

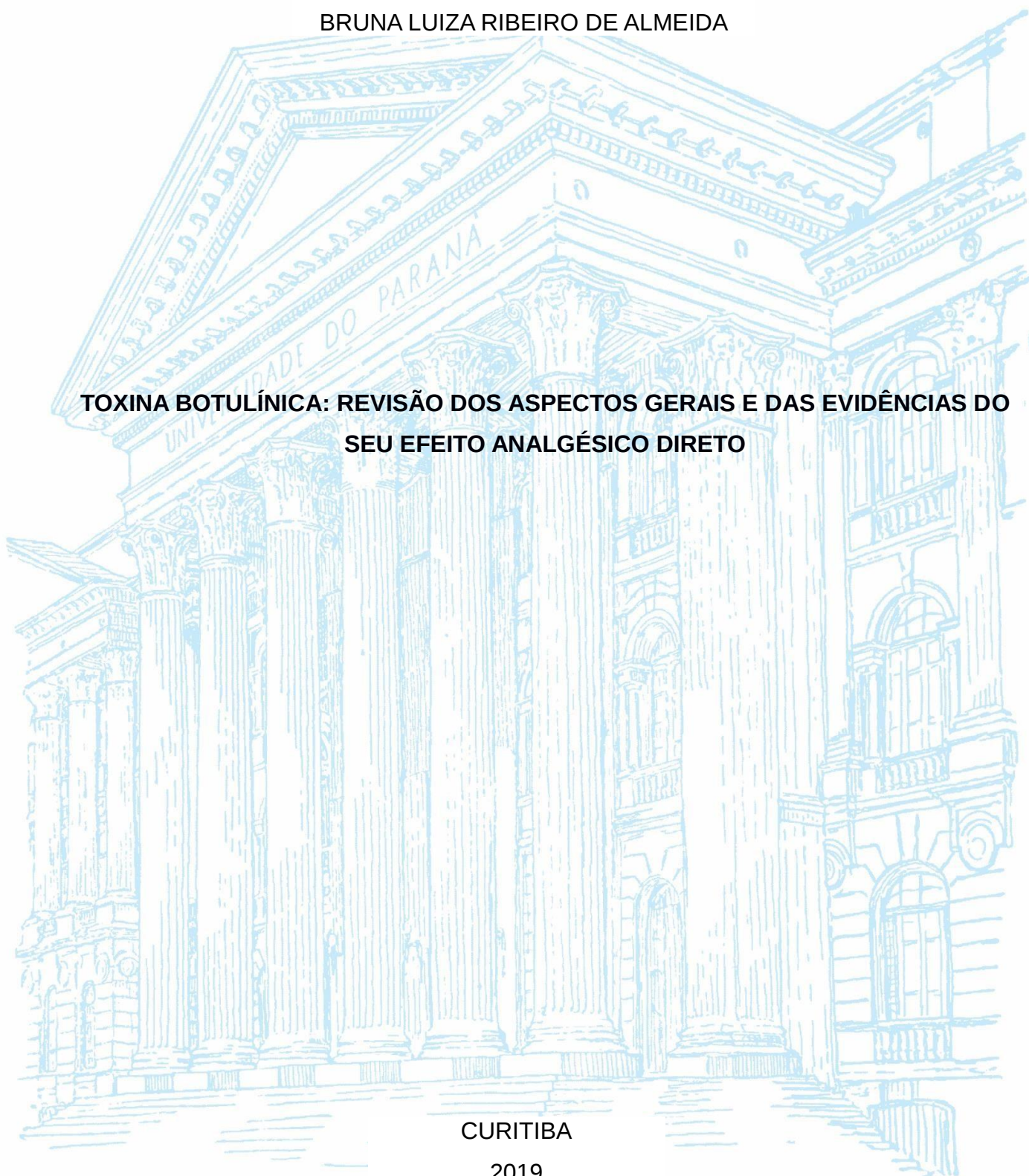
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA LUIZA RIBEIRO DE ALMEIDA

**TOXINA BOTULÍNICA: REVISÃO DOS ASPECTOS GERAIS E DAS EVIDÊNCIAS DO
SEU EFEITO ANALGÉSICO DIRETO**

CURITIBA

2019



BRUNA LUIZA RIBEIRO DE ALMEIDA

**TOXINA BOTULÍNICA: REVISÃO DOS ASPECTOS GERAIS E DAS EVIDÊNCIAS
DO SEU EFEITO ANALGÉSICO DIRETO**

Monografia apresentada à disciplina BMed006 - Trabalho de Conclusão de Curso II como requisito parcial à conclusão do Curso de Biomedicina, setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dra. Juliana Geremias Chichorro

CURITIBA

2019

RESUMO

As neurotoxinas botulínicas (BoNT) são toxinas produzidas por bactérias do gênero *Clostridium botulinum* e são consideradas as mais potentes toxinas da atualidade. Antes um veneno alimentar, mais tarde explorada como arma biológica e atualmente um ótimo recurso terapêutico. Já foram identificados sete sorotipos diferentes de BoNT (A-G). Dentre esses, os sorotipos A e B são utilizados na clínica, sendo que o sorotipo A é o mais empregado pela maior eficácia e segurança. A BoNT é amplamente conhecida e utilizada pelo seu uso estético, por meio de injeções intramusculares com o objetivo de atenuar rugas dinâmicas. Adicionalmente, tem sido empregada como terapia no tratamento do estrabismo, blefaroespasma, distonia cervical, hiperidrose, sialorréia, espasmo hemifacial, dentre muitas outras condições clínicas nas áreas de urologia, neurologia, oftalmologia, gastroenterologia e mais recentemente avaliada na psiquiatria. As BoNTs também vêm sendo estudadas visando um novo horizonte terapêutico: o tratamento da dor. Em algumas síndromes dolorosas que podem ser tratadas com a BoNT, o mecanismo de ação está relacionado com a inibição da contração muscular por meio da inibição da liberação de acetilcolina na junção neuromuscular. Esse efeito envolve uma ação seletiva da toxina em proteínas da família *SNARE* (*soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor*), que medeiam o processo de exocitose da acetilcolina. Além disso, apresenta efeito analgésico em algumas condições clínicas que não estão relacionadas com a contração muscular excessiva, como por exemplo, no tratamento da migrânea. Portanto, tem sido sugerido que a BoNT é capaz de induzir analgesia independente da inibição da contração muscular. Essas evidências têm estimulado o estudo da BoNT em outras condições dolorosas, tais como a neuralgia do trigêmeo. Uma das vantagens da aplicação clínica da BoNT é sua segurança. Os principais efeitos adversos estão relacionados com a aplicação e incluem dor, eritema, prurido, edema, parestesia e ptose. Nessa revisão a BoNT será analisada nos aspectos histórico, farmacológico, bioquímico e clínico, porém o foco será na investigação do efeito analgésico da BoNT que ocorre independentemente do seu efeito relaxante muscular.

Palavras-chave: BoNT. Dor. Analgesia. Acetilcolina. SNARE.

ABSTRACT

Botulinum neurotoxins (BoNT) are toxins produced by bacteria of the genus *Clostridium botulinum* and are considered as the most potent toxins nowadays. Firstly, known as a food poison, later explored as a biological weapon and currently considered a great therapeutic resource. Seven different BoNT serotypes (A-G) have already been identified. Among them, serotypes A and B are used in clinics, and serotype A is the most used for the highest efficacy and safety. BoNT is widely known and used in aesthetics, through intramuscular injections to attenuate dynamic wrinkles. Additionally, it has been used as therapy in the treatment of strabismus, blepharospasm, cervical dystonia, hyperhidrosis, sialorrhea, hemifacial spasm, and many other clinical conditions in areas such as urology, neurology, ophthalmology, gastroenterology and more recently evaluated in psychiatry. BoNTs are also being studied for a new therapeutic horizon: the treatment of pain. In some painful syndromes that can be treated with BoNT, the mechanism of action is related to the inhibition of muscle contraction through inhibition of acetylcholine release at the neuromuscular junction. This effect involves a selective toxin action on SNARE family proteins (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor), which mediate the acetylcholine exocytosis process. Moreover, it shows analgesic effect in some clinical conditions that are not related to excessive muscle contraction, such as in the treatment of migraine. Therefore, it has been suggested that BoNT is capable of producing analgesia independent of muscle contraction inhibition. This evidence has stimulated the study of BoNT in other painful conditions, such as trigeminal neuralgia. One of the advantages of BoNT clinical application is its safety. Major adverse effects are application-related and include pain, erythema, pruritus, edema, bruising, hematoma, paraesthesia, and ptosis. In this review BoNT will be analyzed in the historical, pharmacological, biochemical and clinical aspects, but the focus will be on the investigation of the analgesic effect of BoNT that occurs regardless of its muscle relaxant effect.

Keywords: BoNT. Pain. Analgesia. Acetylcholine. SNARE.

“O aumento do conhecimento é como uma esfera dilatando-se no espaço: quanto maior a nossa compreensão, maior o nosso contato com o desconhecido.”

Blaise Pascal

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, pelo amor incondicional e por estar presente, sem hesitar, sempre que precisei dela.

A Deus.

Ao meu pai, meu ídolo. Que não pode estar comigo em vida, mas vive no meu coração. Meu exemplo garra e de gana. Me esforço a cada dia para honrar seu sangue.

Ao Ricardo, meu amor. Pelo suporte emocional, pelo auxílio em todas as vezes que precisei, pelas matérias e trabalhos que me auxiliou, pelos conteúdos que me ensinou, um verdadeiro professor.

Às amigas, Rafaela Santa Clara, Vivian Monteiro e Isadora Andrade, pelo suporte emocional, pelos resumos, pela compreensão e empatia inenarráveis. Mulheres fortes que marcaram minha companhia nessa jornada.

À minha orientadora, que exerceu tal função com tamanha maestria. Obrigada Prof.^a. Dr^a. Juliana Chichorro pela dedicação e empenho comigo nesse ano. Pela confiança creditada e pelas críticas construtivas.

A todos os Professores devotos, humanos, parceiros e éticos que contribuíram para minha formação.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ASPECTOS HISTÓRICOS E EVOLUÇÃO TEMPORAL DO USO DA TOXINA BOTULÍNICA.....	14
FIGURA 2 - MODELO ESQUEMÁTICO DO MECANISMO DE AÇÃO DAS NEUROTOXINAS BOTULÍNICAS (BoNT's).....	19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	- Acetilcolina
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATM	- Articulação Temporomandibular
BoNT	- Neurotoxina botulínica
BoNT/A	- Neurotoxina Botulínica Tipo A
BoNT/B	- Neurotoxina Botulínica Tipo B
FDA	- Food and Drug Administration
JNM	- Junção neuromuscular
kDa	- Kilodalton
NAP's	- "Neurotoxin associated proteins" – Proteínas associadas à neurotoxina
SP	- Substância P
SNAP-25	- "Synaptosome associated protein of 25 kDa" - Proteína Associada à Sinaptossoma de 25 kDa.
SNARE	- "Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor- "SNAP receptors," - Receptores para SNAP
U	- Unidade
VAMP	- Vesicle's associated membrane protein – Proteína de membrana associada à vesícula, também chamada de sinaptobrevina

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	8
1 INTRODUÇÃO	10
2 TOXINA BOTULÍNICA: DO VENENO MAIS POTENTE AO USO CLÍNICO ..	11
2.1 HISTÓRICO.....	11
2.2 INDICAÇÕES TERAPÊUTICAS.....	13
3 ASPECTOS FARMACOCINÉTICOS E FARMACODINÂMICOS	14
3.1. Farmacocinética.....	14
3.2 Duração da Ação e Restauração da Fisiologia Normal	15
3.3 Interações medicamentosas.....	15
3.4 Farmacodinâmica.....	16
3.4.1 Estrutura do Complexo BoNT/A	16
3.5 Evidências do Efeito Analgésico da BoNT/A	18
4 EFEITOS ADVERSOS	22
5 CONTRAINDICAÇÕES	22
6 ANTIGENICIDADE, IMUNOGENICIDADE E TOLERÂNCIA	22
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1 INTRODUÇÃO

A toxina botulínica é uma neurotoxina extraída da fermentação de bactérias do gênero *Clostridium botulinum*, bactéria anaeróbica gram-positiva, esporulada, em forma de bastonete. Essa bactéria se apresenta em sete sorotipos (A, B, C, D, E, F e G) (SILVA, 2011), originando 8 tipos de toxina diferentes (A, B, C1, C2, D, E, F, e G), as quais são liberadas com a lise destas bactérias (BALI e THAKUR, 2005). Os sorotipos A e B são comercialmente mais importantes, sendo o sorotipo A o mais utilizado. Estudos a respeito dos demais sorotipos estão em desenvolvimento (TING e FREIMAN, 2004; COLHADO et al., 2009).

A neuroespecificidade e a toxicidade das neurotoxinas botulínicas (BoNT's) as tornam como potencial arma biológica (ARNON, 2001). Estima-se que apenas 1g de BoNT aerolizada poderia levar a morte de mais de 1,5 milhão de pessoas (MCNALLY et al., 1994). A BoNT é absorvida pelas mucosas com facilidade e é resistente à ação de enzimas digestivas, devido ao seu peso alto molecular (150.000 daltons), tornando-a, assim, um veneno alimentar altamente perigoso (BALI e THAKUR, 2005). Felizmente, existem algumas limitações para o seu emprego no bioterrorismo, tais como o fato de ser inativada com facilidade pelo saneamento básico, não ser transmissível, possuir dose letal variável conforme o indivíduo, e ser destruída com aquecimento a 80 graus (SILVA, 2011; TING e FREIMAN, 2004).

Embora o *Clostridium botulinum* e suas toxinas tenham sido estudados por centenas de anos, a pesquisa continua até hoje para entender mecanismos de ação e para encontrar mais aplicações na medicina. A primeira aplicação clínica de BoNT foi em 1981 para o tratamento do estrabismo pelo oftalmologista Dr. Alan B. Scott (PANICKER e MUTHANE, 2003). Atualmente a BoNT tem sido empregada para fins estéticos, como em linhas de expressão faciais hipercinéticas ("rugos de movimento") e não estéticos, incluindo estrabismo, bruxismo, hiperidrose, espasticidade, distonia cervical, neuralgia do trigêmeo, sialorréia, disfunção da articulação temporomandibular (ATM), dor miofacial, dor lombar, migrânea, cefaleia, dor neuropática, oscilopsia (estado de visão em que os objetos parecem oscilar para frente e para trás). Embora para várias dessas condições o uso da BoNT já tenha sido aprovado pelas agências regulatórias, em muitas outras o seu uso é feito *off-*

label. Existem evidências crescentes do seu potencial analgésico em inúmeras condições clínicas, que será o foco dessa revisão.

2. TOXINA BOTULÍNICA: DO VENENO MAIS POTENTE AO USO CLÍNICO

2.1 HISTÓRICO

A história da BoNT pode ser traçada a partir de 1817 quando o médico alemão Justinus Kerner publica a primeira descrição do botulismo, (DRESSLER et al., 2005) uma forma rara de intoxicação alimentar causada pela ingestão de alimentos mal conservados (LANG, 2004). Kerner, concluiu que o agente que causava a doença se desenvolvia em salsichas defumadas, e em vista disso, a designou de botulismo, pois em latim *Botulus* significa salsicha (PANICKER e MUTHANE, 2003).

Em 1895, Emile Pierre Marie van Ermengem, microbiologista estudante de Koch, também microbiologista, associou o *Clostridium botulinum* com a causa do botulismo (PANICKER e MUTHANE, 2003).

O botulismo é uma doença que causa paralisia devido à neurotoxina produzida pela bactéria *Clostridium botulinum*. Existem até sete tipos de botulismo, diferenciados pelo antígeno da neurotoxina produzida (DOWELL, 1984). Os tipos A, B e E são mais frequentemente envolvidos no botulismo humano presentes no solo e nos sedimentos aquáticos (DOWELL, 1984; TING e FREIMAN, 2004). A doença apresenta-se como uma paralisia descendente simétrica e são observados sintomas como diplopia, disartria, distonia, disfagia, paralisia respiratória e comprometimento dos nervos cranianos (BALI e THAKUR, 2005).

Existem quatro principais formas de botulismo humano: botulismo infantil, botulismo de origem alimentar, botulismo de ferida e botulismo de toxemia intestinal em adultos. Há também relatos de casos de botulismos inalatórios bem como botulismo iatrogênico (após a injeção cosmética ou terapêutica de BoNT), mas estes são extremamente raros (SOBEL, 2005).

Já na época da sua descoberta, Kerner especulou que doses mínimas da substância causadora da doença poderiam ter uma gama de potenciais usos

terapêuticos no tratamento de doenças do sistema neuromuscular (LANG, 2004; SILVA, 2011; PANICKER e MUTHANE, 2003).

Em 1920, o Dr. Herman Sommer e sua equipe, na Universidade da Califórnia, obtiveram um concentrado de BoNT do tipo A (BoNT/A) (SILVA, 2011). Entretanto, foi só no período da segunda guerra mundial que a BoNT foi amplamente estudada. A Academia de Ciências dos EUA criou um laboratório chamado Fort Detrick, em Maryland, para a investigação de novas armas biológicas (SCHANTZ e JOHNSON 1997; TING e FREIMAN, 2004). Em 1946, pesquisadores de Fort Detrick obtiveram uma forma cristalina de BoNT/A e o método foi posteriormente usado pelo Dr. Edward Schantz para produzir BoNT para uso humano (SCHANTZ e JOHNSON, 1997; TING e FREIMAN, 2004). O projeto de estudar o potencial da BoNT como arma biológica foi abandonado pois os macacos, utilizados como cobaias nos testes, se mostraram imunes à toxina, não permitindo a evolução desta investigação. Ainda hoje se discute a imunidade destes animais à BoNT (SILVA, 2011).

Em 1972, o Presidente Nixon assina a Convenção das Armas Biológicas e Tóxicas, responsável pelo encerramento da investigação de agentes biológicos que tinham como fim uma utilização bélica. Desta forma, Fort Detrick foi formalmente fechado nesse mesmo ano. A investigação do uso da BoNT foi continuada pela Universidade de Wisconsin, sob coordenação de Edward Schantz (SCHANTZ e JOHNSON, 1997).

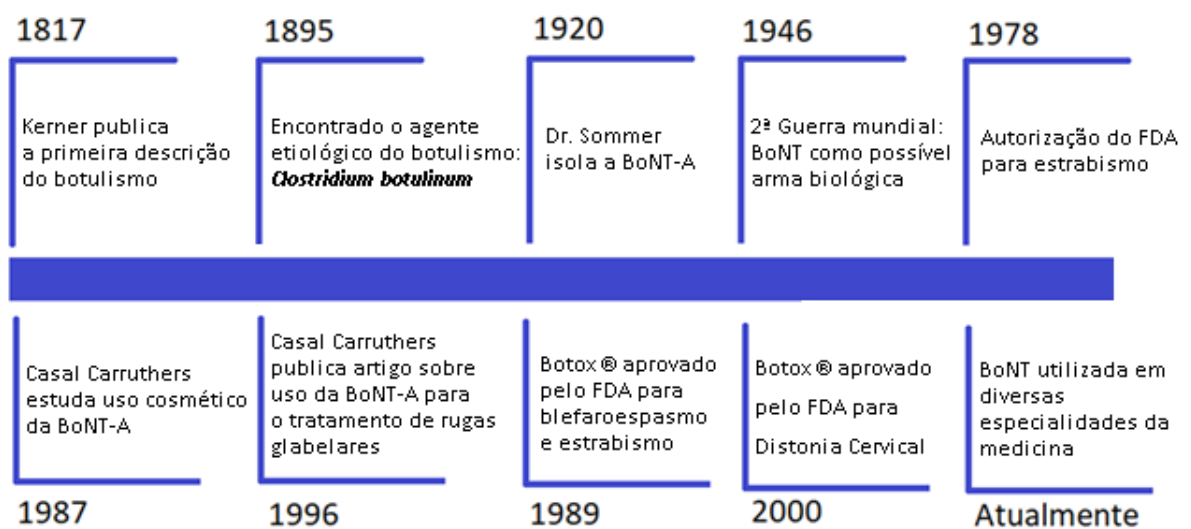
Em 1978, Alan Scott conduziu os primeiros testes com a BoNT/A para o tratamento de estrabismo em humanos (LANG, 2004). Em 1987, Jean Carruthers, oftalmologista, ao usar a toxina para tratamento do blefaroespasma notou melhora nas rugas de expressão. Depois desta descoberta, ela e seu marido dermatologista, promoveram o uso cosmético da toxina, e em 1996, publicaram um artigo sobre o assunto (SILVA, 2011).

A primeira marca comercial de BoNT aprovada foi o BOTOX® em 1989 pelo FDA para o tratamento de blefaroespasma e estrabismo. Em 2000 o BOTOX® foi aprovado pelo FDA para o tratamento da distonia cervical, síndrome caracterizada por contrações dolorosas e involuntárias dos músculos do pescoço (LANG, 2004). Na última década a BoNT é indicada para o tratamento do estrabismo, blefaroespasma, distonia cervical, espasmo hemifacial, espasticidade muscular, linhas faciais hiperkinéticas, hiperidrose (focal, palmar e axilar), incontinência urinária

causada por hiperatividade neurogênica do músculo detrusor da bexiga, bexiga hiperativa e profilaxia de migrânea crônica em adultos (BOTOX®: Bula).

A figura abaixo apresenta os principais eventos associados à descoberta e à introdução da BoNT na clínica médica, bem como a evolução do seu uso até os dias atuais.

FIGURA 1: ASPECTOS HISTÓRICOS E EVOLUÇÃO TEMPORAL DO USO DA TOXINA BOTULÍNICA (BONT)



2.2 INDICAÇÕES TERAPÊUTICAS

Atualmente, estão disponíveis para comercialização várias marcas de BoNT/A, tais como: Botox®, Botulin®, Botulift®, Prosigne®, Dysport® e Xeomim®, bem como, em alguns países já está disponível uma BoNT do tipo B (BoNT/B) para uso terapêutico, Myobloc®. É importante ressaltar que na prática clínica, essas formulações não são intercambiáveis, devido às características específicas de cada uma (KUKREJA e SINGH, 2015). Cada BoNT é aprovada para indicações específicas, para qual seu uso foi avaliado. De maneira geral, tem sido empregada em diferentes áreas da medicina incluindo oftalmologia, neurologia, dermatologia, ginecologia, urologia, otorrinolaringologia e também na odontologia.

A BoNT tem seu uso aprovado para tratamento do estrabismo, blefaroespasma, distonia cervical, espasticidade muscular, espasmo hemifacial, (NEY e JOSEPH, 2007), tratamento de linhas faciais hiperkinéticas (BALI e

THAKUR, 2005), hiperidrose focal palmar e axilar, incontinência urinária causada por hiperatividade neurogênica do músculo detrusor da bexiga e profilaxia de migrânea crônica em adultos (BOTOX®: Bula). Há outros casos em que seu uso ainda não foi aprovado, mas está sendo avaliado e apresenta evidências científicas de eficácia: sialorréia, cefaleia tensional, dor lombar, disfonia espasmódica, disfunção da ATM e vaginismo (NEY e JOSEPH, 2007), hiperplasia benigna da próstata e dor miofacial (MARQUES, 2014).

Atualmente, a migrânea crônica permanece a única indicação relacionada à dor aprovada para tratamento com BoNT. Até o ano 2000 apenas cinco estudos haviam sido publicados a respeito da BoNT/A no tratamento da migrânea, no entanto, mostraram um bom e consistente nível de evidência de sua eficácia. Estes estudos observaram diminuição da intensidade dos episódios e da frequência de migrânea, cefaleia tipo tensão e outros tipos de cefaleia (SILBERSTEIN et al., 2006).

Tendo em vista essas considerações, o objetivo desse estudo é revisar os aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos da BoNT e discutir os mecanismos relacionados ao seu efeito analgésico.

3 ASPECTOS FARMACOCINÉTICOS E FARMACODINÂMICOS

3.1. FARMACOCINÉTICA

Estudos farmacocinéticos sobre a BoNT são escassos, principalmente pela dificuldade de detectar suas concentrações plasmáticas após administração de doses terapêuticas (WEINKERS, 1984; GRACIES et al., 2009). Após injeções locais em tecidos como o músculo, derme ou tecido subcutâneo, a BoNT/A se liga à membrana neuronal e entra nos neurônios, enquanto a fração não ligada provavelmente é diluída na circulação linfática e levada para longe dos locais de injeção, sendo incapaz de afetar terminações neuronais mais distantes devido às baixíssimas concentrações (PIRAZZINI et al., 2017).

O curso temporal da entrada de BoNT / A nos neurônios periféricos in vivo foi caracterizado e descrito apenas para doses não terapêuticas (SIMPSON, 2013).

3.2 DURAÇÃO DA AÇÃO E RESTAURAÇÃO DA FISIOLOGIA NORMAL

A ação da BoNT no músculo estriado esquelético tem seu início em alguns dias (2 a 5 dias) se estendendo até duas semanas. Uma vez instalado, o efeito perdura por seis semanas a seis meses (em média de três a quatro meses). Durante o período de efeito mais intenso, por meio de exame histológico, observa-se atrofia muscular e alteração das fibras (DRESSLER e CHANÁ, 2002; UNNO et al., 2005). Após dois a três meses, sua ação começa a diminuir gradativamente. A reversão da paralisia local ocorre por dois mecanismos: 1) Através do “brotamento” neural, em que se tem a neoformação de brotos axonais, com a reinervação muscular temporária e, 2) Através da regeneração das proteínas de acoplamento das vesículas de acetilcolina (complexo SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor*)) (CARDOSO, 2003). A via metabólica da BoNT não está devidamente documentada, porém pode ser explicada pela presença de proteases que ocasionam a degradação de suas cadeias polipeptídicas.

3.3 INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS

Várias drogas que atuam na JNM podem interferir com o efeito da BoNT. Os antibióticos aminoglicosídeos podem potencializar os efeitos da BoNT (CARRUTHERS, 1996; PANICKER e MUTHANE, 2003). Grandes doses destes antibióticos, como a Canamicina, Estreptomicina e Gentamicina podem impedir a liberação de acetilcolina nas terminações nervosas e produzir uma síndrome semelhante ao Botulismo (HUANG et al., 2000).

O uso de relaxantes musculares deve ser feito com cautela, recomendando-se redução da dose inicial do relaxante, ou utilização de drogas de ação intermediária como o vecurônio, em vez dos relaxantes musculares de ação mais prolongada (BOTOX®: Bula).

A D-penicilamina pode desencadear a formação de anticorpos contra os receptores da acetilcolina em indivíduos imunologicamente predispostos (HUANG et al., 2000). Antagonistas do cálcio podem desativar o efeito da BoNT (PANICKER e MUTHANE, 2003). As Aminoquinolinas (como cloroquina e hidroxicloroquina) agem

na membrana celular inibindo a ligação e internalização da BoNT (HUANG et al., 2000).

3.4 FARMACODINÂMICA

3.4.1 Estrutura do complexo BoNT/A

A BoNT é formada por uma cadeia pesada (100 kDa), responsável principalmente pela sua internalização no terminal nervoso, e uma cadeia leve (50 kDa), que possui atividade catalítica (TEHRAN e PIRAZZINI, 2018). Uma vez que a BoNT é injetada em um tecido, sua cadeia pesada liga-se à glicoproteínas de vesícula, e através dessa ligação vai ocorrer a endocitose da neurotoxina para o terminal nervoso motor. Essa especificidade ao local de ligação garante alta seletividade da BoNT para as sinapses colinérgicas (DRESSLER et al., 2005). Depois de internalizada, o pH ácido da vesícula sináptica favorece a liberação da cadeia leve para o citosol, onde ela irá interferir com o processo de exocitose de Acetilcolina (ACh) (PIRAZZINI et al., 2017) (Figura 1).

Várias proteínas participam do processo de fusão da vesícula sináptica com a membrana pré-sináptica em resposta ao influxo de íons cálcio, que irá culminar na exocitose. Estão envolvidas nesse processo proteínas presentes na membrana da vesícula sináptica (VAMP e Sinaptobrevina), bem como proteínas presentes na membrana da terminação nervosa (SNAP25 e Sintaxina). A interação dessas proteínas para levar a fusão das membranas é chamada de complexo SNARE (ROSSETTO et al., 2014).

