

ARTIGO DE REVISÃO

Toxina Botulínica do Tipo A: mecanismo de ação

Botulinic Toxin Type A: action mechanism

Maria Matilde de Mello Sposito

Medica Fisiatra, Centro de Reabilitação Umarizal - Instituto de Medicina Física e Reabilitação do Hospital das Clínicas da FMUSP. Médica consultora para Brasil e América Latina da Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda, Divisão Neurociências BOTOX®

Endereço para correspondência:

Instituto de Medicina Física e Reabilitação do Hospital das Clínicas FMUSP -
Unidade Umarizal
Rua Guaramembé, 589
São Paulo - SP Cep 05756-350
E-mail: dmr.umarizal@hcnet.usp.br

Recebido em 20 de Janeiro de 2009, aceito em 17 de Março de 2009.

Resumo

Neste trabalho de revisão, são abordados inicialmente aspectos históricos das pesquisas para a obtenção e utilização da toxina botulínica do tipo A (BoNT/A), inicialmente como arma biológica e depois como medicamento. Em seguida descreve-se detalhadamente a estrutura e síntese da BoNT/A, com ênfase às cadeias leve e pesada para na seqüência descrever-se o mecanismo de ação. O mecanismo de ação é explorado nos seus aspectos de relaxamento muscular sobre músculos estriados (inibição da liberação de acetilcolina) e ação sobre o reflexo de estiramento medula; ação antinociceptiva, através do bloqueio da liberação de peptídeos relacionados com a dor e sobre o sistema nervoso autônomo, atuando sobre glândulas (salivar, sudorípara e lacrimal) e sobre bexiga e próstata. Ainda discute-se os efeitos diretos e indiretos da BoNT/A sobre o Sistema Nervoso Central, os aspectos relacionados à antigenicidade quando utilização deste recurso terapêutico e as direções futuras para este recurso.

Palavras-chave: toxina botulínica tipo A, sistema nervoso central/efeitos de drogas, literatura de revisão como assunto

INTRODUÇÃO

As Neurotoxinas Botulínicas (NTB) são produzidas pela bactéria anaeróbia *Clostridium botulinum* e são consideradas as toxinas mais potentes conhecidas. Sua alta toxicidade aliada a mecanismos de ação extremamente específicos lhes confere características únicas de alta periculosidade, por um lado, associada á altíssima utilidade nas ciências médicas, por outro.¹

O uso de toxinas biológicas, agentes infecciosos e venenos químicos para matar inimigos não é uma novidade. Durante séculos populações nativas de várias regiões utilizaram toxinas obtidas de plantas e venenos de anfíbios para aumentar a letalidade de suas armas.² A utilização das NTB como armas biológicas começou a mais de 60 anos atrás pelos Japoneses, através do Biological Warfare Group - Unit 731, que conduziu experimentos em prisioneiros de guerra para determinar a letalidade da ingestão do *Clostridium botulinum*.²

Devido á sua extrema alta potência as NTB foram utilizadas, durante a II Guerra Mundial, por ambos os lados, Forças Aliadas e Forças do Eixo, no sentido de avaliar o seu potencial como arma biológica.³

Os Estados Unidos foram os primeiros a produzir a Toxina Botulínica do Tipo A (BoNT/A) durante a II Guerra Mundial em resposta a suspeita da utilização desta arma biológica pelos alemães. Mais tarde os soviéticos produziram amplos estoques de BoNT/A como arma biológica. Irã, Iraque, Síria e Coréia do Norte também são suspeitos de estarem envolvidos neste tipo de produção. O Iraque admitiu oficialmente, em 1995, ter produzido 19.000 de litros de concentrado de toxina botulínica, o que seria suficiente para matar 3 vezes toda a população mundial. Acredita-se que 10.000 litros deste concentrado tenham sido transformados em armas biológicas e acondicionados para distribuição.²

Apesar das dificuldades associadas á dissociação da BoNT/A na forma de aerossol, um ataque desta natureza sobre a população civil poderia causar um grande número de casos fatais (estima-se 10% de morte em um raio de 500ms á partir do ponto de dispersão do produto). A dose letal da BoNT/A para humanos na forma inalada é de 0.7-0.9µg (ou 0.001 µg/kg). Ela é 15.000 vezes mais potente que o Agente Nervoso VX e 10.000 vezes mais tóxica que o Agente Nervoso Sarin, dois dos mais comuns agentes nervosos organofosforados.² Um único grama de BoNT/A, apropriadamente distribuída, em condições ambientais ideais, é capaz de matar um milhão de pessoas.²

Não obstante o uso de armas biológicas terem sido formalmente encerrado com a assinatura da Convenção para Armas Biológicas em 1972, fatos recentes no Oriente Médio confirmam a utilização das NTB pelas forças militares do Iraque durante a Guerra do Golfo.⁴

As NTB, quando não utilizadas na forma de armas biológicas ou de

medicamentos, podem provocar quadros de botulismo em humanos tendo como etiologia a ingestão de alimentos contaminados, a infecção de feridas ou ainda colonização intestinal de recém-nascidos.¹ O botulismo passou a ser um problema de saúde pública a partir do século 19 com o advento da conservação de alimentos, porém com as modernas práticas de preparação industrial de alimentos, o botulismo passou a ser uma ocorrência rara e por este motivo não há necessidade de vacinação da população geral.¹ Já a população militar, devido ao seu risco intrínseco, é normalmente vacinada. Após a contaminação, os sintomas de botulismo aparecem com 24-36 horas, porém se a porta de entrada são feridas infectadas, estes sintomas podem demorar vários dias. O diagnóstico é baseado na observação clínica e na história natural da doença. Uma paralisia flácida, simétrica e descendente é característica, associada a boca seca, náuseas e diarreia. O botulismo é normalmente suspeitado quando aparecem sinais de disfunção de pares de nervos cranianos, que tipicamente se iniciam pelos olhos com visão borrada, diplopia, seguida de disartria, disfagia e falência respiratória pelo comprometimento do diafragma.²

A confirmação diagnóstica é realizada através de procedimentos laboratoriais que incluem a incubação de culturas anaeróbicas, testes de toxicidade do soro e exame eletroneuromiográfico. O diagnóstico diferencial deve ser feito com Síndrome de Guillain-Barré, polineuropatias inflamatórias agudas e intoxicação por magnésio. Feito o diagnóstico, o tratamento é realizado com soro anti-botulismo e a recuperação ocorre em torno de 2 semanas.²

Já o desenvolvimento das NBT como medicamentos iniciou-se em 1981 com a descrição da injeção de BoNT/A nos músculos dos olhos para o tratamento do estrabismo. Em 1989, após exaustivos testes laboratoriais e clínicos, o Food and Drug Administration (FDA) aprova o uso terapêutico de BOTOX®, Allergan Inc., Irvine, Califórnia, USA, para o tratamento do estrabismo, blefaroespasma e espasmo hemifacial. Em 2000 o FDA aprova BOTOX® e a toxina B (Myobloc™, Elan Pharmaceuticals Inc., Morristown, NJ, USA) para distonia e BOTOX® Cosmetic para linhas faciais hiperkinéticas.⁵

Apesar da grande maioria das indicações para a aplicação terapêutica da BoNT/A esteja voltada para as desordens do movimento, manifestadas por anormal, excessiva ou inapropriada contração muscular, o seu uso tem sido rapidamente expandido, baseado na ação farmacológica estabelecida e nos mecanismos de ação propostos, incluindo uma imensa variedade de desordens oftalmológicas, gastrointestinais, urológicas, ortopédicas, dermatológicas, secretórias, dolorosas e cosméticas (Tabela 1).⁵

Tabela 1
Aplicações clínicas da BoNT/A.

Distonias	Outros movimentos involuntários	Contração muscular inapropriada	Outras aplicações
Blefaroespasma	Espasmo hemifacial	Espasticidade (AVC, paralisia cerebral, trauma craniano, esclerose múltipla)	Cosmética: rugas, linhas plásmicas, assimetrias, remodelamento de contornos.
Distonia oromandibular, facial e lingual	Tremor de membros, cabeça, voz e queixo	Síndrome temporo-mandibular	Hiperlacrimação Ptose protetiva.
Distonia cervical	Mioclonia palatal	Estrabismo, nistagmo	Sialorréia
Distonia laríngea	Tics motores e vocais	Bruxismo	Hiperidrose
Distonia de membros	Nistagmo e osciloscopia	Rigidez dolorosa	Salivação gustatória
Distonias ocupacionais		Dor de cabeça tensional	Fissura anal Obesidade
		Espasmos lombares e lombosacrais	Cotovelo do tenista e lesões do esporte
Outras distonias focais e segmentares (primárias ou secundárias)		Radiculopatia decorrente de espasmo muscular	Constipação Rinorréia
		Espasmo faríngeo Espasmo do esfíncter de Oddi	Migração
		Bexiga espástica neurogênica	
		Discinergia detrusora	
		Anismo / Vaginismo	

ESTRUTURA E SÍNTESE DA TOXINA BOTULÍNICA DO TIPO A

Estrutura

A parte ativa da molécula da BoNT/A pesa 150kDa e é formada de duas porções: cadeia leve com atividade catalítica (50kDa), e cadeia pesada (100kDa). A cadeia pesada apresenta dois domínios: o de ligação (metade C-terminal da cadeia pesada) e o de translocação representado por Hn (metade N-terminal da cadeia pesada). A imagem tridimensional da BoNT/A está representada na Fig.1.^{2,6}

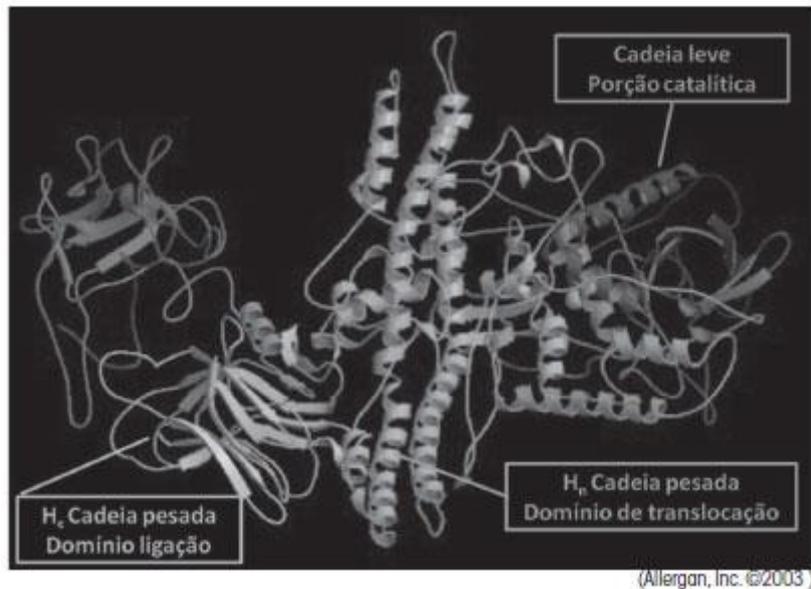


Figura 1. Representação tridimensional da BoNT/A

A parte ativa da molécula da neurotoxina do *Clostridium botulinum* é formada por uma única cadeia polipeptídica composta por 1295 aminoácidos. O subsequente formado proteolítico é composto por uma porção leve (L-chain/cadeia leve) composta pelos primeiros 447 aminoácidos e por uma porção pesada (H-chain/ cadeia pesada) composta pelos aminoácidos restantes.¹ A cadeia leve contém o domínio enzimático e a cadeia pesada contém os domínios de translocação (Hn) e os domínios de ligação acessório (Hc-N) e ligação a gangliosídeos e a proteínas sinápticas (Hc-C).⁷ Estas duas partes da cadeia estão ligadas entre si por uma ponte di-sulfídica entre os aminoácidos Cys430 e Cys454⁸(Fig.2). A integridade desta ponte di-sulfídica é fundamental para a integridade da atividade biológica da molécula de toxina botulínica.^{9,10}



Figura 2. Estrutura da dupla cadeia da neurotoxina botulínica.

Cadeia

leve

É a porção catalítica, proteolítica. O seu sítio ativo é uma cavidade contendo íon zinco e pode acomodar pelo menos 16 aminoácidos residuais.¹ A cadeia leve pesa 50kDa e é responsável pela atividade metaloproteásica zinco dependente que impede a liberação dos neurotransmissores, através do bloqueio das vesículas de fusão pré-sinápticas.¹

Cadeia

pesada

É dividida em duas porções Hn e Hc que juntas somam 100kDa. Hn, domínio de ligação, é uma estrutura helicoidal associada com a atividade de fusão de membrana e envolvida com a formação de canais iônicos seletivos transmembrânicos, voltagem dependentes.¹ Hc é composta fundamentalmente de beta-proteína e visualmente apresenta dois domínios: Hc-N e Hc-C.¹ Esta região esta envolvida com a ligação específica aos receptores neuronais existentes na superfície externa dos neurônios colinérgicos periféricos. Assim, a cadeia pesada é responsável pela ligação aos receptores extracelulares e internalização na célula nervosa, além de ajudar a translocação da cadeia leve para o citoplasma do neurônio.¹

SÍNTESE

Os microorganismos produtores das neurotoxinas botulínicas são diversos. Inicialmente eles foram designados como *Clostridium botulinum* e responsabilizados pela síntese de sete sorotipos de toxina nomeados de A-G. Mais tarde identificados como sete cepas de *C.botulinum* A, B, C, D, E, F, e G.⁷ O sorotipo G atualmente é atribuído ao *C. argentinense*. Dependendo do eco-sistema em que as bactérias crescem e/ou produzem esporos, os tipos de *C. botulinum* afetam diferentes subconjuntos de espécies vivas. Muitas variantes são conhecidas pela cepa principal; além disto, algumas cepas sintetizam mais de um sorotipo de toxina botulínica como A e B; A e F; e B e F.⁷

Muitas espécies de *Clostridium* diferentes do *C. botulinum*, mas bioquimicamente e geneticamente relacionadas, como o *C. butyricum* e *C. baratii* também produzem neurotoxinas botulínicas. O *C. butyricum* produz o sorotipo E, 96,9% idêntico ao produzido pelo *C. botulinum* E; e o *C. baratii* produz a neurotoxina F.^{7, 11} Assim, a classificação inicial do *C. botulinum* em sete cepas se torna insatisfatória; a nova classificação adotada divide o *C. botulinum* em quatro grupos fisiológicos e agrega as cepas do *C. butyricum* e *C. baratii* (Tabela 2).⁷

Tabela 2

Propriedades principais da forma esporulada da bactéria anaeróbia do gênero *Clostridium* produtora de neurotoxina botulínica.⁷

Neurotoxina produzida pelo clostridium	Grupo I <i>C. botulinum</i>	Grupo II <i>C. botulinum</i>	Grupo III <i>C. botulinum</i>	Grupo IV <i>C. argentinense</i>	<i>C. butyricum</i>	<i>C. butyricum</i>
Tipo de toxina	A, proteolítica B, F	E, não proteolítica B, F	C, D	G	E	F
Subtipo	A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3 Bivalente B (Ba, Bf, Ab) Proteolítica F	E1, E2, E3, E6 Não proteolítica B, F	C, D, C/D	G	E4, E5	G, baratii F
Proteólise	+	-	-	+	-	-
Produção de lipase	+	+	+	-	-	-
Propriedades principais	Alta termo resistência dos esporos	Crescimento em baixas temperaturas (3°C)	Crescimento ótimo em 40°C			
Botulismo	Humano		Animal		Humano, Animal?	
Espécie de <i>Clostridium</i> não tóxico relacionado	<i>C. sporogenes</i>		<i>C. novyi</i> <i>C. hemolyticum</i>	<i>C. subterminale</i> <i>C. proteolyticus</i> <i>C. schimacherense</i>	<i>C. butyricum</i>	<i>C. baratii</i>

Na natureza, as neurotoxinas botulínicas são sintetizadas como parte de um complexo molecular, variando em tamanho e composição, associado a proteínas não tóxicas do tipo hemaglutinínicas e/ou não hemaglutinínicas.¹²

Os sorotipos A, B, C1 e D hemaglutinino positivo formam complexos de 500kDa e 300kDa. Os sorotipos E, F e D hemaglutinino negativo formam somente pequenos complexos de 300kDa.^{12,13} Somente o sorotipo A pode se formar em todos os tamanhos, incluindo o peso molecular de 900kDa. (Fig.3).

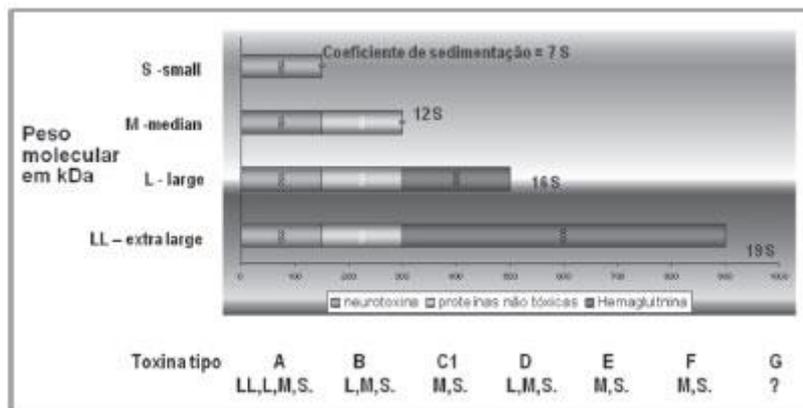


Figura 3. Pesos moleculares possíveis para os diferentes sorotipos de neurotoxina botulínica.

As preparações terapêuticas da toxina botulínica contêm o complexo ativo somado a proteínas não tóxicas, formando o chamado "complexo protéico" e excipientes. Assim as formulações apresentam a estrutura teórica mostrada na Figura 4.⁹ As proteínas acessórias têm a função de proteger a neurotoxina da degradação.^{14,15}

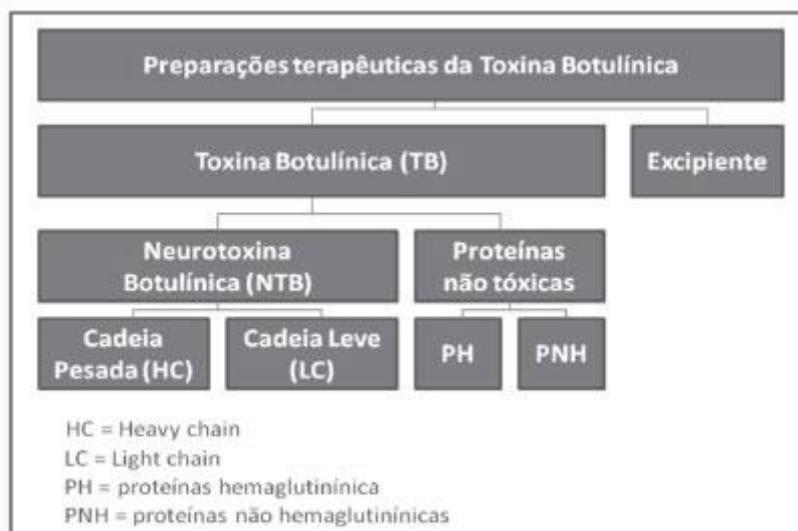


Figura 4. Estrutura das preparações terapêuticas da Toxina Botulínica.

MECANISMO

DE

AÇÃO

A toxina botulínica basicamente inibe a liberação exocitótica da acetilcolina nos terminais nervosos motores levando a uma diminuição da contração muscular.¹⁶ Esta propriedade a torna útil, clínica e terapêuticamente, em uma série de condições onde existe excesso de contração muscular.¹⁶

A utilização da toxina botulínica em patologias acompanhadas de distúrbios do movimento mostrou que existem benefícios em outros aspectos clínicos, como o alívio das condições dolorosas concomitantes. Além disto, a observação dos efeitos adversos e daqueles a distância dos pontos de injeção, não só induziu ao raciocínio clínico para a utilização em outras situações, como nas alterações de glândulas e de músculos lisos, mas forçou a ampliação dos estudos a respeito dos mecanismos de ação possivelmente envolvidos.

Deste modo, atualmente devemos pensar não só no mecanismo de ação classicamente descrito, sobre a inibição da liberação de acetilcolina nos terminais nervosos motores, mas também na ação sobre outros neurotransmissores. Assim do ponto de vista didático dividiremos a dissertação relativa ao mecanismo de ação nos seguintes tópicos:

A. Relaxamento muscular

i. Ação sobre músculos estriados

ii. Ação sobre o reflexo de estiramento medular

B. Ação antinociceptiva

i. Bloqueio da liberação de peptídeos relacionados com a dor

C. Sistema Nervoso Autônomo

i. Ação sobre glândula: salivar, sudorípara e lacrimal

ii. Ação sobre a bexiga e a próstata

D. Efeitos diretos e indiretos sobre o Sistema Nervoso Central

A. RELAXAMENTO MUSCULAR

Ação sobre músculos estriados

O clássico mecanismo de ação da BoNT/A é a inibição da liberação de acetilcolina no terminal nervoso periférico.^{6,13}

Uma vez injetada no músculo a BoNT/A atinge o terminal nervoso colinérgico através da associação das propriedades de dispersão e difusão, e lá chegando, inicia seu mecanismo de ação. Este mecanismo se faz em três etapas: (a) ligação ao terminal nervoso colinérgico; (b) internalização/translocação; (c) inibição cálcio-dependente da liberação (exocitose) do neurotransmissor.⁶ Para tanto se requer uma molécula de BoNT/A, com as duas cadeias (leve e pesada) intacta, estabelecida como uma endopeptidase zinco dependente, que quebra especificamente as proteínas essenciais para a mediação da exocitose do neurotransmissor, no caso acetilcolina.⁶

(a) Ligação ao terminal nervoso colinérgico: a BoNT/A se liga a um receptor de alta afinidade predominantemente encontrado nos neurônios colinérgicos dos nervos motores através do domínio de ligação da cadeia pesada. (Vide Fig.1 e Fig.5).^{6,13,17}

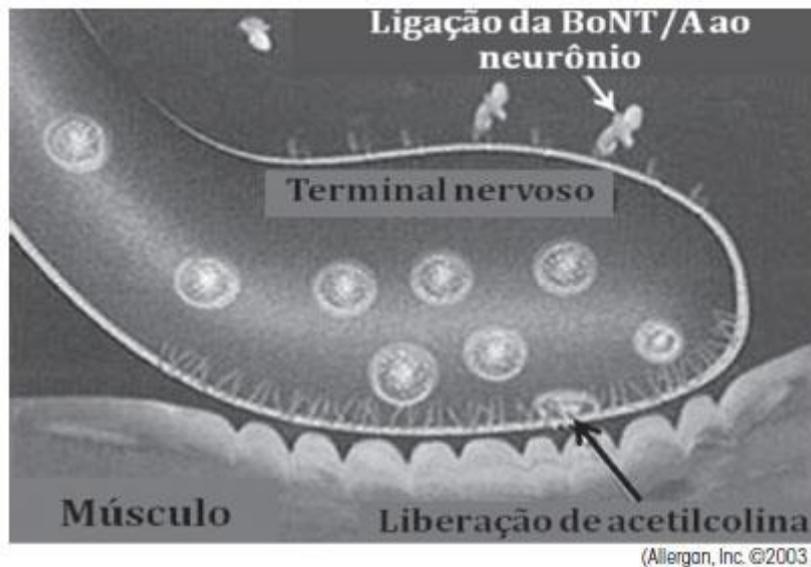


Figura 5. Ligação da BoNT/A aos receptores da junção neuromuscular de neurônios colinérgicos de nervos motores periféricos.

(b) Internalização / translocação: Uma vez que a BoNT/A se liga a célula neuronal, inicia-se o processo de internalização presumivelmente intermediado por um receptor de endocitose. Estes receptores estão localizados na porção amielínica da junção neuromuscular de mamíferos. Parecem existir duas fases de internalização: (a) entrada rápida: que utiliza um sistema vesicular e (b) uma entrada lenta: que requer horas e é menos específica ⁶ (Fig. 6)

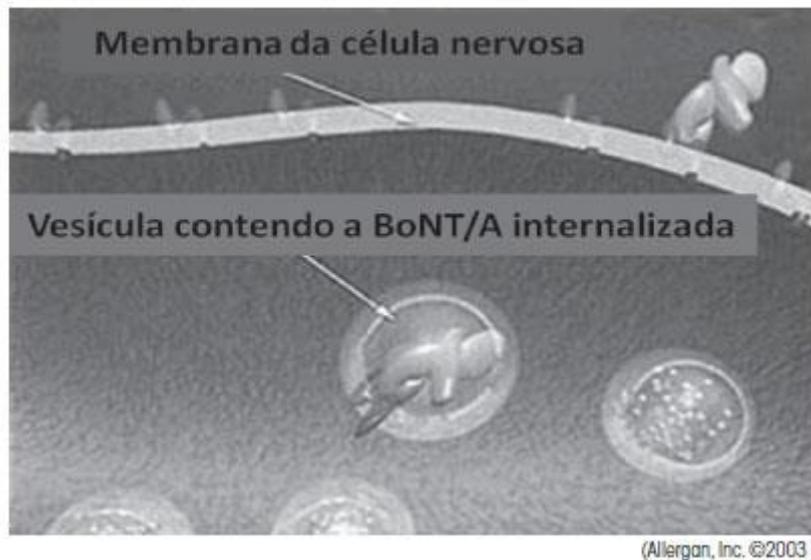


Figura 6. Internalização da molécula de BoNT/A.

Sob condições ácidas, de pH baixo, acontecem mudanças na conformação estrutural protéica da molécula (domínio de translocação - Vide fig.1), de modo

que a cadeia pesada facilita a entrada da cadeia leve para o compartimento citoplasmático do terminal nervoso. ^{6,13,17}

(c) inibição cálcio-dependente da liberação (exocitose) do neurotransmissor: a inibição da exocitose do neurotransmissor, acetilcolina, acontece através de uma atividade proteolítica zinco dependente da cadeia leve, que quebra seletivamente as ligações peptídicas de uma proteína SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein-Receptor) essencial para a liberação do neurotransmissor que é cálcio dependente (Fig.7).^{6,13,17} Assim, a cadeia leve exerce seu efeito quebrando as proteínas que são responsáveis pela fusão das vesículas de acetilcolina com a membrana celular do terminal nervoso.

