macchione M, Saldiva PHN, Dolkinhof M. Effects of São Paulo air pollution on the upper airways of mice. *Environ Res*. 2006;101:356-61.
113. Jones R, Reid L. Secretory cells and their glycoproteins in health and disease. *Br Med Bull*. 1978;34:9-16.
114. Seriani R, Junqueira MS, Toledo AC, Martins MA, Seckler M, Alencar AM, Negri EM, Silva LFF, Mauad T, Saldiva PHN, Macchione M. Diesel exhaust particulates affect cell signaling, mucin profiles, and apoptosis in trachea explants of balb/C mice. *Environ Toxicol*. 2014.
115. Ferreira DS, Annoni R, Silva LFF, Buttignol M, Santos ABG, Medeiros MCR, et al. Toll-like receptors 2, 3 and 4 and thymic stromal lymphopoietin expression in fatal asthma. *Clin Exp Allergy*. 2012;42(10):1459-71.
116. Uller L, Emanuelsson CA, Andersson M, Erjefält JS, Greiff L, Persson CG. Early phase resolution of mucosal eosinophilic inflammation in allergic rhinitis. *Respir Res*. 2010;11:54-62.

117. Wang CJ, Zhou ZG, Holmqvist A, Zhang H, Li Y, Adell G, et al. Survivin expression quantified by Image Pro-plus compared with visual assessment. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2009;17:530-35.
118. Dunn OJ. Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics*. 1964;6(3):241-52.
119. Chuang Y-C, Yoshimura N, Huang C-C, Chiang P-H, Chancellor MB. Intravesical botulinum toxin a administration produces analgesia against acetic acid induced bladder pain responses in rats *J Urol*. 2004;172:1529-32.
120. Chuang Y-C, Tyagi P, Huang C-C, Yoshimura N, Wu M, Kaufman J, et al. Urodynamic and Immunohistochemical Evaluation of Intravesical Botulinum Toxin A Delivery Using Liposomes. *J Urol*. 2009;182:786-92.
121. Lande S, Pagel C, Gibson SJ, Kar S, Dolly JO, Polak JM. The immunocytochemical detection of motor end plates using antisera to protein gene product 95 (PGP 95). 9th Nat Mtg Bayliss & Starling Soc1989.
122. Hassan SM, Jennekens FG, Wieneke G, Veldman H. Calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity, in botulinum toxin-paralysed rat muscles. *Neuromuscul Disord*. 1994;4(5-6):489-96.
123. Sala C, Andreose JS, Fumagalli G, Lomo T. Calcitonin Gene-Related Peptide: Possible Role in Formation and Maintenance of Neuromuscular Junctions. *Neurosci*. 1995;15(1):520-8.
124. Sarin S, Udem B, Sanico A, Toggias A. The role of the nervous system in rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(5):999-1014.
125. Kummer W. Ultrastructure of calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerve fibres in guinea-pig peribronchial ganglia. *Regul Pept*. 1992;37:135-42.
126. Bach-Rojecky L, Lacković Z. Central origin of the antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009;94(2):234-8.

127. Priori A, Berardelli A, Mercuri B, Manfredi M. Physiological effects produced by botulinum toxin treatment of upper limb dystonia. Changes in reciprocal inhibition between forearm muscles. *Brain*. 1995;118(Pt 3):801-7.
128. Gilaldi N. The mechanism of action of botulinum toxin type A in focal dystonia is most probably through its dual effect on efferent (motor) and afferent pathways at the injected site. *J Neurol Sci*. 1997;152(2):132-5.
129. Abbruzzese G, Berardelli A. Neurophysiological effects of botulinum toxin type A. *Neurosci Res*. 2006;9(2-3):109-14.
130. Luvisetto S, Marinelli S, Lucchetti F, Marchi F, Cobiauchi S, Rossetto O, et al. Botulinum neurotoxins and formalin-induced pain: Central vs. peripheral effects in mice. *Brain Res*. 2006;1082(1):124-31.
131. Restani L, Antonucci F, Gianfranceschi L, Rossi C, Rossetto O, Caleo M. Evidence for Anterograde Transport and Transcytosis of Botulinum Neurotoxin A (BoNT/A). *J Neurosci*. 2011;31(44):15650-59.
132. Baraniuk JN, Naranch K, Maibach H, Clauw DJ. Irritant Rhinitis in Allergic, Nonallergic, Control and Chronic Fatigue Syndrome Populations. *J Chronic Fatigue Syndr*. 2000;7:3-31.
133. Naranch K, Park YJ, Repka-Ramirez MS, Velarde A, Clauw D, Baraniuk JN. A tender sinus does not always mean rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002;127:387-97.
134. Meng J, Wang J, Lawrence G, Dolly JO. Synaptobrevin I mediates exocytosis of CGRP from sensory neurons and inhibition by botulinum toxins reflects their anti-nociceptive potential. *J Cell Sci*. 2007;120:2864-74.
135. Biasi SD, Rustioni A. Glutamate and substance P coexist in primary afferent terminals in the superficial laminae of spinal cord. *Proc Natl Acad Sci*. 1988;85(20):7820-4.
136. Langley K, Grant NJ. Are exocytosis mechanism neurotransmitter specific? *Neurochem Int*. 1997;31(6):739-57.

137. Sakaba T, Stein A, Jahn R, Neher E. Distinct kinetic changes in neurotransmitter release after SNARE protein cleavage. *Science*. 2005;309(5733):491-4.
138. Verderio C, Pozzi D, Pravettoni E, Inverardi F, Schenk U, Coco S, et al. SNAP-25 Modulation of Calcium Dynamics Underlies Differences in GABAergic and Glutamatergic Responsiveness to Depolarization. *Neuron*. 2004;41(4):599-610.
139. Bae S-J, Matsunaga Y, Takenaka M, Tanaka Y, Hamazaki Y, Shimizu K, et al. Substance P induced preprotachykinin-a mRNA, neutral endopeptidase mRNA and substance P in cultured normal fibroblasts. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;127(4):316-21.
140. Zagoory O, Braiman A, Priel Z. The mechanism of ciliary stimulation by acetylcholine: roles of calcium, PKA, and PKG. *J Gen Physiol*. 2002;119(4):329-39.
141. Olgart C, Gustafsson LE, Wiklund NP. Evidence for nonvesicular nitric oxide release evoked by nerve activation. *Eur J Neurosci*. 2000;12(4):1303-9.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

CARTA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 09.02.2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **326/10** intitulado: "**Efeito da Toxina Botulínica Tipo A Sobre o Transporte Mucociliar Nasal de Coelho**", apresentado pelo **Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei No 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Richard Louis Voegels

Pesquisador (a) Executante: Waldir Carreirão Neto

CEP-FMUSP, 09 de fevereiro de 2011.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Daniel Romero Muñoz
Vice-coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

APÊNDICE 2

CARTA DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 16/06/15, **APROVOU** o documento datado de 15/06/15 para o protocolo de pesquisa nº **326/10** intitulado “Efeito da toxina botulínica tipo A sobre o transporte mucociliar nasal de coelhos” apresentado pelo Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia.

- Alteração no título do projeto para: **“Efeito da toxina botulínica tipo A sobre a expressão de neuropeptídeos e o transporte mucociliar nasal em coelhos”**

Pesquisador Responsável: **Richard Louis Voegels**

Pesquisador Executante: **Waldir Carreirão Neto**

CEUA-FMUSP, 16 de Junho de 2015



Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais