

UNIVERSIDADE SANTO AMARO
Mestrado em Odontologia

Deyvid da Silva Rebouças

**ALTERAÇÕES ÓSSEAS MANDIBULARES APÓS
ADMINISTRAÇÃO DE TOXINA BOTULÍNICA EM MÚSCULOS
MASTIGATÓRIOS EM RATOS: REVISÃO SISTEMÁTICA**

São Paulo
2018

Deyvid da Silva Rebouças

**ALTERAÇÕES ÓSSEAS MANDIBULARES APÓS
ADMINISTRAÇÃO DE TOXINA BOTULÍNICA EM MÚSCULOS
MASTIGATÓRIOS EM RATOS: REVISÃO SISTEMÁTICA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* Mestrado em Odontologia da Universidade de Santo Amaro - UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Angélica Castro Pimentel

Área de concentração: Implantodontia.

**São Paulo
2018**

Rebouças, Deyvid da Silva.

R292a Alterações ósseas mandibulares após administração de toxina botulínica em músculos mastigatórios em ratos: revisão sistemática / Deyvid da Silva Rebouças. -- São Paulo, 2018
42 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) -- Universidade de Santo Amaro - UNISA, 2018.

Orientadora: Angélica Castro Pimentel.

Bibliografia: f. 38-39

1.Toxina botulínica. 2.Crescimento craniofacial. 3. Mandíbula. I. Pimentel, Angélica Castro. II. Título.

Deyvid da Silva Rebouças

**ALTERAÇÕES ÓSSEAS MANDIBULARES APÓS
ADMINISTRAÇÃO DE TOXINA BOTULÍNICA EM MÚSCULOS
MASTIGATÓRIOS EM RATOS: REVISÃO SISTEMÁTICA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Odontologia – área de concentração Implantodontia do Programa de Pós-Graduação em odontologia da Universidade Santo Amaro, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Angélica Castro Pimentel.

São Paulo, 26 de fevereiro de 2018.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Angélica Castro Pimentel
Doutora em Odontologia – Área de concentração: Implantodontia - SLMANDIC

Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk
Doutor em Odontologia – Área de concentração: Periodontia - USP

Prof. Dr. Daniel Isaac Sendyk
Doutor em Odontologia – Área de concentração: Implantodontia - USP

Dedico este trabalho...

A Deus, agradeço pela minha existência, saúde, proteção, fé e esperança.

À minha mãe, Jacy Vania, que, por incansáveis vezes, abriu mão de suas necessidades em prol dos meus sonhos. Meu combustível diário de garra, perseverança e força.

À minha irmã Natália Silva de Oliveira, que me ensina, inconscientemente, a cada dia, ser um ser humano melhor.

À toda minha família que sempre me apoiou em todos os novos planos, projetos e caminhos. Especialmente aos meus primos Darlan e Elaine que fizeram meus dias em São Paulo mais fáceis.

Aos eternos amigos... que de formas diferentes contribuíram com todas as minhas caminhadas (Helô, Nana, Rachel, Thiago, Tila, Jean, Chico, Marcos, Thiago, Marco)!!!

AGRADECIMENTOS

À UNISA, por possibilitar o desenvolvimento de mais esta etapa da minha vida, Mestrado.

Ao corpo de professores do Curso de Mestrado em Odontologia UNISA por diversos ensinamentos durante os módulos.

À minha orientadora, Dr.^a Angélica Pimentel que acreditou que poderíamos construir este projeto, confiou em mim e carregou cada pedra dessa construção.

Ao coordenador do Programa de mestrado, Dr. Wilson Roberto Sendyk pelo apoio, incentivo e por valiosos conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Daniel Isaac Sendyk, que surgiu como uma luz quando tudo parecia escuro e impossível de ser compreendido.

Muito obrigado.

A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.

Charles Chaplin

RESUMO

Introdução: A toxina botulínica tipo A (BTX-A) diminui a contração muscular e é comumente utilizada na clínica para distúrbios musculares, disfunção temporo-mandibular (DTM), alívio de dores e com finalidade cosmética da face. Contudo, esta redução na atividade muscular pode provocar alterações esqueléticas, conforme observado em estudos com animais. **Objetivo:** realizar uma revisão sistemática para investigar alterações ósseas mandibulares após administração de BTX-A nos músculos da mastigação. **Materiais e métodos:** A revisão sistemática foi orientada pelas recomendações PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses). O processo de revisão foi realizado por meio de uma busca sistemática em quatro bases de dados eletrônicas (PubMed, Scopus, Web of Science, e Cochrane Library) e busca manual nas referências bibliográficas dos estudos incluídos. **Resultados:** A busca resultou em 28 trabalhos, eliminou-se 21 que não apresentavam os critérios de inclusão. 7 estudos foram avaliados e analisados por 2 avaliadores. A avaliação do risco de viés dos estudos incluídos foi realizada de forma independente, por meio da ferramenta Systematic Review Centre for Laboratory animal Experimentation (SYRCLE's). Todos os estudos foram considerados com alto risco de viés. Tabulou-se os dados relevantes de cada estudo com o Formulário de dados empregado. Pesquisou-se as alterações do peso corpóreo e muscular, mensurações cefalométricas, densidade óssea mandibular, espessura da cortical óssea e espessura do trabeculado ósseo após o uso de BTX-A. **Conclusão:** Os estudos em animais apontam alterações esqueléticas e musculares após administração da neurotoxina, mesmo um único uso, que pode resultar em perda óssea a curto e longo prazo das estruturas mandibulares.

Palavras-chave: Toxina Botulínica, Crescimento Craniofacial, Mandíbula.

ABSTRACT

Introduction: Botulinum toxin type A (BTX-A) decreases muscle contraction and is often used in muscle disorders, temporo-mandibular dysfunction (TMD), pain relief and facial cosmetics. However, this is an application in the muscle industry that can provoke a stiffness, as observed in animal studies. **Objective:** To perform a systematic review to investigate the changes in the processes of BTX-A administration in the chewing muscles. **Materials and methods:** PRISMA (Preferred Report Items for Systematic Reviews and Meta-Analyzes). The review process was carried out by means of a systematic search in four electronic databases (search of bibliographic references of included studies). **Results:** The search resulted in 28 works, eliminating 21 those that do not present the inclusion criteria. 7 studies were evaluated and analyzed by 2. A Systematic Review Center for Laboratory Animal Experimentation (SYRCLE). All studies were developed with high risk of bias. Tabulated the relevant data of each study with the Data Form employed. Researched as changes in body and muscle weight, cephalometric measurements, mandibular bone density, bone cortical thickness and trabecular thickness after BTX-A. **Conclusion:** Animal studies were performed with the aim of reducing the muscular and long-term capacity of mandibular structures.

Key words: Botulinum Toxin; Craniofacial Growth; Mandible.

Lista de Siglas e Abreviaturas

BTX	Toxina botulínica
BTX-A	Toxina botulínica tipo A
BTX-B	Toxina botulínica tipo B
ATM	Articulação temporomandibular
DTM	Disfunção temporomandibular
DOM	Densidade óssea mineral
SF	Soro fisiológico
SYRCLE's	<i>Systematic Review Centre for Laboratory animal Experimentation</i>
RoB	Risk of Bias
RCT	Randomized controlled trial
Micro-CT	Micro-tomografia computadorizada
PRISMA	<i>Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses</i>
PROSPERO	Registro Prospectivo Internacional de Revisões Sistemáticas

Lista de Figuras

Figura 01 - Organograma do processo de busca e seleção dos artigos.... **29**

Lista de Tabelas

Tabela 01 – Características dos estudos incluídos	32
Tabela 02 - Análise qualitativa do risco de viés dos artigos incluídos	35
Tabela 03 – Variáveis avaliadas por cada trabalho e a diferença estatística encontrada	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVO.....	14
3 REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1.1 Toxina Botulínica	15
3.1.2 Indicações	16
3.2 Disfunção Temporomandibular	17
3.3 Fisiologia óssea	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Protocolo e Registro.....	21
4.2 Elegibilidade	21
4.3 Fonte de informação e estratégia de busca	21
4.4 Seleção dos estudos	22
4.5 Critérios de inclusão	23
4.6 Processo de coleta de dados	23
4.7 Lista de dados	23
4.8 Risco de viés	24
5 RESULTADOS	25
5.1 Seleção dos estudos	25
5.2 Dados dos estudos	26
5.3 Avaliação da qualidade	31
5.4 Peso corpóreo e muscular	31
5.5 Mensurações cefalométricas	32
5.5 Densidade óssea mandibular, Espessura da cortical óssea, Espessura do trabeculado ósseo	32

6 DISCUSSÃO	33
6.1 Modelo do estudo	34
6.2 Toxina botulínica e alterações musculares	35
6.3 Toxina botulínica	46
7 CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS	38
ANEXO	40
APÊNDICE	41

1 INTRODUÇÃO

A disfunção temporomandibular (DTM) é um grupo de alterações que afetam as articulações temporomandibulares (ATM) e as estruturas anatômicas relacionadas. A etiologia destas alterações é complexa e pode envolver múltiplas causas, tais como: infecciosas, traumáticas, estruturais ou inflamatórias e os sintomas são geralmente manifestados como dor na região orofacial.¹

A DTM pode ser dividida em articulares e musculares. As primeiras, referem-se aos transtornos intra ou extra articulares, ou seja, nas estruturas internas das articulações ou ligados à cápsula e às estruturas adjacentes. As musculares, como o nome sugere, estão associadas aos músculos relacionados a ATM, sobretudo: Masseteres, Temporais, Pterigóideos Mediais e Pterigóideos Laterais.