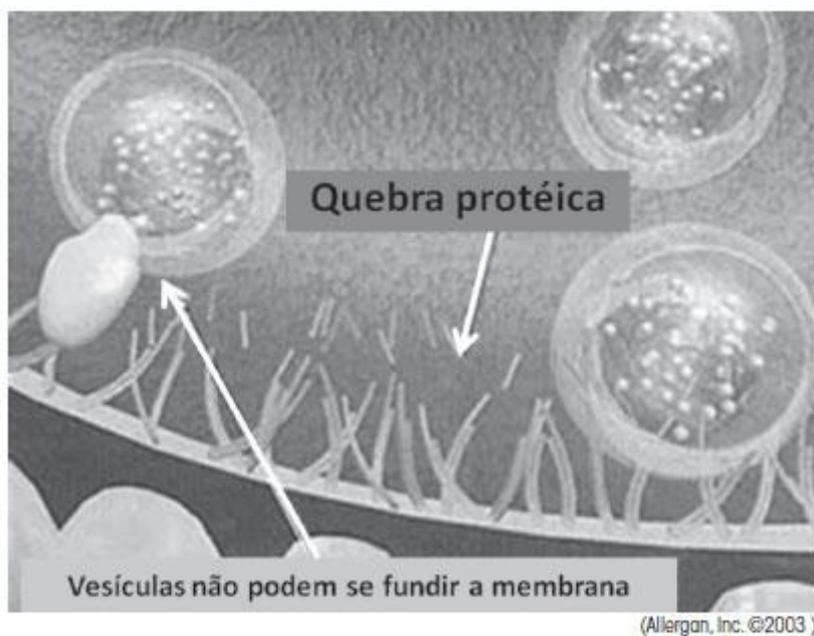


Figura 7. Inibição cálcio dependente da exocitose do neurotransmissor.

Tanto a SNARE como as ligações peptídicas são específicas para cada sorotipo de toxina botulínica. A Tabela 3 mostra a relação das proteínas de fusão alvo de cada um dos sorotipos de toxina botulínica. A BoNT/A quebra especificamente a SNAP-25.⁶

Tabela 3
Proteínas de ligação alvo da toxina botulínica de acordo com o sorotipo.⁶

Sorotipo	Substrato celular
A	SNAP-25
B	VAMP / Synaptobrevin / Cellubrevin
C ₁	Syntaxin 1A, 1B, SNAP-25
D	VAMP / Synaptobrevin (181, 182) / Cellubrevin
E	SNAP-25 (46)
F	VAMP / Synaptobrevin (181, 182) / Cellubrevin
G	Synaptobrevin / Cellubrevin

A Fig. 8A mostra a o processo normal de liberação do neurotransmissor levando a contração muscular. A Fig.8B mostra a ação da toxina botulínica no bloqueio da liberação do neurotransmissor.

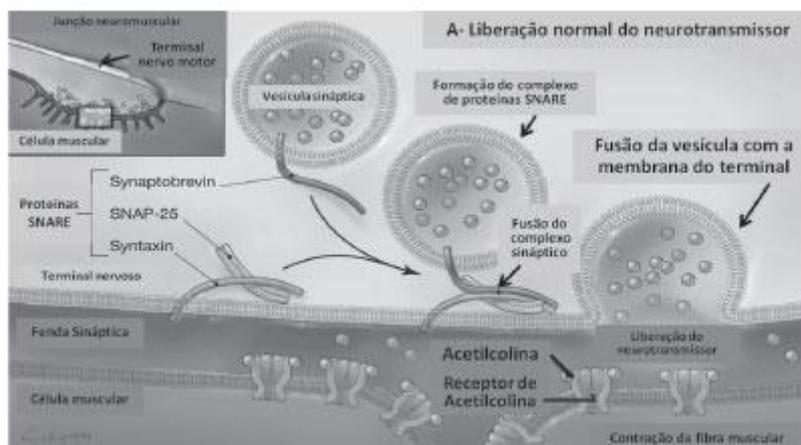


Figura 8a. Liberação normal do neurotransmissor.

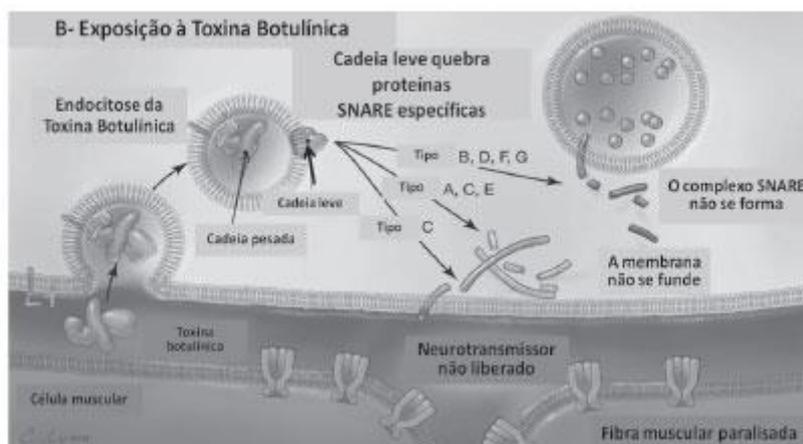


Figura 8b. Bloqueio da liberação do neurotransmissor sob a ação da toxina botulínica.

Está demonstrado que a quebra das proteínas SNARE por si não impedem a formação do complexo SNARE de fusão, mas resulta na formação de um complexo não funcional no qual a acoplagem do influxo de cálcio (Ca^{2+}) no momento da fusão é interrompida. O aumento da concentração de cálcio no terminal sináptico reverte parcialmente o efeito da toxina botulínica.⁸

Resposta da junção neuromuscular ao bloqueio: Após aproximadamente dois meses, o terminal nervoso inicia a sua expansão por meio de brotamentos que se estendem através da superfície do músculo. Quando os brotamentos

formam uma conexão sináptica física com a junção neuromuscular, a unidade motora nervosa se restabelece (Fig.8).⁶

Estudos *in vivo* estabelecem que estes brotamentos produzem uma re-inervação temporária nas fases precoces da recuperação pós-bloqueio. Durante as fases tardias a junção neuromuscular original recupera a atividade excitatória e estes brotamentos regridem devolvendo à terminação sua forma original, completamente funcional.^{10,18}

Ação sobre o reflexo de estiramento medular

Além da ação direta sobre o músculo estirado, a toxina botulínica também atua no fuso muscular reduzindo o tráfico de informação centrípeta. O mecanismo pelo qual isto ocorre ainda não é totalmente elucidado.⁹

O músculo estriado em humanos contém junções neuromotoras colinérgicas entre os α -motoneurônios e as fibras musculares extrafusais, e entre os γ -motoneurônios e as fibras musculares intrafusais, formando os fusos musculares. Quando um estiramento muscular ocorre, sinais aferentes originados no fuso muscular correm pelas fibras Ia e II, estimulando os α -motoneurônios do músculo estirado, assim como os interneurônios que inibirão os α -motoneurônios dos músculos antagonistas.