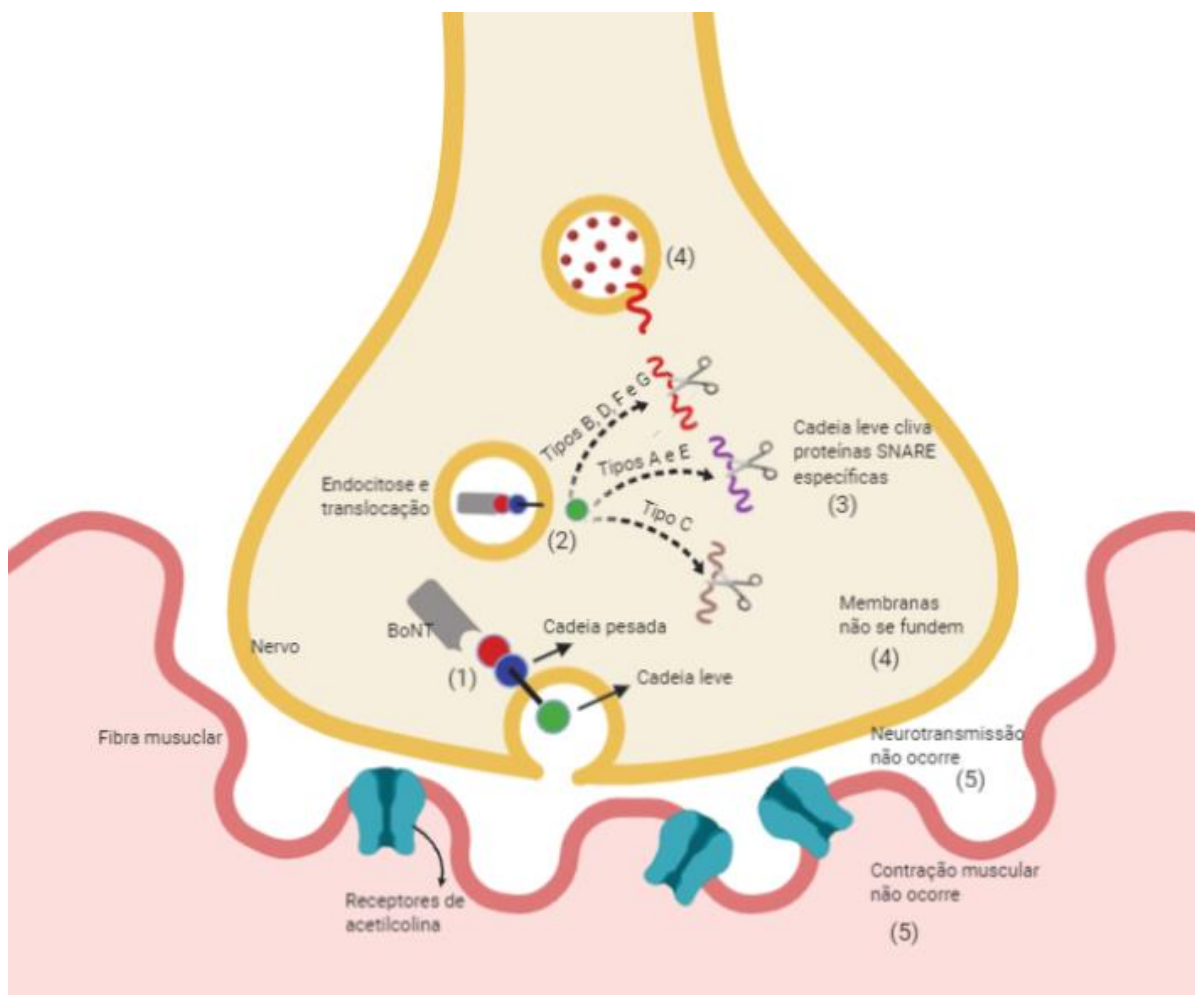
A cadeia leve da BoNT atua como uma protease, interrompendo a exocitose de ACh através da clivagem de três proteínas diferentes do complexo de fusão sináptica. As proteínas alvo variam entre os sorotipos de BoNT. Os sorotipos de BoNT A e E clivam SNAP-25, enquanto que os sorotipos B, D F e G clivam a VAMP, tendo como alvo diferentes peptídeos. Já o sorotipo C pode clivar tanto a Sintaxina quanto a SNAP25 (DRESSLER et al., 2005; DEMBEK et al., 2007; PIRAZZINI et al., 2017).

A clivagem proteolítica do complexo SNARE evita a ancoragem da vesícula de ACh na superfície interna da membrana celular e resulta em bloqueio da fusão

das vesículas (Figura 1). A inibição da liberação de ACh resulta em inibição da contração muscular, quando o tecido alvo é um músculo, bem como bloqueio da estimulação autonômica colinérgica, quando o tecido alvo recebe inervação parassimpática. Para que ocorra o término do efeito de BoNT é necessária a restauração ou *turnover* do complexo de proteínas SNARE (DRESSLER et al., 2005).

A figura a seguir ilustra o mecanismo de ação da BoNT na junção neuromuscular:

FIGURA 2: MODELO ESQUEMÁTICO DO MECANISMO DE AÇÃO DAS NEUROTOXINAS BOTULÍNICAS (BoNT's)



NOTA: A toxina botulínica (BoNT) é internalizada (1) através da interação da cadeia pesada com proteínas de vesícula da terminação colinérgica. Na figura está representada a sinapse entre o terminal nervoso de um neurônio motor e um músculo estriado esquelético. Na junção neuromuscular (JNM), a acetilcolina (ACh) é liberada e se liga ao receptor colinérgico nicotínico, o que resulta na despolarização da membrana plasmática muscular, levando ao influxo de íons cálcio e à contração muscular. (ROSSETTO et al., 2014). Uma vez que a BoNT é injetada no tecido, sua cadeia pesada liga-se a proteínas de membrana de vesícula e corre sua endocitose para o terminal nervoso motor.

Depois de internalizada, o pH ácido da vesícula sináptica favorece a translocação da cadeia leve para o citosol (2). No citosol, a cadeia leve cliva proteínas do complexo SNARE (3) (proteínas que participam da fusão da vesícula sináptica com a membrana pré-sináptica, ocasionando exocitose de ACh). As proteínas alvo variam de acordo com os sorotipos de BoNT. Os sorotipos de BoNT A e E clivam SNAP-25, enquanto que os sorotipos B, D F e G clivam a VAMP, e o sorotipo C pode clivar tanto a Sintaxina quanto a SNAP-25. (DRESSLER et al., 2005; DEMBEK et al., 2007; PIRAZZINI et al., 2017). Com a clivagem das proteínas SNARE, as membranas da vesícula de ACh e da terminação não se fundem (4), e a neurotransmissão e a contração muscular não ocorrem (5).

3.5. EVIDÊNCIAS DO EFEITO ANALGÉSICO DA BONT/A

A dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável que reduz substancialmente a qualidade de vida. O filósofo René Descartes descreveu a dor como uma sensação que vai da pele ao cérebro. Em certas condições, a dor se torna uma doença em si. Avanços recentes estão desenvolvendo o conceito de que a dor envolve células imunes, células da glia e astrócitos, que formam uma rede integrada com circuitos neuronais para modular a dor (KUMAR, 2018).

O tratamento da dor apresenta-se como um novo horizonte terapêutico para o uso da BoNT, pois ao impedir a contração da musculatura, interrompe o ciclo espasmo-dor. Inicialmente, o efeito analgésico nos distúrbios neuromusculares e nas dores musculoesqueléticas foi atribuído inicialmente apenas ao efeito relaxante muscular. Entretanto, estudos mostram que a BoNT foi capaz de produzir analgesia em modelos animais de dor não muscular e em condições dolorosas não musculares em humanos, sugerindo novos mecanismos de ação e novas indicações terapêuticas para a BoNT na dor (CUI et al., 2004).

Segundo Colhado et al. (2009) acredita-se que a BoNT tenha quatro modos principais de atuação na dor:

- Vias diretas:

1) Normalização da hiperatividade muscular: Diminuindo a atividade contrátil do músculo devido à hiperatividade ou sensibilização do nociceptor (KUMAR, 2018). No entanto, essa teoria não explica por que o alívio da dor com a BoNT pode ocorrer antes do relaxamento muscular (GÖBEL et al., 2001; ARCHANA, 2016).

2) Normalização da excessiva atividade do fuso muscular: A BoNT pode inibir as fibras musculares extrafusais e normalizar níveis excessivos de atividade do fuso muscular (ROSALES et al., 1996; GÖBEL et al., 2001). A liberação excessiva de ACh na junção neuromuscular leva a níveis altos de atividade da placa terminal, resultando em contração muscular extrafusar. A BoNT inibe a transmissão de neurotransmissores nos gama-neurônios no fuso muscular e diminui atividade muscular (ARCHANA, 2016).

- Vias indiretas:

3) Inibição da liberação dos neuropeptídeos pelos nociceptores: Diversos estudos pré-clínicos reforçam a hipótese de que a BoNT pode interferir com a inflamação neurogênica, isto é, impede a liberação de neurotransmissores sensoriais das terminações nervosas periféricas. Foi demonstrado que a BoNT/A bloqueia a liberação de peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e substância P (SP) (PURKISS, et al., 2000; DURHAM, et al, 2004; COLHADO et al., 2009; ARCHANA, 2016), sugerindo que a liberação sensorial de neuropeptídeos depende do complexo SNARE.