Os tratamentos para DTM incluem terapias conservadoras, como, limitação dos movimentos mandibulares, modificação de hábitos parafuncionais, aparelhos intra-orais, dieta branda, aplicação de calor úmido, diminuição da tensão dos músculos mastigatórios com uso de neurotoxina, terapia com gelo, fisioterapia e medicamentos. No entanto, acredita-se que cerca de 30% dos pacientes não respondem bem aos tratamentos não-invasivos e necessitam de abordagem cirúrgica que pode ser multiladora.²

A injeção de neurotoxina botulínica tipo A (BTX-A) nos músculos mastigatórios tem sido usada para tratar dor miofascial (incluindo o bruxismo), DTM e cefaléia crônica.³

Objetiva-se, com a BTX, diminuição da contração dos músculos mastigatórios, principalmente temporal e masseter. A BTX-A bloqueia a transmissão colinérgica, pois impede a liberação de acetilcolina na junção neuromuscular e provoca relaxamento muscular temporário do músculo injetado.² Esta redução da força da contração muscular contribui no controle das manifestações álgicas e inflamatórias musculares e articulares.^{2,3}

Contudo, esta redução na atividade muscular pode provocar alterações esqueléticas, conforme observado em pesquisas com animais que

identificaram perda óssea em membros que tiveram a contração muscular reduzida após uso da BTX-A.²

A preocupação com estas possíveis alterações músculo-esqueléticas provocadas pela redução da atividade muscular induzidos pela BTX-A deve ser considerada, pois tem aumentado o número de pacientes que são submetidos a estas condutas terapêuticas para controle de dor facial e DTM por dentista e médicos.

Apesar de existir diversos relatos de casos clínicos, há poucas pesquisas que comprovem a relação da paralisia provocada pela BTX-A e as alterações esqueléticas mandibulares.³

Precisa-se investigar se a administração da BTX-A para redução da força de contração dos músculos da mastigação pode provocar consequências degenerativas da mandíbula.

Uma pesquisa preliminar nos principais periódicos científicos a fim de elucidar a repercussão da BTX-A com o tecido ósseo revelou que até o momento, não há ensaios clínicos com grupo controle e longo acompanhamento publicados com uso deste grupo farmacológico em seres humanos e que apenas estudos em animais com diferentes modelos experimentais estão disponíveis. Assim, a seguinte questão focal foi elaborada: A injeção de toxina botulínica ou soro fisiológico nos Músculos Mastigatórios de ratos provoca alteração no tecido ósseo?

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Realizar uma revisão sistemática para investigar as alterações no tecido ósseo da mandíbula em ratos provocadas pela administração local de toxina botulínica do tipo A nos músculos mastigatórios (Temporal e Masseter).

2.2 Específicos

Pesquisar as alterações do peso corpóreo e muscular, mensurações cefalométricas, densidade óssea mandibular, espessura da cortical óssea e espessura do trabeculado ósseo após o uso de BTX-A

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1.1 Toxina botulínica

A BTX é uma metaloprotease bacteriana produzida pela *Clostridium botulinum*, bacilo Gram-positivo paralizador anaeróbio,⁴ comumente encontrada em plantas, solo, água, e trato intestinal dos animais. Embora já tenha sido considerada letal, a BTX-A é usado como um medicamento terapêutico.⁵

BTX-A exibe ações transitórias, não destrutivas, dose-dependentes e localizadas, com efeitos colaterais sistêmicos mínimos.⁵ Causa inibição específica da liberação do neurotransmissor acetilcolina em terminações nervosas colinérgicas. As vesículas de acetilcolina dentro da fibra nervosa são impossibilitadas de eclodirem na membrana pré-sináptica das junções neuromusculares, pois a neurotoxina cliva a proteína associada ao sinaptosoma (SNAP-25), molécula necessária para a fusão da vesícula e a membrana neuronal. Como a acetilcolina não é liberada na junção neural, não ocorre o estímulo na extremidade axônica seguinte. Este bloqueio do sistema nervoso periférico provoca uma paralisia transitória da placa muscular que é totalmente reversível em alguns meses.⁶

Os sete diferentes sorotipos de BTX conhecidos hoje são A, B, C1, D, E, F e G, porém apenas os sorotipos A (BTX-A) e B (BTX-B) estão disponíveis para uso cosmético e terapêutico, mas o tipo A é o único aprovado para fins cosméticos, sendo também, o mais usado.⁷

A paralisia muscular, também chamada de deservação, ocorre de forma transitória e reversível. O retorno da contração muscular acontece espontaneamente, após aproximadamente 3 meses da administração, por meio dois processos: o primeiro seria o surgimento de brotos de axônios, ainda na fase inicial e o segundo seria desenvolvimento de uma nova junção

neuromuscular funcional nas terminações nervosas incipientes, substituindo assim a placa motora final.⁴

A toxina é purificada e diluída com albumina de soro humano. Geralmente as ampolas possuem apresentações de 50 a 200 unidades (U) e a BTX-A é reconstituída com solução salina 0,9% esterilizada sem conservante (1-5 ml) antes de ser utilizada. BTX inicia o efeito em 24 a 48 horas após a administração, alcança o pico em 2 a 3 semanas e mantém a sua eficácia por cerca de 3 a 4 meses.⁵

Os efeitos indesejáveis da toxina podem ser sistêmicos ou locais. As reações sistêmicas são raras, porém podem ocorrer, contudo no local da injeção, os efeitos colaterais incluem: dor, vermelhidão, formigamento, hematomas, inchaço ou sensibilidade, músculos rígidos ou flácidos próximos ao local e discreto sangramento.⁶

3.1.2 Indicações

Inicialmente utilizada para o tratamento de estrabismo, o BTX-A mostrou-se eficaz no tratamento de alterações caracterizadas pela hiperatividade muscular local e seu uso como agente terapêutico tem crescido consideravelmente. Atualmente apresenta muitas indicações, tais como: hiperidrose axilar primária grave, distonia cervical, estrabismo, blefaroespasmos e outras condições. Em pacientes pediátricos, embora todos os usos estejam fora do rótulo, BTX-A é usado na paralisia cerebral para reduzir a espasticidade e revela pequenas melhorias nos padrões da marcha.⁸

Desde a aprovação do seu uso pela US Food and Drug Administration (FDA) em 1989, a BTX-A tem sido amplamente utilizada na Odontologia para o tratamento de distúrbios funcionais e estéticos,³ tais como: distúrbios algícos (neuralgia do trigêmeo, cefaléia e enxaqueca, Síndrome da dor miofacial)⁵, DTM (bruxismo e deslocamento temporomandibular), hipertrofia do masseter,^{7,9} controle de espasmo hemifacial, blefaroespasmos, hipersalivação, controle de traumas mastigatórios e apertamento dentário em pacientes que farão reabilitação com implantes,⁵ além de minimizar marcas de expressão e correção de assimetrias faciais.^{3,5}

Para DTM e controle algico muscular tem sido indicado administração do BTX-A nos músculos mastigatórios. Os resultados são satisfatórios para quadros de trismo, bruxismo, mialgia mastigatória e dor miofascial tensional.¹

Um estudo clínico randomizado, publicado por Hessa Al-Wayli em 2017, com 25 pacientes portadores de bruxismo, revelou que a injeção de toxina botulínica reduz o escore de dor médio e o número de eventos de bruxismo.¹⁰

Entre as indicações estéticas, utiliza-se, principalmente, para correção de linhas e marcas dinâmicas na região frontal, glabella, palpebral, nasal, perioral, comissura labial, mental e platisma. Além de possibilitar a correção do sorriso gengival proveniente da hiperatividade dos músculos elevadores da asa do nariz e do lábio superior e tratamento conservador da hipertrofia uni ou bilateral do masseter.⁴

Um estudo realizado por Ahn, Horn e Blitzer, em 2004, revelou que 95% dos pacientes asiáticos ficou satisfeito com os resultados obtidos com a toxina botulínica para hipertrofia de masseter. 20 pacientes receberam 25 U em cada borda inferior do masseter por semana, 35% foi submetido a apenas uma aplicação, 50% recebeu 2 administrações e 15% 3 injeções. Os resultados foram identificados com 1 a 2 meses após a administração e nova intervenção foi necessária entre 6 a 8 meses depois.¹¹