Os γ -motoneurônios dos músculos estirados são ativados pelos α -motoneurônios colaterais (α e γ co-ativação). Este circuito é mostrado na Fig. 9. Sinais aferentes provenientes do fuso muscular também estão relacionados às estruturas supra-espinhais envolvendo respostas de latência longa ao reflexo do estiramento e à geração da imagem corporal no espaço.¹⁹

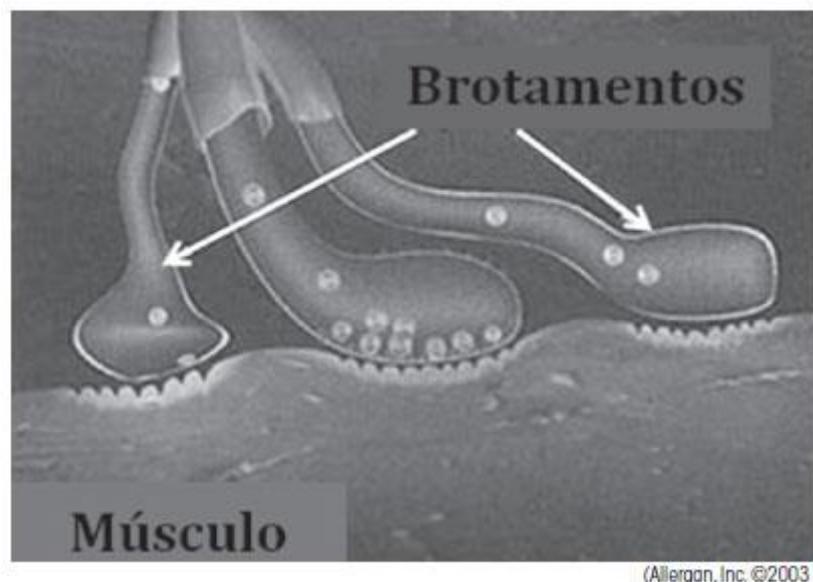


Figura 9. Brotamentos axonais e restabelecimento da sinapse com a junção neuromuscular.

Recentemente o envolvimento dos sinais aferentes foi estudado na fisiopatologia das distonias. A facilitação para as fibras Ia pode levar ao aumento da movimentação involuntária em várias patologias distônicas; por outro lado, a injeção de lidocaína sobre os fusos musculares promove um "bloqueio muscular aferente".²⁰

A toxina botulínica produz diferentes efeitos sobre o fuso muscular. A atrofia de fibras intra e extrafusais já foi demonstrada em animais, assim como o bloqueio dos γ -motoneurônios reduzindo os sinais aferentes Ia e II dos fusos musculares e conseqüentemente diminuindo o tonus por uma inibição reflexa. O efeito antidistônico da toxina botulínica pode, por outro lado, afetar não só o músculo alvo, mas também inibir o reflexo espinal.¹⁹

Além disto, a injeção de toxina botulínica pode causar uma profunda redução da espasticidade em áreas maiores que as esperadas e não relacionadas com a área de dispersão do medicamento.²¹ Esta observação pode estar relacionada com os efeitos da toxina botulínica sobre os γ -motoneurônios reduzindo os sinais aferentes Ia dos fusos musculares. Esta atenuação dos sinais Ia reduzem a retro-alimentação para os α -motoneurônios e para outras vias, reduzindo a atividade de músculos não injetados.²¹

B.AÇÃO

ANTINOCICEPTIVA

Durante os primeiros anos de tratamento com toxina botulínica para condições motoras, os investigadores notaram um significativo benefício sobre os sintomas de dor, que excedia os efeitos do relaxamento muscular, e que não necessariamente correspondia às regiões neuromusculares afetadas. Isto sugeria que os efeitos sobre a dor eram independentes dos efeitos musculares, e poderiam ter mecanismos de ação independentes.¹⁶ Estes mecanismos de ação englobam neurônios locais, medula espinal e centros suprasegmentares do cérebro (Fig.10), envolvendo os sistemas nervosos autônomo e somático.²²

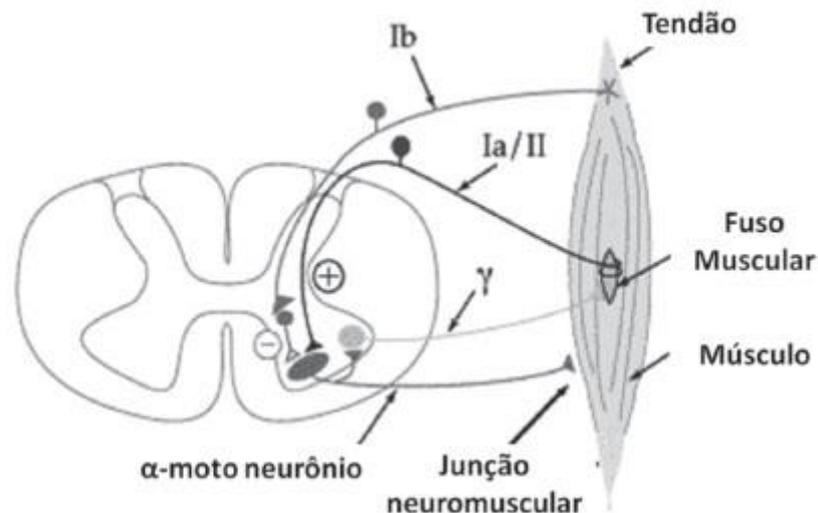


Figura 10. Reflexo de estiramento medular. Estímulos aferentes provenientes dos fusos musculares e dos órgãos tendíneos de Golgi controlam a atividade dos α -motoneurônios na inervação dos músculos estriados. Quando um músculo estriado é estirado, os fusos musculares mandam um sinal para o α -motoneurônio que por sua vez estimulam a contração das fibras intra e extra fusais.

Bloqueio da liberação de peptídeos relacionados com a dor

A grande especificidade da BoNT/A para neurônios colinérgicos na presença de receptores/aceptores específicos faz com que ela também iniba outros neurotransmissores, como a **norepinefrina**, dentro do modelo no qual existe o acesso ao compartimento intracelular dos nervos motores.¹⁶ Além disto, foi demonstrado, que a BoNT/A também é capaz de inibir a liberação da **Substância P** em culturas embrionárias de neurônios de gânglios da raiz dorsal²³ e reduzir o estímulo de liberação do **peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (PRGC)**.²⁴

A Substância P é um neurotransmissor peptídeo liberado pelos aferentes primários nociceptivos e o PRGC é um neuropeptídeo inflamatório existente nos gânglios dos neurônios da coluna dorsal, coexistindo com a Substância P em muitos outros gânglios de neurônios sensoriais. A inibição destes neurotransmissores pela BoNT/A poderá trazer benefícios em relação á sintomatologia dolorosa.¹⁶

A injeção subcutânea de BoNT/A também inibe, de forma dose-dependente, a dor de origem inflamatória induzida no modelo de formalina em ratos, e esta inibição esta associada á redução da liberação do **glutamato** nos terminais nociceptivos de nervos sensoriais periféricos.²⁵

O glutamato estimula localmente neurônios nociceptivos através da ativação de

receptores nos aferentes periféricos. Na resposta inflamatória nota-se um aumento do número de receptores ao glutamato em nervos nociceptivos periféricos. Este é o motivo pelo qual a BoNT/A atenua a dor inflamatória, no modelo de formalina, através da redução da liberação do glutamato.¹⁶

Em outra preparação em animais²⁶ mostrou-se que a injeção de BoNT/A reduz substancialmente a imunoreatividade da **proteína C-Fos** no corno dorsal da medula lombar de ratos previamente tratados com formalina. A injeção de toxina botulínica também diminui significativamente a fase II de excitação dos neurônios da coluna dorsal de ratos previamente tratados com formalina.