Segundo RANOUX e colaboradores (2008), a inibição da inflamação neurogênica pela BoNT é responsável pelo seu efeito analgésico direto em pacientes com dor crônica neuropática. Outros estudos em pacientes com dor crônica tem indicado como vantagens da BoNT em relação a outros fármacos, o efeito após uma única aplicação e o perfil de segurança (ATTAL et al., 2016). Portanto, tem sido considerado que sua eficácia em certas condições de dor resistentes à terapia é de especial importância (MATAK et al., 2019).

Através de sua capacidade de interferir com o processo de exocitose, também tem sido demonstrado que a BoNT/A inibe a liberação de somatostatina, serotonina, bradicinina, glutamato, noradrenalina, trifosfato de adenosina (ATP), dentre outros mediadores. Considerando que vários destes mediadores tem papel bem estabelecido na transmissão nociceptiva, possivelmente esse mecanismo pode contribuir para o efeito analgésico da BoNT em diferentes condições dolorosas. Entretanto, são necessários estudos adicionais para avaliar a relevância desse mecanismo (NAKOV et al., 1989; MCMAHON et al., 1992; PIRAZZINI et al., 2007; KUMAR, 2018).

Nesse sentido, é importante ressaltar o efeito de BoNT na liberação de CGRP e sua relação com o efeito analgésico da toxina. O CGRP é considerado um dos mediadores-chaves da migrânea e recentemente se tornou alvo de novas terapias para essa condição (para revisão ver EDVINSSON et al., 2018). O fato da BoNT ser capaz de inibir a liberação de CGRP pode explicar sua eficácia na enxaqueca crônica, que foi demonstrada em dois grandes ensaios clínicos controlados e randomizados. Os resultados desses estudos favoreceram a aprovação do Botox® para essa indicação em 2011 (DODICK et al., 2010).

O potencial da BoNT em reduzir a inflamação neurogênica parece contribuir também para o seu efeito anti-inflamatório, evidenciado em alguns estudos. CUI et al. (2004) mostraram que a BoNT/A reduziu o edema e o comportamento nociceptivo dos animais após injeção de formalina na pata. O efeito anti-inflamatório foi demonstrado ser independente da inibição da contração muscular, e envolveu a inibição da liberação de glutamato e neuropeptídeos pelas fibras de dor (CUI, et al., 2004). Esses dados foram corroborados por achados de outros grupos, que tem mostrado uma ação analgésica direta de BoNT, promovida pela inibição da liberação dos neuropeptídeos (CGRP e SP) e de glutamato dos nociceptores (COLHADO et al., 2009; CHUANG, et al. 2008; CHUANG, et al. 2009).

4) Fluxo neuronal retrógrado para o SNC: A BoNT não pode atingir o Sistema Nervoso Central (SNC) por difusão, pois não atravessa a barreira hematoencefálica. No entanto, alguns estudos têm demonstrado o transporte retrógrado da BoNT da periferia para o SNC. Nesse sentido, é importante citar o estudo de Favre-Guilmard e colaboradores (2017), que demonstraram que a injeção unilateral de BoNT era capaz de causar analgesia bilateral (em ambas as patas dos animais) em modelos de dor inflamatória e neuropática. Esse grupo tem demonstrado o transporte axonal retrógrado de BoNT para a medula espinhal, bem como sua importância para o efeito analgésico da toxina (Favre-Guilmard et al., 2017). Ademais, foi demonstrado que fragmentos de BoNT nos aferentes nociceptivos de gânglios das raízes dorsais podem inibir neurotransmissores, em particular a SP (GÖBEL, 2003; SPOSITO, 2009).

Além disso, a injeção de BoNT marcada radioativamente mostrou ser detectável nas raízes espinais da medula após 48hs, o que explica clinicamente o tempo de início da redução dos sintomas dolorosos. Porém, permanece incerto se a BoNT/A pode ter um transporte retrógrado para o SNC através de certas populações de neurônios, o que precisa ser melhor investigado (GÖBEL, 2003; SPOSITO, 2009). No entanto, é válido ressaltar que recentemente foi demonstrado que o efeito central da BoNT, transportada retrogradamente, também contribui para sua eficácia no controle da espasticidade e distúrbios de movimento (CALEO e RESTANI, 2018; MATAK et al., 2019).

Além desses quatro mecanismos principais para explicar o efeito analgésico de BoNT em diferentes condições dolorosas, outros mecanismos vêm sendo propostos. Um deles diz respeito à participação do SNAP-25 na modulação da atividade dos canais de cálcio e, possivelmente de outros canais de íons dependentes de voltagem (JI et al., 2002; ZAMPONI, 2003; HE et al., 2008). Tem sido demonstrado que a interação de canais de cálcio com proteínas das sinapses serve para regular atividade do canal tanto diretamente quanto indiretamente, através da alteração de segundos mensageiros que modulam esses canais. Portanto, a clivagem da SNAP-25 pela BoNT poderia alterar o funcionamento dos canais de cálcio e conseqüentemente a liberação de neurotransmissores.

Outro mecanismo proposto sugere que a BoNT/A ao clivar a SNAP-25 pode interferir na translocação dos receptores TRPV1 do compartimento endossômico para a membrana plasmática da célula. Receptores TRPV1 são considerados essenciais para a hiperalgesia inflamatória. Portanto, uma redução na sua expressão pode contribuir para o controle da hiperalgesia (MORENILLA-PALLAO, et al., 2004, SHIMIZU et al., 2012; FAN et al., 2017).

Tomados em conjunto, os resultados discutidos acima sugerem que vários mecanismos parecem contribuir para o efeito analgésico de BoNT, os quais podem ter relevância diferente dependendo da condição dolorosa. Portanto, são necessários mais estudos para avaliar os mecanismos analgésicos da BoNT em diferentes condições e assim poder ampliar de maneira fundamentada suas indicações clínicas no tratamento da dor.

4 EFEITOS ADVERSOS

A injeção de qualquer substância na pele causa reações localizadas decorrentes do trauma. As mais comuns são eritema, dor, equimose (SANTOS, 2013; DAYAN, 2013) e dormência transitória. Também pode ocorrer hematoma, disfagia, sintomas semelhantes aos da gripe, dificuldade ao falar, sorrir e comer (ALMEIDA, 2018), ptose palpebral, olho seco, edema local, boca seca, parestesia local, ptose de supercílio, distúrbios visuais, assimetrias faciais, hipersensibilidade (como anafilaxia e doença do soro, urticária, edema de partes moles, dispneia e imunogenicidade (SILVA, 2011).

Dores de cabeça podem ocorrer dentro das primeiras 24 horas após a administração do BoNT, mas geralmente se tornam muito menos comum com injeções repetidas (KUKREJA e SINGH, 2015).

5 CONTRAINDICAÇÕES

- Gestantes e lactantes (PANICKER e MUTHANE, 2003; ARCHANA, 2016).
- Crianças menores de 2 anos (BOTOX®: Bula).
- Distúrbios neuromusculares (como miastenia Gravis) (BALI e THAKUR, 2005; ARCHANA, 2016).
- Infecção ou processo inflamatório no local da aplicação (ARCHANA, 2016; SILVA, 2011).
- Doenças de pele como eczema e psoríase (ARCHANA, 2016).
- Coadministração de antibióticos que contêm aminoglicosídeos ou outros agentes que interferem na transmissão neuromuscular (SILVA, 2011).
- Processos inflamatórios no local da aplicação (SILVA, 2011).
- Hipersensibilidade a qualquer ingrediente da fórmula (BOTOX®: Bula).