3.2 Disfunção temporomandibular

A DTM é um termo genérico para descrever uma série de alterações que afeta a função mastigatória e pode incluir patologia verdadeira da ATM, bem como as disfunções musculares mastigatórias. As alterações musculares e articulares podem manifestar dor de cabeça, dor na região facial e peri-auricular, estalidos, trismo, limitação da função mastigatória, assimetria facial e zumbido. A maioria dos casos de DTM inclui um componente miogênico, sendo o apertamento muscular, o bruxismo, hábitos parafuncionais e comportamentos psicomotores os principais fatores etiológicos.¹

O bruxismo pode afetar os músculos isoladamente, porém pode provocar também DTM. Pacientes crônicos podem ter dores de cabeça, degeneração articular e alterações durante a fala, mastigação e deglutição. Os

sintomas podem ser exacerbados por fatores externos como fadiga, estresse e ansiedade.¹²

A DTM causada por excessivas forças mastigatórias pode ser tratada por uma modalidade terapêutica ou por associação destas que podem ser mais conservadoras, tais como: placas e aparelhos intra-orais, ajustes oclusais, reabilitação dentária, mudança da dieta, limitação dos movimentos mandibulares, fisioterapia local, aplicação de calor úmido e ou crioterapia e medicamentos (anti-inflamatório, analgésico, relaxante muscular) ou com procedimentos cirúrgicos.²

Acredita-se que cerca de 70% dos pacientes respondem bem aos tratamentos não-invasivos.² Uma parcela dos pacientes precisa ser submetida a procedimentos cirúrgicos que geralmente são técnicas mais invasivas, podem ser irreversíveis, apresentar alto custo financeiro e ser paliativas e não resolúvas.^{1,2}

Para os casos de apertamento noturno, a maneira mais eficaz de proteger os dentes é com um aparelho oclusal. Contudo, estes possuem pouca ação para interromper o bruxismo e proporciona discreto alívio das dores de cabeça e do distúrbio da ATM.⁵ A contração muscular exacerbada deve ser tratada com o relaxamento dos músculos afetados com a BTX-A. Esta redução da força muscular pode diminuir os sintomas e não interfere nas funções articulares, mastigatórias e da deglutição.¹

Hábitos parafuncionais, principalmente o bruxismo, em pacientes submetidos a reabilitação com prótese implantossuportada total com carga imediata pode ser a causa da falha do tratamento. A sobrecarga precoce, decorrente do trauma oclusal sobre os implantes que, todavia, não estão osseointegrados, pode impossibilitar os processos fisiológicos necessários para osseointegração. A diminuição da tensão muscular obtida com injeções BTX-A nos músculos mastigatórios proporciona uma maior estabilidade dos implantes e os protege durante o processo de osseointegração contra as forças oclusais prejudiciais.¹ A injeção profilática de 100 U de BTX-A no músculo masseter bilateralmente 12-48 h antes da cirurgia poderia ser benéfica na redução dessas forças.⁵

O estudo realizado por Raphael KG et al. (2014), comparou padrões ósseos trabeculares de côndilos mandibulares de mulheres que possuíam

diagnóstico de DTM e que foram tratadas com injeção de BTX-A nos músculos mastigatórios com os padrões das pacientes que possuíam o mesmo diagnóstico e não foram submetidas a injeções de toxina botulínica. A avaliação foi realizada por meio da análise de tomografias computadorizadas cone beam por dois radiologistas e este é um dos primeiros trabalhos que estudou as alterações ósseas associadas ao emprego da toxina botulínica em seres humanos. Identificaram redução na densidade óssea em todos as pacientes tratadas com BTX-A e houve diferença com significância estatística entre os grupos expostos a neurotoxina e as pacientes não submetidas a terapia com BTX-A.¹³

A pesquisa realizada por Kim et al. (2016) com 21 pacientes com DTM que foram tratados com aplicação de BTX-A nos músculos masseter e temporais bilaterais revelou que 85,7% dos pacientes tinham hábitos orais parafuncionais e houve redução com significância estatística entre o antes e o depois da toxina quanto ao escore de dor graduado, a intensidade da dor característica, pontos de incapacidade, grau de dor crônica e o grau de sintomas físicos não específicos.¹⁴

3.3 Fisiologia óssea

A mandíbula é uma estrutura esquelética composta de osso alveolar e basal, sendo constituídos por tipo ósseo medular e cortical, respectivamente. O osso alveolar tem alta plasticidade e relativo potencial de remodelação. Sua estimulação mecânica durante a mastigação é essencial para manter os dentes e ossos subjacentes saudáveis, contudo a perda dentária pode acarretar em uma reabsorção óssea alveolar irreversível.⁶

A carga mecânica muscular é fundamental para manutenção da arquitetura óssea e desta forma, a diminuição ou ausência dos movimentos e carregamento funcional pode alterar e ou reduzir a morfologia esquelética.⁷

A quantidade de osso medular varia muito entre os indivíduos, e este encontra-se, principalmente na região alveolar e no processo condilar.⁷ O côndilo e o processo alveolar da mandíbula recebem seu estímulo da atividade muscular,³ e a densidade óssea mineral (DMO) mandibular e a espessura do

osso cortical também estão correlacionadas com função mastigatória e força oclusal.¹⁵

A teoria da matriz funcional (Moss e Rankow, 1968) defende que o crescimento e o desenvolvimento craniofacial não são regulados intrinsecamente por osso ou cartilagem, mas pela musculatura relacionada. A hipofunção muscular pode influenciar o crescimento facial.⁸

A redução da contração muscular exacerbada pode ser obtida através de métodos de relaxamento, aparelhos intra-orais, terapia medicamentosa, estímulo elétrico, intervenção psicossocial e administração de neurotoxinas. O tratamento medicamentoso é efetivo e requer menor adesão do que tratamentos mais conservadores. Contudo, condições de saúde podem inviabilizar o uso de fármacos de rotina, além da necessidade de manter o uso diário. A terapia com toxina botulínica pode ser uma opção viável e mais duradoura para controle da hiperatividade muscular destes pacientes.¹⁶

A administração do BTX-A intramuscular provoca uma rápida diminuição da força e da massa muscular, mas o efeito desse fármaco no desenvolvimento ósseo não está claro.¹⁷ Porém a neurotoxina pode causar alterações anatômicas, bem como osteopenia do ramo mandibular, osso alveolar e do osso subcondral conforme encontrado em um trabalho com ratos transgênicos que receberam aplicação de BTX-A no masseter e apresentaram redução com significância estatística da fração do volume do osso, da densidade do tecido e da espessura trabecular quando comparou-se com o grupo controle².

Um estudo com coelhos que receberam uma única injeção de BTX-A (grupo teste) ou SF a 0,9% (grupo controle) no quadríceps e foram sacrificados 5 semanas após a administração da toxina para avaliação das alterações musculares e esqueléticas, não mostrou diferença com significância estatística no peso muscular e no comprimento da tíbia. O conteúdo mineral ósseo da tíbia inteira, avaliado por densitometria óssea foi 7% menor no lado injetado com BTX-A. do lado contralateral, porém não se observou um efeito detectável na DOM cortical.¹⁷

Não há trabalhos na literatura que comprovem a presença de alterações ósseas mandibulares em humanos que foram tratados com BTX-A. Contudo, há estudos que mostram a reabsorção do processo alveolar e a diminuição da DMO na região do corpo mandibular em pacientes com função mastigatória

prejudicada. Evento decorrente do processo alveolar edêntulo por um longo período de tempo.^{7, 9}

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Protocolo e registro

Essa revisão sistemática está de acordo com os itens da Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses (PRISMA) e registrada no Registro Prospectivo Internacional de Revisões Sistemáticas – PROSPERO (CRD42018086017).

4.2 Elegibilidade

Foram selecionados os trabalhos de pesquisa que avaliaram as alterações esqueléticas mandibulares em ratos que foram submetidos a administração de Toxina botulínica nos músculos mastigatórios (temporal e/ou masseter). Para investigar os efeitos da toxina botulínica nos tecidos ósseos, admitiu-se apenas os trabalhos do tipo caso-controle que compararam as alterações provocadas pela neurotoxina e por soro fisiológico. O tempo de seguimento da avaliação após o uso da neurotoxina foi entre 28 a 120 dias. Aceitou-se apenas trabalhos publicados em língua inglesa, entre 2007 até 2017. Devido à escassez de trabalhos, utilizou-se nesta revisão os estudos pilotos e trabalhos completos caso/controle.

4.3 Fonte de informação e estratégia de busca

A busca principal dos trabalhos de pesquisa na literatura foi realizada nos bancos de dados da PUBMED, SCOPUS, WEB OF SCIENCE até o dia 24 de setembro de 2017. As pesquisas foram realizadas de forma estratégica, por meio do método de busca avançada, com as seguintes palavras-chave: #1:

(Masticatory Systems OR Musculoskeletal Systems OR Mandibles OR Masticatory Muscle OR Masseter Muscle OR Temporal Muscle) #2: (Botulinum A Toxin OR Botulinum Neurotoxin A OR Botulinum Toxins); #3: (Bone Densities OR Bone Mineral Density OR Remodeling, Bone OR Bone Resorptions);; and #4 (Masticatory Systems OR Musculoskeletal Systems OR Mandibles OR Masticatory Muscle OR Masseter Muscle OR Temporal Muscle) AND (Botulinum A Toxin OR Botulinum Neurotoxin A OR Botulinum Toxins) AND (Bone Densities OR Bone Mineral Density OR Remodeling, Bone OR Bone Resorptions) e obteve-se 25 artigos.