A BoNT/A mostrou também inibir a proteína quinase C (PKC) mediada pela SNARE-dependente na exocitose de TRPV1(transient receptor potential vanilloid) na membrana plasmática.²⁷

Estes fatos induzem ao raciocínio que os estímulos nociceptivos ascendentes que trafegam pelo corno dorsal de medula espinal ficam atenuados devido a uma redução da entrada de estímulos periféricos e/ou redução da sensibilização central;¹⁶ ou seja, inibição direta da sensibilização periférica e inibição indireta da sensibilização central, pela redução da liberação de neurotransmissores nos sítios periféricos.¹⁶

Assim, a injeção de toxina botulínica minimiza a inflamação neurogênica pela inibição da liberação do neurotransmissor no terminal aferente primário periférico, o que reduz a dor e a entrada de estímulos para a medula a partir da periferia. Como consequência, teremos uma redução do processo nociceptivo em nível medular.^{16,22}

Tem sido hipotetizado também que a efetividade da BoNT/A em neuropatias periféricas e na cistite intersticial, onde a barreira antidrômica mantém um estado de dor neuropática, possa ser atribuída á ação periférica da BoNT/A em inibir a liberação de neuropeptídios ativados pelo padrão antidrômico. Realmente, a efetividade clínica da BoNT/A em melhorar condições neurovasculares como a migração, a dor facial crônica e outras dores relacionadas com padrões medulares têm sido descritas.²²

Apesar do mecanismo preciso pelo qual a BoNT/A exerce seu efeito analgésico não estar totalmente esclarecido, alguns aspectos já são fortemente aceitos: a BoNT/A parece não afetar a dor aguda de origem nociceptiva relacionada com as fibras de condução A δ e C, devido ás falhas observadas no tratamento da dor termo relacionada. Por outro lado, acontece uma redução no eritema cutâneo da urticária crônica e da Síndrome de Frey, demonstrando o papel da BoNT/A na regulação do tonus e da permeabilidade dos vasos. A partir destas observações, podemos teorizar modelos para investigar a patogênese da dor neuropática crônica como sendo provocada pela ativação nociceptiva periférica.²²

De qualquer modo, a BoNT/A parece ser capaz de inibir a liberação local de neuropeptídeos relacionados com a dor, tal como o **peptídeo relacionado ao gene da calcitonina** (PRGC), tanto nos terminais colinérgicos como nas terminações livres, prevenindo a sensibilização local dos nociceptores. Esta ação periférica pode contribuir para a redução da ativação central relacionada com a dor crônica. Um mecanismo interessante para a redução da dor e da vasodilatação neurogênica é a possibilidade da BoNT/A bloquear a exocitose da SNARE-dependente aos TRPV1 (transient receptor potential vanilloid), que tem ação primária na percepção térmica periférica e na dor inflamatória na superfície dos neurônios.²² Assim a BoNT/A inibe a inflamação neurogênica pela atenuação da liberação dos neurotransmissores (Glutamato, Substância P e PRGC), prevenção do aumento de TRPV 1 e isto resulta na inibição da sensibilização periférica. A inibição da sensibilização periférica reduz a transmissão de sinais nociceptivos dentro da medula espinal, o que resulta no decréscimo da expressão da proteína C-Fos na medula espinal e das repostas evocadas nas células WDR (wide dynamic range) do corno dorsal da medula espinal.¹⁶

A redução da entrada de estímulos nociceptivos a partir da periferia, pode também reduzir a liberação de Substância P e glutamato na medula espinal e assim reduz a sensibilização central e o processamento nociceptivo em nível espinal.¹⁶ Em síntese, a BoNT/A inibe a liberação dos neurotransmissores dos terminais periféricos dos neurônios sensoriais, reduzindo assim a dor inflamatória por via de inibição direta da sensibilização periférica e inibição indireta da sensibilização central.¹⁶ Uma vista geral do mecanismo de ação da BoNT/A no tratamento da dor é mostrada na Tabela 4.

Tabela 4
Mecanismos de ação da BoNT/A no tratamento da dor.²⁸

Mecanismo	Efeito
Bloqueio da inervação colinérgica	Redução da hiperatividade muscular por 3-6 meses Prevenção das mudanças degenerativas nos músculos Descompressão das fibras aferentes nociceptivas Dispersão dos pontos gatilho
Normalização da atividade do fuso muscular	Normalização do tonus muscular Modulação dos mecanismos de controle central da atividade muscular Eliminação de fatores de estresse muscular Eliminação de disfunção articular provocada por desequilíbrio muscular
Transporte retrógrados para o Sistema Nervoso Central	Estimulação da expressão da Substância P na medula espinal Estimulação da expressão de Encefalina na medula espinal Estimulação da Substância P nos núcleos da raiz (gerador da migração)
Inibição da inflamação estéril	Bloqueio da inflamação neurogênica como substrato patofisiológico da dor de cabeça primária Prevenção da sensibilização do sistema nociceptivo com o aumento da frequência de ataques de migração Prevenção da dor de cabeça induzida por drogas ou relacionada a medicamentos
Eliminação dos pontos gatilho musculares	Eliminação da isquemia relacionada à compressão Eliminação da disfunção do terminal nervoso Prevenção da degeneração muscular Redução dos mediadores inflamatórios

C. SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO

A atenção para os efeitos da toxina botulínica sobre o sistema nervoso autônomo é decorrente da própria sintomatologia clínica dos quadros de botulismo, que incluem sinais precoces de disautonomia como: sintomas visuais (borramento da visão, diplopia, presbiopia), boca seca e constipação. Em fases mais adiantadas podemos encontrar: perda do controle do reflexo vagal, hipotermia, retenção urinária, hipotensão sem taquicardia reflexa e depressão das respostas vasomotoras posturais.⁷

A utilização terapêutica da toxina botulínica do tipo A mostrou, por outro lado, que podemos encontrar como reações adversas, ao efeito de relaxamento dos músculos estriados, vários sintomas autônomos como: boca seca, diminuição da sudoração, diminuição do lacrimejamento, retenção urinária, diplopia e borramento da visão.²⁹

Baseado nestes achados passou-se a utilizar a BoNT/A em diferentes condições clínicas onde havia o envolvimento do Sistema Nervoso Autônomo (SNA) com hiperatividade de musculatura lisa como: acalasia de esôfago, disfunção do esfíncter de Oddi, disfunção do esfíncter anal, anismo, fissura anal, dissinergia do esfíncter urinário e hiperatividade detrusora entre outras.¹⁹ Além disto, o efeito colateral observado sobre glândulas (sudoríparas, salivares e lacrimais) induziu o raciocínio clínico para a utilização em situações de hipersecreção como hiperidrose, sialorréia e hiperlacrimação.¹⁹

Em todas estas patologias, mas especialmente nos casos de hiperidrose e de hiperatividade detrusora, observou-se que o tempo de duração dos efeitos da aplicação de toxina botulínica era mais longo, (6-11 meses, em relação aos observados no tratamento de músculos estriados envolvidos nos distúrbios do movimento).³⁰

Por outro lado, o mecanismo de ação da BoNT/A, somente baseado no bloqueio da liberação de acetilcolina, nos dá respostas limitadas para entendermos todos os seus efeitos fisiológicos e colaterais sobre o Sistema Nervoso Autônomo (SNA). Necessitamos voltar nossos olhos para a fisiologia do SNA e de seus neurotransmissores.