6 ANTIGENICIDADE, IMUNOGENICIDADE E TOLERÂNCIA

A BoNT é uma proteína capaz de induzir a produção de anticorpos que atuam neutralizando a toxina. O sistema imunológico pode reconhecer a BoNT como estranha e provocar uma resposta imunogênica, o que pode levar a formação de

anticorpos neutralizantes e interferir com sua atividade biológica (DRESSLER e BENECKE, 2007). Porém, este é um evento raro. Alguns pacientes que respondem bem inicialmente podem desenvolver tolerância posteriormente (A MUNCHAU, 2000). Os fatores de risco associados ao desenvolvimento de anticorpos neutralizantes incluem fatores relacionados à manufatura, tais como processo de fabricação e carga antigênica de proteínas, e fatores relacionados ao tratamento, incluindo administração de altas doses de toxina (300 U a cada sessão), menor intervalo entre as aplicações, injeções de reforço e exposição prévia (DRESSLER, 2004; GREENE et al., 1994).

A maioria das BoNTs comercialmente disponíveis são produzidas em associação com proteínas acessórias (NAPs- neurotoxin-associated proteins). Essas não têm papel terapêutico, porém podem desencadear a produção de anticorpos devido a sua alta carga proteica estranha. Nesse caso, a substituição por uma BoNT associada à uma NAP diferente ou não associada pode resolver o problema (DRESSLER e BENECKE, 2007).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante de todas essas informações, pode-se concluir que a BoNT representa um avanço considerável na medicina, seja pelo amplo leque de usos, seja por sua eficácia e alternativa à tratamentos não responsivos ou não eficazes com medicações de primeira escolha. Além disso, as BoNT's têm reconhecida ação terapêutica no tratamento de algumas síndromes dolorosas. A proposta deste trabalho, portanto, foi reunir dados a respeito da atividade terapêutica atribuída à BoNT, com foco no tratamento da dor.

A terapia com BoNT é segura e bem tolerada principalmente em casos de dor crônica, em que tratamentos farmacológicos tradicionais podem provocar efeitos colaterais. Além disso, efeitos colaterais sistêmicos são relativamente raros. Outra vantagem é a redução de medicamentos adjuvantes e a duração da sua ação, com três a quatro meses por dose, diferentemente de outras medicações que requerem uso contínuo.

A expectativa é que esse trabalho fomente a literatura com mais informações acerca do uso da BoNT na terapêutica, visando ampliar e aprofundar a investigação

dos seus mecanismos e seu potencial uso terapêutico no tratamento de condições dolorosas. A respeito de perspectivas futuras, a expectativa é que com todo o interesse e especulação em neurotoxinas botulínicas, novas aplicações terapêuticas inovadoras surgiram na próxima década.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MÜNCHAU, A.; BHATIA, K.P. **Uses of botulinum toxin injection in medicine today**. University Department of Clinical Neurology, Institute of Neurology, London BMJ, 320(7228):161-5, Jan 2000.

ALMEIDA, A. R. R. M. R. **Toxina botulínica na reabilitação de sorrisos gengivais**. Tese de Doutorado. Universidade Fernando Pessoa, 2018. Disponível em: <<https://bdigital.ufp.pt/handle/10284/7471>>. Acesso em 03/08/2019.

ARCHANA, M. **Toxin yet not toxic: botulinum toxin in dentistry**. The Saudi Dental Journal, v. 28, 63–69, 2016.

ARNON, S.S, et. al. **Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management**. JAMA, v. 285(8):1059-1070, 2001.

ATTAL, N. et al. **Safety and efficacy of repeated injections of botulinum toxin A in peripheral neuropathic pain (BOTNEP): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial**. The Lancet Neurology, 15(6), 555–565. doi:10.1016/s1474-4422(16)00017-x, 2016.

BALI, J.; THAKUR, R. **Poison as cure: a clinical review of botulinum toxin as an invaluable drug**. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis, v. 11, n. 4, p. 412-421, dez. 2005.

BOTOX®: Toxina botulínica tipo A. ALLERGAN. **Bula de medicamento**.

CALEO, M.; RESTANI, L. **Direct central nervous system effects of botulinum neurotoxin**. Toxicon. 1;147:68-72, Jun. 2018.

CARRUTHERS, A.; Kiene, K.; Carruthers, J. **Botulinum A exotoxin use in clinical dermatology**. Journal of the American Academy of Dermatology; v.34, n.5, Part 1, 788–97, 1996.

CARDOSO, F. **Toxina botulínica tipo B no manejo de distonia não responsiva à toxina botulínica tipo A**. Arq Neuropsiquiatr., v.61: 607-610, 2003.

COLHADO, O. C. G.; BOEING, M.; ORTEGA, L. B. **Botulinum toxin in pain treatment**. REVIEW ARTICLE. Revista brasileira de anestesiologia, v. 59, n. 3, p. 366-381, 2009.

CHUANG, Y. C.; YOSHIMURA, N.; HUANG, C. C.; WU, M.; CHIANG, P. H.; CHANCELLOR, M.B. **Intraprostatic botulinum toxin a injection inhibits cyclooxygenase-2 expression and suppresses prostatic pain on capsaicin induced prostatitis model in rat**. J. Urol., 180, 742–748, 2008.

- CHUANG, Y. C.; YOSHIMURA, N.; HUANG, C. C.; WU, M.; CHIANG, P. H.; CHANCELLOR, M.B. **Intravesical botulinum toxin A administration inhibits COX-2 and EP4 expression and suppresses bladder hyperactivity in cyclophosphamide-induced cystitis in rats.** Eur. Urol., v.56, 159–166, 2009.
- CUI, M.; KHANIJOU, S.; RUBINO, J.; AOKI, K. R. **Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduces formalin-induced pain.** Pain, v.107, 125–133, 2004
- DAYAN, S. H. **Complications from toxins and fillers in the dermatology clinic: recognition, prevention, and treatment.** Facial Plast Surg Clin North Am.; v. 21, n.4, p. 663-73, nov. 2013.
- DEMBEK, Z. F.; SMITH, L. A.; RUSNAK, J. M. **Botulism: cause, effects, diagnosis, clinical and laboratory identification, and treatment modalities.** Disaster Med Public Health Prep.1(2):122-34, Nov. 2007.
- DODICK, D.W. et al. **On a botulinum toxin A for Treatment of Chronic Migraine: Pooled Results From the Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Phases of the PREEMPT Clinical Program.** Headach J. Head Face Pain, v.50, 921–936, 2010.
- DOWELL, V. R. Jr. **Botulism and Tetanus: Selected Epidemiologic and Microbiologic Aspects.** Rev Infect Dis.;6 Suppl 1:S202-7, Mar-Abr. 1984.
- DRESSLER, D.; CHANÁ C.S P. **La toxina botulínica tipo B: Dónde estamos?** Rev Chil Neuro-psiquiatr.; v.40, 6-8, 2002.
- DRESSLER, D. **Clinical presentation and management of antibody induced failure of botulinum toxin therapy.** Mov Disord.;v. 19(Suppl 8): S92–S100, 2004.
- DRESSLER, D.; SABERI, F.A.; BARBOSA, E.R. **Botulinum toxin: mechanisms of action.** Arq Neuropsiquiatr; v.63, 180-185, 2005.
- DRESSLER, D.; BENECKE, R. **Pharmacology of therapeutic botulinum toxin preparations.** Disabil Rehabil; v.29, 1761–1768, 2007.
- DURHAM, P.L.; CADY, R.; CADY, R. **Regulação da secreção de peptídeos relacionados ao gene da calcitonina das células nervosas trigêmeos pela toxina botulínica tipo A: implicações para a terapia da enxaqueca.** Dor de cabeça; v.44 , 35-42; 42-43, 2004.
- EDVINSSON, L. et al. **CGRP as the target of new migraine therapies - successful translation from bench to clinic.** Nat Rev Neurol. 14(6):338-350, Jun. 2018.
- FAN, C. et al. **Botulinum toxin type A reduces TRPV1 expression in the dorsal root ganglion in rats with adjuvant-arthritis pain.** Toxicon; 133:116-122, Jul. 2017.