Realizou-se buscas na base de dados da Cochrane Library por meio do endereço <http://onlinelibrary.wiley.com/cochranelibrary/search/>, sendo a última tentativa no dia 24 de setembro de 2017, com a palavra-chave Botulinum toxin e não foi encontrado trabalho de pesquisa com o tema deste estudo.

Buscou-se na base de registro PROSPERO (International prospective register of systematic reviews), no endereço <https://www.crd.york.ac.uk/prospero/searchquick.php?usehomepage=true>, revisões sistemáticas e meta-análises em construção com a palavra-chave Botulinum toxin e não foi identificado estudos registrados com este foco até o dia 24 de setembro de 2017.

Após a seleção eletrônica inicial, os autores buscaram manualmente outros artigos publicados potencialmente relevantes e examinaram as bibliografias dos estudos identificados e encontraram três artigos que apresentavam os critérios de inclusão.

4.4 Seleção dos estudos

Após a busca pela biblioteca virtuais, foi realizado uma avaliação independente dos títulos e resumos por dois revisores (DSR e ACP). Selecionou-se os estudos para avaliação completa na segunda fase da revisão, aqueles que preenchiam os critérios de inclusão ou os que apresentavam informações pouco claras no título e resumo.

As discordâncias entre os revisores foram resolvidas por discussão e consenso. As razões de rejeição dos estudos foram registradas.

A etapa final da avaliação envolveu ler os textos completos e confirmar a elegibilidade de cada estudo com base nos critérios de inclusão.

4.5 Critérios de inclusão

Incluiu-se nesta revisão sistemática os estudos que apresentavam os seguintes critérios:

- a) Estudos originais em inglês (experimentais em modelo animal);
- b) Ensaio experimental com presença de um grupo controle com administração de soro fisiológico com os mesmos protocolos de infiltração em ratos, ou sem intervenção para controle;
- c) Uso da toxina botulínica do tipo A (BTX-A) nos músculos da mastigação (Masseter e/ou Temporal);
- e) Desfechos que considerassem alterações ósseas por mensurações cefalométricas, radiografias, tomografias computadorizadas, densitometria e avaliação histológica;

Não foram incluídas cartas ao editor, revisões, séries de casos, relatos de casos e estudos *in vitro*.

4.6 Processo de coleta de dados

As publicações que preencheram os critérios de inclusão tiveram os dados extraídos de forma independente sob a forma de variáveis, de acordo com o objetivo da pergunta principal desta revisão, conforme listado. Na ausência de informações, os autores dos artigos originais foram contatados e solicitados a fornecer detalhes relevantes para a condução da presente revisão.

4.7 Lista dos dados

Os dados foram coletados dos artigos incluídos baseado nos itens do Formulário de extração de dados do trabalho Chambrone et al. (2010) (Apêndice 01) que aborda as seguintes informações:

"Autor / Ano" – refere o autor e ano de publicação.

"Título" – título do artigo publicado.

"Modelo de estudo" – descreve o tipo de método de pesquisa realizado.

"Tipo de participantes" – especifica o tipo de animal, raça e o tempo de acompanhamento.

"Tipo de intervenção" – descreve a toxina utilizada, posologia, forma de administração.

"Grupo de intervenção" - número amostral, grupos de intervenção, método de comparação do estudo.

"Método de avaliação" - métodos que avaliam a qualidade do estudo.

"Acompanhamento da intervenção" - indica o número de participantes de cada grupo no início da intervenção e no final do acompanhamento.

"Risco de viés" – caracteriza o risco de viés de cada estudo.

4.8 Risco de viés

A avaliação do risco de viés dos estudos incluídos foi realizada de forma independente pelos dois revisores deste trabalho, por meio da ferramenta Systematic Review Centre for Laboratory animal Experimentation (SYRCLE's) que foi desenvolvida para ser aplicada em estudos com animais. Esta ferramenta é uma adaptação da Risk of Bias (RoB) da Colaboração Cochrane que objetiva estabelecer consistência e evitar discrepâncias na avaliação da qualidade metodológica dos Ensaios Clínicos Controlados Randomizados (RCT - randomized controlled trial) em humanos. A SYRCLE's visa avaliar a qualidade metodológica e foi adaptada a aspectos de viés que desempenham um papel em experiências com animais.¹⁹

A ferramenta SYRCLE's aborda dez domínios específicos que estão relacionadas ao viés de seleção, ao viés de desempenho, ao viés de detecção, ao desvio de atrito, ao viés de relatório e a outros vieses. A metade desses itens está de acordo com os itens da ferramenta RoB.

Os parâmetros para avaliação do risco de viés, foram:

1. Gerência de sequência de alocação
2. Características da linha de base animal
3. Ocultação da alocação
4. Alojamento aleatório
5. Cegamento cuidadores e/ou pesquisadores
6. Avaliação aleatória dos resultados
7. Cegamento do avaliador dos resultados
8. Dados de resultados incompletos
9. Relatório de resultados seletivos
10. Outras fontes de viés

5 RESULTADOS

5.1 Seleção dos estudos

Após avaliação dos títulos e resumos dos 28 trabalhos selecionados pelos avaliadores, eliminou-se 21 que não apresentavam os critérios de inclusão. Destes, 03 estudos não estavam relacionados a utilização da BTX – A, 14 trabalhos não administraram a neurotoxina em região do esqueleto craniofacial e 04 pesquisas foram desenvolvidas com BTX - A em músculos da mastigação de coelhos ou de humanos. Então, 07 estudos foram avaliados e analisados pelos 02 avaliadores (Figura 01).

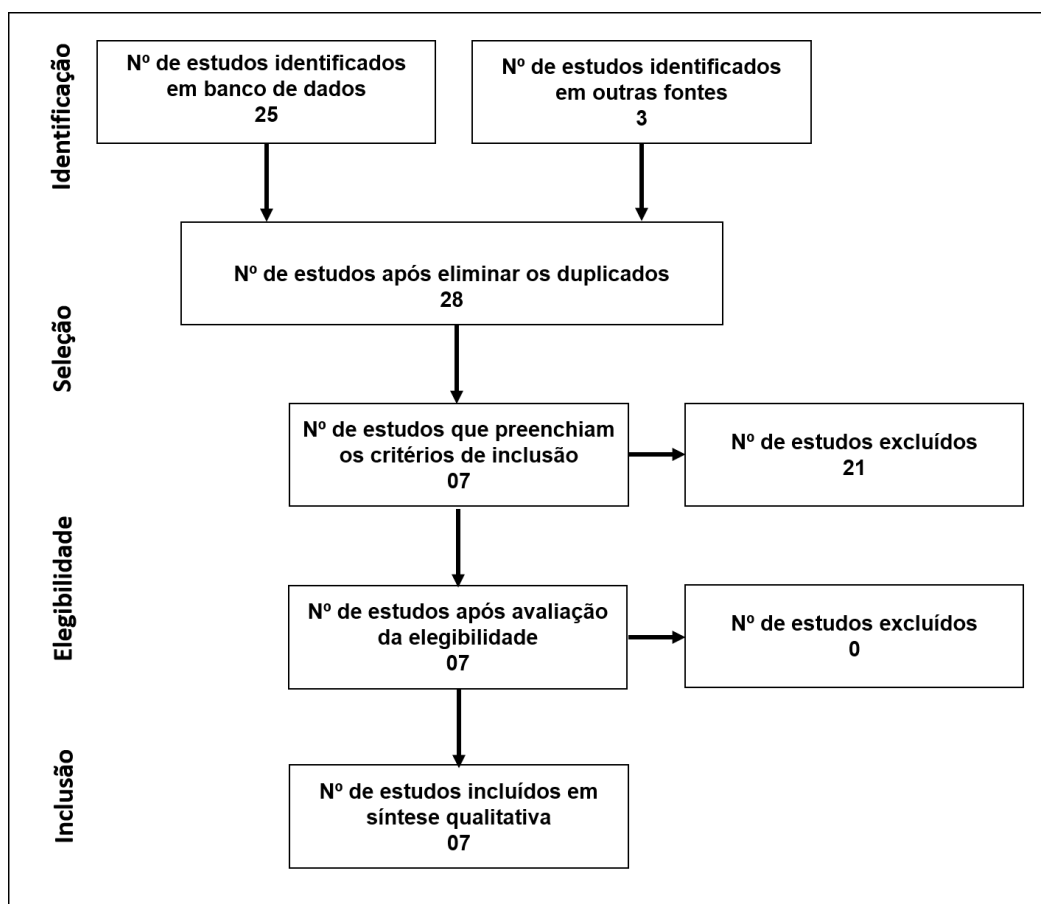


Figura 01 - Organograma do processo de busca e seleção dos artigos.

5.2 Dados dos estudos

Os dados referentes às características dos artigos incluídos estão apresentados na Tabela 01. Todos os artigos encontrados foram longitudinais e prospectivos sendo cinco artigos de Estudo paralelos e dois Split-mouth. Nenhum trabalho cita quais os métodos utilizados para randomização da pesquisa. Todos os trabalhos tinham grupo teste e grupo controle. Dois trabalhos (2 e 4) realizaram estudo piloto e puderam ajustar erros metodológicos. As pesquisas foram realizadas no Japão, Taiwan, Coréia do Sul, EUA, Turquia e França.

Diferentes modelos animais foram testados: quatro trabalhos utilizaram ratos Sprague-Dawley, uma pesquisa com Long-Evans, um estudo com Wistar e o estudo 4 não cita a espécie. No total, 287 animais foram testados. O período de acompanhamento variou de 28 a 120 dias após a aplicação da

neurotoxina. Para avaliar as alterações ósseas, quatro trabalhos diminuíram a contração muscular dos músculos masseter e temporal e três, apenas do masseter.

A ocorrência de efeitos adversos ou complicações durante a realização da pesquisa foi relatada apenas no trabalho 03 que excluiu algumas mandíbulas da avaliação devido a fraturas durante o processamento.

As variáveis utilizadas pelos trabalhos para avaliar as alterações esqueléticas induzidas/influenciadas pela neurotoxina foram: peso corpóreo, peso muscular (masseter e temporal), medidas cefalométricas, DOM, fração de volume ósseo, espessura trabecular, espessamento trabecular, medidas corticais e análise histológica.

Os métodos empregados para realizar as avaliações acima foram: peso com balança de precisão, fotografias para mensuração de pontos cefalométricos em programas digitais, densitometria óssea, Micro-CT, processamento com descalcificação óssea e produção de lâmina histológica.

Tabela 01 – Características dos estudos incluídos

Estudo	Tipo de estudo	Modelo animal	Grupos	Dose / Seguimento	Metodologia	Desfechos
Estudo 01 Tsai CY., et al. 2010. ²⁰	Estudo Prospectivo	10 ratos machos Sprague-Dawley 300g de peso 2 grupos (Lado direito e lado esquerdo)	Grupo teste → BTX-A masseter do lado esquerdo; Grupo Controle → SF 0,9% masseter do lado direito.	• 7,5U de BTX-A (0,3ml); 90 dias após a administração do BTX-A.	• Peso muscular; • Mensurações cefalométricas; • Densitometria óssea → DOM; • Microscopia óptica → Espessura da cortical óssea e trabeculado ósseo.	• Não houve ≠ entre o Peso muscular entre os lados; • ≠ entre as mensurações cefalométricas entre os lados; • Não houve ≠ na densidade óssea; • ≠ na espessura do osso cortical; • ≠ do osso trabecular.
Estudo 02 Tsai C., et al. 2011. ¹⁵	Ensaio clínico randomizado	60 ratos machos Long-Evans 120g de peso 4 grupos com 15 ratos (cada)	Grupo I → BTX-A masseter bilateral; SF 0,9% temporal bilateral; Grupo II → BTX-A temporal bilateral; SF 0,9% masseter bilateral; Grupo III → BOT-X masseter/temporal; Grupo IV (controle) → SF 0,9% masseter e temporal.	• 1,0 U de BTX-A (2.5ml); 45 dias após a administração do BTX-A.	• Peso muscular; • Volume muscular; • Densitometria óssea → DOM; • Microscopia óptica → Espessura da cortical óssea.	• Não houve ≠ entre o Peso muscular; • ≠ do volume muscular, sendo o grupo III < IV para o temporal e II, III < IV para o masseter; • ≠ da DMO mandibular. Sendo grupo III < IV; • ≠ na espessura do osso cortical. Sendo os grupos I, II, III < IV.
Estudo 03 Park C., et al. 2015. ⁸	Ensaio clínico randomizado	63 ratos machos Sprague-Dawley Peso não informado 3 grupos de 21 ratos (cada)	Grupo I (Controle) → SF 0,9% ambos lados masseter; Grupo II → BTX-A unilateral masseter e SF 0,9% do outro; Grupo III → BTX-A bilateral masseter.	• 3U de BTX-A (0,05 ml); 28 dias após a administração do BTX-A.	• Peso corpóreo; • Mensurações cefalométricas (Fotografias).	• ≠ no peso corpóreo. Sendo no grupo I>II>III; • houve ≠ em todas medidas entre lado experimental e lado controle do Grupo 2; • Não houve ≠ entre o Grupo I (controle) e o lado controle do Grupo 2; • A maioria das medidas do lado experimental do Grupo II < as medidas do Grupo I (controle).

Estudo	Tipo de estudo	Modelo animal	Grupos	Dose / Seguimento	Metodologia	Desfechos
Estudo 04 Dutra EH, et al. 2016. ²	Estudo prospectivo	13 ratos transgênicos 9 fêmeas 4 machos Peso não informado (Lado direito e lado esquerdo)	Grupo I → BTX-A masseter direito; Grupo II (controle) → Nenhuma intervenção no masseter esquerdo.	• 0,3U de BTX-A (0,03ml); 30 dias após a administração do BTX-A.	• Micro-CT → DMO, Fração de volume ósseo, espessura trabeculado ósseo, espessamento trabecular; • RX → Mensurações cefalométricas; • Análise histológica → Remodelação óssea.	<ul style="list-style-type: none"> • Houve ≠ na diminuição do volume ósseo, da espessura do trabeculado e da densidade tecidual e aumento no espaçamento do trabeculado entre lado com BTX-A e o controle; • Não houve ≠ no comprimento mandibular e da cabeça do côndilo. Houve ≠ na largura do côndilo entre BOT-X e controle; • Redução da proliferação e aumento do apoptose celular do lado com BTX-A.
Estudo 05 Babuccu B. et., 2009. ²⁰	Ensaio clínico randomizado	49 ratos Machos Wistar Peso não informado 4 grupos	Grupo I (controle), n 11 → Nenhum procedimento; Grupo II, n 14 → BTX-A no masseter direito; Grupo III, n 14 → BTX-A no temporal direito; Grup teste IV, n 10 → Sendo 5 com SF 0,9% no masseter e 5 com SF 0,9% no temporal.	• 0,4U de BTX-A (0,05ml); 120 dias após a administração do BTX-A.	<ul style="list-style-type: none"> • Peso muscular; • Mensurações cefalométricas; • Análise histológica → Atrofia muscular. 	<ul style="list-style-type: none"> • Não houve ≠ no peso muscular entre grupo I e IV; • Houve ≠ com redução do peso muscular do grupo II e III com o grupo I e IV; • Grupo I e IV: Não houve ≠ do peso entre os lados; • Grupo II e III: houve ≠ do peso entre os lados; • Não houve ≠ nas medidas cefalométricas entre grupo I e IV; • Houve ≠ com redução de medidas cefalométricas do grupo II e III com o grupo I e IV.

Estudo	Tipo de estudo	Modelo animal	Grupos	Dose / Seguimento	Metodologia	Desfechos
Estudo 06 Kün-Darbois JD. Et., 2015. ⁶	Ensaio clínico randomizado	15 ratos machos Sprague-Dawley 595 ± 41g 2 grupos	Grupo I (controle), n 6 → com SF 0,9% masseter e temporal; Grupo II, n 9 → BTX masseter e temporal. Lado direito é teste. Lado esquerdo é controle.	• 2U de BTX-A (0,2ml), sendo 1U masseter 1U temporal; 28 dias após a administração do BTX-A.	<ul style="list-style-type: none"> • Peso corpóreo; • Micro-TC → Espessura da cortical óssea e trabeculado ósseo; • Análise da porosidade; • Histologia → Metaplasia e remodelação. 	<ul style="list-style-type: none"> • Não houve ≠ no peso entra as semanas de um mesmo grupo; • Houve ≠ no peso entre os dois grupos durante as semanas; • Grupo BTX: ≠ entre lado direito e esquerdo; • ≠ trabeculado ósseo entre lado direito e esquerdo Grupo BTX-A; • Não houve ≠ trabeculado ósseo entre lado esquerdo Grupo BTX-A e Grupo controle; • Não houve ≠ na espessura cortical entre os grupos; • Houve metaplasia e remodelação mais intensa no lado direito do Grupo BTX-A.
Estudo 07 Kim JY, et al., 2008. ²²	Ensaio clínico randomizado	80 ratos machos Sprague-Dawley Peso não informado 4 grupos.	Grupo I (controle basal) → Sacrificado no início da pesquisa; Grupo II (controle) → Nenhum procedimento; Grupo III (test I) → BTX-A no masseter; Grupo IV (test II) → SF 0,9% no masseter.	2,5 U BTX-A. (0,05ml) Masseter; 28 dias após a administração de BTX-A.	<p>Em 15 ratos de cada grupo experimental e os 20 do grupo basal</p> <ul style="list-style-type: none"> • Medidas cefalométricas – Foto; <p>Em 5 ratos de cada grupo experimental</p> <ul style="list-style-type: none"> • Análise histológica. 	<ul style="list-style-type: none"> • Houve ≠ no peso corpóreo do Grupo III < II e IV; • Houve ≠ nas medidas mandibulares do grupo III < II e IV; • Não houve ≠ entre as medidas do grupo II e IV, exceto o comprimento condilar (P < 0,05); • Houve maior apoptose no grupo III em comparação com II e IV.