FAVRE-GUILMARD, C.; CHABRIER, P. E.; KALINICHEV, M. **Bilateral analgesic effects of abo botulinum toxin A (Dysport®) following unilateral administration in the rat.** Eur. J. Pain; v.21, 927–937, 2017.

GÖBEL, H.; HEINZE, A.; HEINZE-KUHN, K. et al. **Botulinun toxin A in the treatment of headache syndromes and pericranial pain syndromes.** Pain; 91:195-199, 2001.

GÖBEL, H. **Botulinum toxin A in pain management: mechanisms of action and rationale for optimum use.** In: Jost WH. **Botulinum toxin in painful disease.** Basel: Karger, 14-22, 2003.

GRACIES, J.M. et al. **Effects of botulinum toxin type A dilution and endplate targeting technique in upper limb spasticity.** Ann Neurol, v.52 (1 Supply): S89 ABS 271, 2009.

GREENE, P.; FAHN, S.; DIAMOND, B. **Development of resistance to botulinum toxin type A in patients with torticollis.** Mov Disord., v.9, 213–217, 1994.

HE, Y. et al. **Botulinum neurotoxin A and neurotoxin E cleavage products of synaptosome-associated protein of 25 kd exhibit distinct actions on pancreatic islet beta-cell Kv2. 1 channel gating.** Pancreas; v.36, 10-17, 2008.

HUANG, W.; FOSTER, J. A.; ROGACHEFSKY, A. S. **Pharmacology of botulinum toxin.** Journal of the American Academy of Dermatology; v.43(2), 249–259, 2000.

JANKOVIC, J. **Botulinum toxin: clinical implications of antigenicity and immunoresistance.** In: Brin MF, Jankovic J, Hallett M, editors. **Scientific and Therapeutic Aspects of Botulinum Toxin.** Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 409–415, 2002.

Jl, J. et al. **SNAP-25, a SNARE protein, inhibits two types of K channels in esophageal smooth muscle.** Gastroenterology, v.122, 994-1006, 2002.

KUKREJA, R.; SINGH, B. **The botulinum toxin as a therapeutic agent: molecular and pharmacological insights.** Research and Reports in Biochemistry, 2015.

KUMAR, R. **Therapeutic use of botulinum toxin in pain treatment.** Neuronal Signaling, 2018. <https://doi.org/10.1042/NS20180058>

LANG, A. **History and uses of BOTOX (botulinum toxin type A).** Lippincott's Case Manag. v.9, 109-112, 2004.

MCNALLY, R.E. et al. **Effectiveness of Medical Defense Interventions Against Predicted Battlefield Level of Botulinum Toxin A.** Joppa, MD: Science Applications International Corporation, 1994.

MARQUES, J. R. S. **A Toxina Botulínica: O seu uso clínico.** Dissertação de mestrado. Repositório Institucional da Universidade Fernando Pessoa, 2014.

MATAK, I. et al. **Mechanisms of Botulinum Toxin Type A Action on Pain.** *Toxins.* v.11(8), 459, 2019.

MCMAHON, H.T. et al. **Toxina tetânica e toxinas botulínicas tipo A e B inibem a liberação de glutamato, ácido gama-aminobutírico, aspartato e met encefalina dos sinaptossomas. Pistas para o local da ação.** *J. Biol. Chem.*, v.267, 21338-21343, 1992.

MORENILLA-PALAO, C. et al. **Regulated Exocytosis Contributes to Protein Kinase C Potentiation of Vanilloid Receptor Activity.** *J. Biol. Chem.*, v.279, 25665–25672, 2004.

NAKOV, R. et al. **Efeitos da toxina botulínica A na modulação pré-sináptica da liberação evocada do transmissor.** *Eur. J. Pharmacol.*, v.164, 45-53, 1989.

NEY, J.; JOSEPH, K. **Neurologic uses of botulinum neurotoxin type A.** *Neuropsychiatr Dis Treat.* v.3(6): 785–798, dez. 2007.

PANICKER, J. N.; MUTHANE, U. B. **Botulinum toxins: pharmacology and its current therapeutic evidence for use.** *Neurology India*, v.51(4), 455-60.

PIRAZZINI, M.; ROSSETTO, O; MONTECUCCO, C. **Botulinum Neurotoxins: Biology, Pharmacology, and Toxicology.** *Pharmacol Rev.*, v.69(2), 200-235, abr. 2017.

PURKISS, J. et al. **Liberação estimulada por capsaicina da substância P a partir de neurônios de gânglios da raiz dorsal cultivados: envolvimento de dois mecanismos distintos.** *Biochem. Pharmacol.* v.59, 1403-1406, 2000.

RANOUX, D. et al. **Botulinum toxin type A induces direct analgesic effects in chronic neuropathic pain.** *Ann Neurol.*, v.64, 274-283, 2008.

ROSALES, R.L., et al. **Extrafusal and intrafusal muscle effects in experimental botulinum toxin-Ainjection.** *Muscle Nerve*, v.19, 488-496, 1996.

ROSSETTO, O.; PIRAZZINI, M.; MONTECUCCO, C. **Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights.** *Nature Reviews Microbiology*, v.12, 535–549, 2014.

SANTOS, T. J. **Aplicação da toxina Botulínica em Dermatologia e estética e suas complicações: Revisão da Literatura.** Trabalho de obtenção de título de pós-graduação em Dermatologia – Núcleo Alfenas, 2013.

SCHANTZ, E. J.; JOHNSON, E. A. **Botulinum toxin: the story of its development for the treatment of human disease.** *Perspect Biol Med.*, v.40(3), 317–27, 1997.

SHIMIZU, T. et al. **Reduction of TRPV1 expression in the trigeminal system by botulinum neurotoxin type-A.** *Neurobiol. Dis.*, v.48, 367–378, 2012.

SILBERSTEIN, S. et al. **Botulinum toxin type a in the prophylactic treatment of chronic Tension-type headache: A multicentre, double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study.** *Cephalalgia*, v.26(7), 790-800, jul. 2006.

SILVA, J. F. N. **A aplicação da Toxina Botulínica e suas complicações: Revisão Bibliográfica.** Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Medicina Legal submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto, 2011.

SIMPSON, L. **The life history of a botulinum toxin molecule.** *Toxicon*, v.68, 40–59, 2013.

SYCHAT, et al. **A lack of antinociceptive or antiinflammatory effect of botulinum toxin A in an inflammatory human pain model.** *Anesth Analg.*, v.102, 509-516, 2006.

SOBEL, J. **Botulism.** *Clinical infectious Diseases Dis.*, v.41, 1167-1173, 2005.

SPOSITO, M. M. M. **Toxina Botulínica do Tipo A: mecanismo de ação.** *Acta Fisiátrica*, v.16, n. 1, 2009.

TEHRAN, D.; PIRAZZINI, M. **Novel Botulinum Neurotoxins: Exploring Underneath the Iceberg Tip.**, 2018.

TING, T. P.; FREIMAN, A. **The story of Clostridium botulinum: from food poisoning to Botox®"-review.** *Clin Med*, v.4, 258–261, 2004.

UNNO, E.; SAKATA, R.; ISSY, M. A. **Estudo Comparativo entre Toxina Botulínica e Bupivacaína para Infiltração de Pontos-Gatilho em Síndrome Miofascial Crônica.** *Rev. Bras. Anesthesiol.*, v.55, n.2, Mar./Abr. 2005.

WEINKERS, K. et al. **Botulinum toxin injection into rabbit vitreous.** *Opht Surg.*, v.15(4), 310-314, 1984.

ZAMPONI, G.W. **Regulation of presynaptic calcium channels by synaptic proteins.** *J Pharmacol Sci.*, v.92, 79–83, 2003.