≠ → Diferença com significância estatística

DOM → Densidade óssea mandibular

5.3 Avaliação da qualidade

Nenhum Estudo Clínico Randomizado descreveu como foi feita a randomização da pesquisa, assim como não relataram métodos de ocultação da alocação, aleatoriedade do alojamento, cegamento dos pesquisadores e avaliadores quanto ao grupo teste e grupo controle.

O número de animais utilizados tanto no início quanto no final do ensaio e as características da linha de base animal foram descritos em todos os trabalhos.

Portanto, com base nos critérios estabelecidos pela ferramenta SYRCLE's, todos os estudos foram considerados com alto risco de viés. (Tabela 02)

	Geração de sequência de alocação (Selection bias)	Características da linha de base animal	Ocultação da alocação (Selection bias)	Alojamento aleatório (Performance bias)	Cegamento cuidadores e/ou pesquisadores (Performance bias)	Avaliação aleatória dos resultados (Detection bias)	Cegamento do avaliador dos resultados	Dados de resultados incompletos (Attrition bias)	Relatório de resultados seletivos (Reportion bias)	Outras fontes de viés
Tsai CY., et al. 2010. ²¹ (EP)	?	+	?	?	?	?	?	?	?	-
Tsai C., et al. 2011. ¹⁶ (ECR)	?	+	?	?	?	?	?	?	?	-
Park C., et al. 2015. ⁸ (ECR)	?	+	?	?	?	?	?	?	?	-
Dutra EH., et al. 2016. ² (EP)	?	+	?	+	?	?	?	?	?	-
Babuccu B. et., 2009. ²² (ECR)	?	+	?	+	?	?	?	?	?	-
Kün-Darbois JD. Et., 2015. ⁶ (ECR)	?	+	?	+	?	?	?	?	?	-
Kim JY, et al., 2008. ²² (ECR)	?	+	?	?	?	?	?	?	?	-

Tabela 02 - Análise qualitativa do risco de viés dos artigos incluídos.

? → Não foi informado pelos autores informações suficientes para este aspecto.

+ → O trabalho apresentou informações positivas quanto a este aspecto no desenvolvimento da pesquisa.

- → O trabalho apresentou informações negativas quanto a este aspecto no desenvolvimento da pesquisa.

5.4 Peso corpóreo e muscular

O peso corpóreo medido semanalmente foi avaliado pelos trabalhos 3, 6 e 7. Dois trabalhos (3 e 7) apresentaram diferença com significância estatística quanto ao peso dos ratos entre o grupo teste e o grupo controle ao final do período de acompanhamento. Contudo o trabalho 6 não encontrou diferença estatisticamente significativa referente a esta variável. (Tabela 03)

Quanto ao peso muscular medido após a eutanásia dos animais e dissecação do tecido muscular (Masseter e/ou Temporal), não foi identificada diferença com significância estatística entre os grupos que foram aplicados com toxina botulínica e os animais controle dos trabalhos 1, 2 e 5.

5.5 Mensurações cefalométricas

As mensurações de medidas lineares mandibulares foram estudadas em todos os trabalhos, exceto no estudo 2. Identificou-se diferença estatisticamente significativa entre as medidas lineares das mandíbulas que tiveram injeção da neurotoxina nos músculos estudados nos trabalhos 1, 3, 5, 6 e 7. O trabalho 4 não encontrou diferença no comprimento mandibular, porém revelou redução na largura condilar do grupo teste. (Tabela 03)

O trabalho 3 comparou também o lado controle do grupo teste e o grupo controle e não identificou diferença com relevância estatística. O trabalho 6 encontrou diferença das medidas entre lado controle e lado teste do grupo teste e não identificou diferença entre o lado controle do grupo teste e os dois lados do grupo controle.

O trabalho 7, além do grupo teste com BTX-A, utilizou também um grupo teste com aplicação de SF 0,9% e comparou com um grupo controle que não teve administração de substâncias. Não identificou diferença entre o grupo teste que foi injetado SF 0,9% e o grupo controle.

5.6 Densidade Óssea mandibular, Espessura da cortical óssea e Espessura do Trabeculado ósseo

Mensurou-se a DOM por meio da Densitometria óssea nos trabalhos 1 e 2 e com Micro-CT no trabalho 4. A diferença da espessura da cortical óssea entre os grupos teste e controle foi estudada nos trabalhos 1, 2 e 6 e a espessura do trabeculado ósseo foi analisada nos trabalhos 1, 4 e 6 com Micro-CT. (Tabela 03)

Não foi encontrado diferença na DOM após aplicação da BTX-A no trabalho 1, porém houve redução na DOM com significância estatística nos grupos que receberam neurotoxina nos músculos mastigatórios nos trabalhos 2 e 4.

A espessura da cortical dos pontos analisados da mandíbula apresentou uma redução com diferença estatística dos ratos estudados após administração da toxina botulínica nos trabalhos 1 e 2, contudo o trabalho 6 não apresentou diferença.

Os trabalhos 1, 4 e 6 encontraram redução estatisticamente significativa na espessura do trabeculado ósseo da mandíbula dos animais do grupo teste. Ademais o trabalho 4 encontrou aumento no espaçamento do trabeculado mandibular e o trabalho 6 não encontrou diferença entre o lado controle (esquerdo) do grupo BTX-A e o grupo controle.

Tabela 03 – Variáveis avaliadas por cada trabalho e a diferença estatística encontrada.

Variáveis	Trabalhos	Apresentaram ≠	Não apresentaram ≠
Peso corpóreo	3, 6, 7	3 e 7	6
Peso muscular	1, 2 e 5		1, 2 e 5
Mensurações cefalométricas	1, 3, 4, 5, 6 e 7	1, 3, 5, 6 e 7	4
Densidade óssea mandibular	1, 2 e 4	2 e 4	1
Espessura cortical óssea	1, 2 e 6	1 e 2	6
Espessura trabeculado ósseo	1, 4 e 6	1, 4 e 6	

≠ → Diferença com significância estatística

6 DISCUSSÃO

6.1 Modelo de estudo

Após busca e análise da literatura, identificamos que esta é a primeira revisão sistemática que avaliou alterações esqueléticas em ratos que foram submetidos a aplicação de neurotoxina botulínica em músculos mastigatórios. A metanálise não foi realizada porque os poucos estudos científicos (sete trabalhos) selecionados são heterogêneos, utilizaram metodologias diferentes, aplicaram doses distintas, com variados períodos de acompanhamento e analisaram variáveis diversas, o que dificulta a comparação e análise dos resultados.

Acreditamos que o animal selecionado para este tipo de avaliação tem influência nos resultados e o rato, por apresentar a sínfise mandibular não fusionada, possui vantagem nos trabalhos que são do tipo boca dividida, pois minimiza a influência que uma alteração de um lado tem sobre o segmento contralateral.²¹ Encontrou-se alterações ósseas diferentes nos lado teste e controle dos animais que receberam a toxina e o SF 0,9%, respectivamente.²⁰ Contudo, Tsai CY et al. (2011) não encontraram diferença na DOM entre o grupo que recebeu SF 0,9% bilateralmente e o grupo que teve boca dividida com SF 0,9% e a neurotoxina. Sugere-se a hipótese que haja um efeito compensatório da musculatura não paralisada, tornando a força mastigatória equivalente entre os grupos e não altera a DOM.

As diferentes espécies de ratos entre os estudos tornam a comparação prejudicada, pois os mesmos possuem peso, tamanho, volume muscular, hábitos alimentares, estruturas anatômicas e respostas fisiológicas diferentes. Os trabalhos selecionados utilizaram Sprague-Dawley, Long-Evans e Wistar, ratos com características diferentes e dificulta a equidade da comparação entre os estudos.

Além da diferença da posologia da toxina administrada entre as espécies e entre os estudos, o que pode influenciar no efeito do bloqueio neuromuscular e consequentemente nas alterações musculoesquelética dos animais.

Os trabalhos possuíam diluições diferentes da toxina empregada, variando o efeito da neurotoxina, podendo acarretar em paralisia muscular variada, o que pode interferir na intensidade das alterações musculoesqueléticas de cada pesquisa. Diferentes diluições foram empregadas nas pesquisas desta revisão e pode haver influência nos resultados dos trabalhos.

A mandíbula foi a estrutura escolhida, pois é o único osso do esqueleto craniomaxilofacial que sofre interferências diretamente de todos os músculos da mastigação, tanto do masseter como do temporal. Somado ao fato de que a maioria dos trabalhos utilizou estudos com a mandíbula.

Sabe-se que estudos experimentais, sobretudo os randomizados, abordam metodologias e análises difíceis de serem padronizadas. Apesar de todo o trabalho realizado pelos autores das pesquisas incluídas nesta revisão sistemática, nenhum artigo relatou o método de randomização e o cegamento do pesquisador e do avaliador, o que aumenta o risco de viés e reduz a força da evidência científica.

6.2 Toxina botulínica x Alterações musculares

Acredita-se que com a redução da contração dos músculos mastigatórios por meio da deservação muscular com BTX-A por longo período, pode prejudicar as funções gerais e provocar diminuição do peso corpóreo.³ O trabalho de Matthys T, et al., (2015) do tipo caso-controle realizado em coelhos que receberam neurotoxina e soro fisiológico não encontrou alteração no peso corpóreo entre os grupos. Este achado é semelhante ao encontrado no trabalho 6, contudo dois trabalhos (3 e 7) revelaram diferença com significância estatística do peso corporal após 28 dias da administração da neurotoxina quando comparado com o grupo controle.⁷

As injeções intramusculares com toxina botulínica A (BTX-A) levam a uma rápida diminuição da força de contração e uma lenta redução da massa muscular. O trabalho do tipo caso controle randomizado de Rauch F, Hamdy R (2006) com 12 coelhos que tiveram única aplicação de BTX-A e SF 0,9% nos músculos gastrocnêmios e quadríceps esquerdo apresentou déficit significativo (10%) na massa muscular gastrocnêmica do lado injetado com a neurotoxina após 5 semanas, enquanto que não foi encontrada diferença significativa no quadríceps do Grupo controle.¹⁷ Semelhante aos achados de Rafferty et al. (2012) que encontrou redução de 7% da massa muscular do masseter que foi injetado com a toxina botulínica ($p < 0,0001$) e não houve diferença entre o lado controle do grupo teste (sem aplicação de substâncias) e o grupo controle que foi injetado SF 0,9%.³

Contrário ao supracitado, nenhum dos trabalhos (1, 2 e 5) desta revisão que avaliou alteração do peso muscular encontrou diferença com significância estatística entre os grupos teste e grupos controle.

6.3 Toxina botulínica x Alterações esqueléticas

O estudo de Rafferty et al. (2012) fortalece a idéia de associação de paralisia do masseter e perda óssea na mandíbula e ratifica a evidência que a anatomia do osso craniano responde às mudanças no carregamento muscular.³ Este achado foi encontrado em 5 dos trabalhos analisados nesta revisão sistemática (1, 3, 5, 6 e 7). O trabalho 4 não encontrou diferença no comprimento mandibular, porém revelou redução na largura condilar do grupo teste.

Alterações esqueléticas, redução do volume, remodelação e perda óssea são achados como resposta à deservação induzida pela neurotoxina botulínica e acredita-se que geralmente haja uma maior repercussão em osso trabecular que no osso cortical.⁷ Dos 7 trabalhos analisados, 3 destes (1, 2 e 6) avaliaram as modificações corticais mandibulares, sendo que apenas 2 estudos (1 e 2) encontraram redução da cortical óssea nos animais que foram injetados com BTX-A. Para o osso medular, 3 pesquisas (1, 4, 6) incluídas nesta revisão sistemática identificaram com significância estatística, redução entre os animais do grupo teste.

A crista massetéica, bordo inferior do corpo da mandíbula (locais de inserção do músculo masseter) e o processo coronóide da mandíbula (área de inserção do músculo temporal) tiveram redução da estrutura óssea. Contudo a região média do corpo mandibular, que não apresenta inserção ou origem de músculos fortes, não demonstrou alterações esqueléticas com significância estatística.¹⁴ Estes resultados fortalecem a ideia que a redução do estímulo mecânico muscular proveniente do efeito da BTX-A provoca alterações dos ossos relacionados aos músculos injetados. Conceito contrário ao de Tsai CY et al. (2010) que afirmam presença de alteração óssea em pontos além das áreas de inserção e origem dos músculos mastigatórios, carregamento indireto.

A diminuição da contração muscular induzida pelo bloqueio da neurotoxina botulínica intensifica a redução da DMO. Estudo em animais com análise de tomografia computadorizada e da densitometria por dois avaliadores encontrou

redução da DOM após terapia com BTX-A, o que corrobora com os trabalhos 2 e 4 que encontraram uma diminuição significativa na DMO em mandíbulas, especialmente em torno dos locais de fixação dos músculos injetados, porém o trabalho 1 não encontrou o mesmo resultado.¹³

A utilização da toxina botulínica para transtornos da ATM, apertamento dentário e cefaléia tensional tem sido cada vez mais difundido pelos profissionais de saúde e aceito pelos pacientes com bons resultados imediatos no controle da dor e desconforto. Contudo, deve-se considerar que os poucos estudos em animais apontam para alterações óssea mandibulares após uso da neurotoxina e não se tem muitos estudos em humanos com populações representativas, acompanhamento longo dos casos e com métodos randomizados. Então, a indicação da administração da neurotoxina para os casos de distúrbios articulares e musculares, apertamento dentário, deve ser ponderada e o uso indiscriminado desta substância evitado. Sobretudo porque esta modalidade de tratamento utiliza doses relativamente altas quando comparado a quantidade administrada em casos de estética facial.

7 CONCLUSÃO

Estudos em ratos apontam para alterações esqueléticas e musculares após administração da BTX-A, mesmo um único uso, que pode resultar em perda óssea a curto e longo prazo das estruturas mandibulares e assim potencializar problemas futuros.

Mais Estudos Clínicos Controlados Randomizados, Revisões Sistemáticas e Metanálise devem ser realizados com animais e humanos para elucidar estas hipóteses relacionadas aos efeitos da BTX-A nas estruturas ósseas.

REFERÊNCIAS¹

- 1 - Nayyar P, Kumar P, Nayyar PV, Singh A. BOTOX: Broadening the Horizon of Dentistry. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(12):25-9.
- 2 - Dutra EH, O' Brien MH, Lima A, Kalajzic Z, Tadinada A, Nanda R, Yadav S. Cellular and Matrix Response of the Mandibular Condylar Cartilage to Botulinum Toxin. *PLoS One.* 2016;11(10).
- 3- Rafferty KL, Liu ZJ, Ye W, Navarrete AL, Nguyen TT, Salamati A, Herring SW. Botulinum toxin in masticatory muscles: short- and long-term effects on muscle, bone, and craniofacial function in adult rabbits. *Bone.* 2012;50(3):651-62.
- 4 - Dutta SR, Passi D, Singh M, Singh P, Sharma S, Sharma A. Botulinum toxin the poison that heals: A brief review. *Natl J Maxillofac Surg.* 2016;7(1):10-6.
- 5 – Archana MS. Toxin yet not toxic: Botulinum toxin in dentistry. *Saudi Dent J.* 2016;28(2):63-9.
- 6 – Kün-Darbois JD, Libouban H, Chappard D. Botulinum toxin in masticatory muscles of the adult rat induces bone loss at the condyle and alveolar regions of the mandible associated with a bone proliferation at a muscle enthesis. *Bone.* 2015;77:75-82.
- 7 – Matthys T, Ho Dang HA, Rafferty KL, Herring SW. Bone and cartilage changes in rabbit mandibular condyles after 1 injection of botulinum toxin. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2015;148(6):999-1009.
- 8 – Park C, Park K, Kim J. Growth effects of botulinum toxin type A injected unilaterally into the masseter muscle of developing rats. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2015;16(1):46-51.
- 9 – Moon YM, Kim MK, Kim SG, Kim TW. Apoptotic action of botulinum toxin on masseter muscle in rats: early and late changes in the expression of molecular markers. *Springerplus.* 2016;5(1):991.
- 10 – Ahn J, Horn C, Blitzer A. Botulinum toxin for masseter reduction in Asian patients. *Arch Facial Plast Surg.* 2004;6(3):188-91.
- 11 – Al-Wayli H. Treatment of chronic pain associated with nocturnal bruxism with botulinum toxin. A prospective and randomized clinical study. *J Clin Exp Dent.* 2017;9(1):112-7.
- 12 – Rao LB, Sangur R, Pradeep S. Application of Botulinum toxin type A: an arsenal in dentistry. *Indian J Dent Res.* 2011;22(3):440-5.

¹ Referências elaboradas conforme as normas e padrões Vancouver.

- 13 – Raphael KG, Tadinada A, Bradshaw JM, Janal MN, Sirois DA, Chan KC, Lurie AG. Osteopenic consequences of botulinum toxin injections in the masticatory muscles: a pilot study. *J Oral Rehabil.* 2014;41(8):555-63.
- 14 – Kim HS, Yun PY, Kim YK. A clinical evaluation of botulinum toxin-A injections in the temporomandibular disorder treatment. *Maxillofac Plast Reconstr Surg.* 2016;38(1):5.
- 15 – Tsai CY, Shyr YM, Chiu WC, Lee CM. Bone changes in the mandible following botulinum neurotoxin injections. *Eur J Orthod.* 2011;33(2):132-8.
- 16 – Jadhao VA, Lokhande N, Habbu SG, Sewane S, Dongare S, Goyal N. Efficacy of botulinum toxin in treating myofascial pain and occlusal force characteristics of masticatory muscles in bruxism. *Indian J Dent Res.* 2017;28(5):493-7.
- 17 - Rauch F, Hamdy R. Effect of a single botulinum toxin injection on bone development in growing rabbits. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2006;6(3):264-8.
- 18 – Chambrone L, Chambrone LA, Lima LA. Effects of occlusal overload on peri-implant tissue health: a systematic review of animal-model studies. *J Periodontol.* 2010;81(10):1367-78.
- 19 – Hooijmans CR1, Rovers MM, de Vries RB, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, Langendam MW. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res Methodol.* 2014;14:43.
- 20 – Tsai CY1, Huang RY, Lee CM, Hsiao WT, Yang LY. Morphologic and bony structural changes in the mandible after a unilateral injection of botulinum neurotoxin in adult rats. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68(5):1081-7.
- 21 - Babuccu B, Babuccu O, Yurdakan G, Ankarali H. The effect of the Botulinum toxin-A on craniofacial development: an experimental study. *Ann Plast Surg.* 2009;63(4):449-56.
- 22 – Kim JY, Kim ST, Cho SW, Jung HS, Park KT, Son HK. Growth effects of botulinum toxin type A injected into masseter muscle on a developing rat mandible. *Oral Dis.* 2008 Oct;14(7):626-32.

¹ Referências elaboradas conforme as normas e padrões Vancouver.

ANEXO - Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses

Seção/tópico	N. Item do checklist	Relatado na página nº
TÍTULO		
Título	1	Identifique o artigo como uma revisão sistemática, meta-análise, ou ambos.
RESUMO		
Resumo estruturado	2	Apresente um resumo estruturado incluindo, se aplicável: referencial teórico; objetivos; fonte de dados; critérios de elegibilidade; participantes e intervenções; avaliação do estudo e síntese dos métodos; resultados; limitações; conclusões e implicações dos achados principais; número de registro da revisão sistemática.
INTRODUÇÃO		
Racional	3	Descreva a justificativa da revisão no contexto do que já é conhecido.
Objetivos	4	Apresente uma afirmação explícita sobre as questões abordadas com referência a participantes, intervenções, comparações, resultados e delineamento dos estudos (PICOS).
MÉTODOS		
Protocolo e registro	5	Indique se existe um protocolo de revisão, se e onde pode ser acessado (ex. endereço eletrônico), e, se disponível, forneça informações sobre o registro da revisão, incluindo o número de registro.
Critérios de elegibilidade	6	Especifique características do estudo (ex.: PICOS, extensão do seguimento) e características dos relatos (ex. anos considerados, idioma, a situação da publicação) usadas como critérios de elegibilidade, apresentando justificativa.
Fontes de informação	7	Descreva todas as fontes de informação na busca (ex.: base de dados com datas de cobertura, contato com autores para identificação de estudos adicionais) e data da última busca.
Busca	8	Apresente a estratégia completa de busca eletrônica para pelo menos uma base de dados, incluindo os limites utilizados, de forma que possa ser repetida.
Seleção dos estudos	9	Apresente o processo de seleção dos estudos (isto é, rastreados, elegíveis, incluídos na revisão sistemática, e, se aplicável, incluídos na meta-análise).
Processo de coleta de dados	10	Descreva o método de extração de dados dos artigos (ex.: formulários piloto, de forma independente, em duplicata) e todos os processos para obtenção e confirmação de dados dos pesquisadores.
Lista dos dados	11	Liste e defina todas as variáveis obtidas dos dados (ex.: PICOS, fontes de financiamento) e quaisquer suposições ou simplificações realizadas.
Risco de viés em cada estudo	12	Descreva os métodos usados para avaliar o risco de viés em cada estudo (incluindo a especificação se foi feito no nível dos estudos ou dos resultados), e como esta informação foi usada na análise de dados.
Medidas de sumarização	13	Defina as principais medidas de sumarização dos resultados (ex.: risco relativo, diferença média).
Síntese dos resultados	14	Descreva os métodos de análise dos dados e combinação de resultados dos estudos, se realizados, incluindo medidas de consistência (por exemplo, I ²) para cada meta-análise.
Risco de viés entre estudos	15	Especifique qualquer avaliação do risco de viés que possa influenciar a evidência cumulativa (ex.: viés de publicação, relato seletivo nos estudos).
Análises adicionais	16	Descreva métodos de análise adicional (ex.: análise de sensibilidade ou análise de subgrupos, metarregressão), se realizados, indicando quais foram pré-especificados.
RESULTADOS		
Seleção de estudos	17	Apresente números dos estudos rastreados, avaliados para elegibilidade e incluídos na revisão, razões para exclusão em cada estágio, preferencialmente por meio de gráfico de fluxo.
Características dos estudos	18	Para cada estudo, apresente características para extração dos dados (ex.: tamanho do estudo, PICOS, período de acompanhamento) e apresente as citações.
Risco de viés em cada estudo	19	Apresente dados sobre o risco de viés em cada estudo e, se disponível, alguma avaliação em resultados (ver item 12).
Resultados de estudos individuais	20	Para todos os desfechos considerados (benéficos ou riscos), apresente para cada estudo: (a) sumário simples de dados para cada grupo de intervenção e (b) efeitos estimados e intervalos de confiança, preferencialmente por meio de gráficos de floresta.
Síntese dos resultados	21	Apresente resultados para cada meta-análise feita, incluindo intervalos de confiança e medidas de consistência.
Risco de viés entre estudos	22	Apresente resultados da avaliação de risco de viés entre os estudos (ver item 15).
Análises adicionais	23	Apresente resultados de análises adicionais, se realizadas (ex.: análise de sensibilidade ou subgrupos, metarregressão [ver item 16]).
DISCUSSÃO		
Sumário da evidência	24	Sumarize os resultados principais, incluindo a força de evidência para cada resultado; considere sua relevância para grupos-chave (ex.: profissionais da saúde, usuários e formuladores de políticas).
Limitações	25	Discuta limitações no nível dos estudos e dos desfechos (ex.: risco de viés) e no nível da revisão (ex.: obtenção incompleta de pesquisas identificadas, viés de relato).
Conclusões	26	Apresente a interpretação geral dos resultados no contexto de outras evidências e implicações para futuras pesquisas.
FINANCIAMENTO		
Financiamento	27	Descreva fontes de financiamento para a revisão sistemática e outros suportes (ex.: suprimento de dados); papel dos financiadores na revisão sistemática.

APÊNDICE 01 – Formulário de extração de dados baseado no trabalho:

Effects of occlusal overload on peri-implant tissue health: a systematic review of animal-model studies. Chambrone L, Chambrone LA, Lima LA.

Formulário de Extração dos Dados

Autores

Título

Citation and publication status

Location of trial

Private practice () University/hospital () Country:

I. Type of Study

1. Randomized experimental trial ()

2. Other () Estudo Prospectivo

II. Type of Participants (proceed below if Step I met inclusion criteria)

1. Animals – type:

2. Follow up period of:

III. Types of interventions (proceed below if Step I and II met inclusion criteria)

1. Active principle:

2. Posology:

3. Systemic () or Local ():

4. Amount and site of administration:

5. Sample size: Group control:

6. Group test:

7. Type of study: longitudinal () Cross-over () Split-mouth () Parallel ()

8. Systemic conditions:

IV. Types of outcome measures and quality assessment

Outcome measures, test/control groups: (*statistically significant)

Occurrence of adverse effects

1. Yes:

2. No:

3. Not mentioned:

Sample size calculation:

1. Yes:

2. No: ()

3. Unclear:

Method of randomization

1. Adequate:

2. Inadequate:

3. Unclear: ()

Which method? _____

Allocation concealment

1. Adequate

2. Inadequate

3. Unclear: ()

Which method? _____

Blindness of examiners:

1. Yes ()

2. No ()

3. Unclear ()

Blindness of operators:

1. Yes ()

2. No ()

3. Unclear ()

V. Completeness of the follow-up will be based in the following questions:

a. Was the number of subjects at baseline and at the completion of the follow-up period interval reported? Yes () No ()

b. All patients completed the follow up period? Yes () No () Unclear () If no answer item c)

c. Reasons for drop-outs _____

d. Number of test subjects at baseline: end of trial: ?

e. Number of control subjects at baseline: end of trial: ?

VI. Risk of bias:

(A) Low risk of bias (B) Moderate risk of bias (C) High risk of bias

Statistical analysis adequate:

1. Yes: ()

2. No

3. Not reported

Validity of conclusions

1. Adequate: ()

2. Inadequate:

Source of funding :

Conflict of interest:

Notes