O SNA é um eferente do sistema motor que inerva células de músculos lisos de vários órgãos. No SNA a distribuição e função dos neurotransmissores colinérgicos é mais complicada que no sistema nervoso somático, especialmente para as glândulas sudoríparas e crinas; a transmissão colinérgica está presente somente em nível pré-ganglionar no braço ortossimpático

(sensório), enquanto que no braço parassimpático (motor) está presente em ambos os níveis pré e pós-ganglionar (Fig. 11).²²

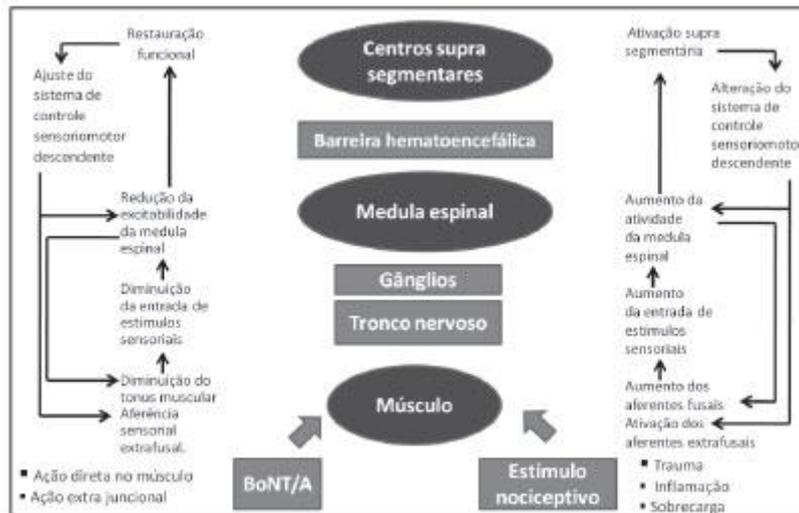


Figura 11. Diagrama esquemático do possível mecanismo de ação da BoNT/A sobre o sistema neuromuscular e o correspondente efeito sobre a dor produzida por estímulos nociceptivos de sobrecarga ou trauma.²²

OBS: A distinção anatômica entre os dois braços está relacionada com os diferentes comprimentos dos neurônios pós-ganglionares, que são mais longos no braço ortossimpático que no parassimpático. No braço parassimpático, o gânglio está próximo do órgão alvo (3). Para ambos os sistemas a acetilcolina (ACh) é o neurotransmissor da sinapse pré-ganglionar (1). A ACh é o neurotransmissor da sinapse pós-ganglionar no braço parassimpático e as fibras do braço ortossimpático nas glândulas sudoríparas e crinas (2, A). Todas as outras sinapses pós-ganglionares (B) do braço ortossimpático são noradrenérgicas (NA). Ambas as vias NA e ACh (NA+ACh) estão envolvidas na transmissão pós-ganglionar no nível da supra-renal (C).²²

Nas células dos músculos lisos dos vasos a acetilcolina provoca relaxamento das fibras musculares e vasodilatação com a produção de óxido nítrico, que é reconhecido como um pró-algênico (produtor de dor) envolvido na barreira aferente nociceptiva de ativação de padrões vasculares e associada ao sistema nervoso. Em contraste, em outros órgãos e sistemas (como o trato gastrointestinal e o músculo detrusor da bexiga) a acetilcolina causa a contração da musculatura lisa, como faz nos músculos estriados. A acetilcolina também leva a contração da musculatura lisa de células das glândulas salivares e sudoríparas.²²

Ação sobre glândulas (salivar, sudorípara e lacrimal)

A toxina botulínica pode ser utilizada no tratamento da hiperatividade de

músculos lisos. Ela também afeta os tecidos exócrinos glandulares, conseqüentemente pode afetar as fibras eferentes do sistema nervoso autônomo. A BoNT/A é conhecida também por bloquear os neurotransmissores colinérgicos no Sistema Nervoso Autônomo em ambos os níveis, efector e ganglionar. Assim ela tem sido utilizada para induzir a supressão colinérgica da glândula lacrimal, reduzindo o reflexo de lacrimejamento na Síndrome da Regeneração Aberrante do Nervo Facial.³¹

O bloqueio da salivação e da sudoração também tem sido demonstrado através dos anos como explicação para os efeitos autonômicos da injeção de BoNT/A. As glândulas sudoríparas écrinas tem um grande papel na termorregulação, mas também respondem a estímulos emocionais. Elas são inervadas por fibras simpáticas (ortossimpático) provenientes de nervos espinais

Em resposta ao estímulo nervoso, a acetilcolina é liberada do terminal pré sináptico do nervo e vai se ligar aos receptores colinérgicos pós-sinápticos localizados na membrana basolateral das glândulas écrinas. A ativação destes receptores irá desencadear um influxo de cálcio extracelular para o citoplasma da glândula e assim ativar uma "bomba osmolar". A ação desta bomba culminará com a despolarização da membrana apical da glândula, gerando um potencial negativo no lúmen, que por sua vez atrairá sódio (Na) para o seu interior. Este Na se juntará a moléculas de cloro (Cl) para formar cloreto de sódio (NaCl), que representa o fluido isotônico primário glandular. Este fluido primário sofrerá, na porção espiral do ducto glandular, uma reabsorção de sais objetivando a preservação de eletrólitos. Assim se forma o suor, uma secreção hipotônica que será lançada para a superfície da pele. A ação da BoNT/A bloqueando a liberação da acetilcolina quebra a cascata da formação do suor.³²

Outra ação, talvez a mais significativa, é a relativa aos efeitos autonômicos da toxina botulínica envolvendo a liberação de calor e vasodilatação após os exercícios. Estudos de Laser Doppler tem mostrado que o reflexo da vasodilatação pode ser bloqueado após o exercício,³³ porém utilizando anticolinérgicos não específicos (atropina), efeitos similares não puderam ser demonstrados, indicando que esta ação não usual da BoNT/A não pode ser explicada pela transmissão sináptica colinérgica neuromuscular ou tão pouco pela transmissão autonômica colinérgica. Estes efeitos da BoNT/A sugerem, mas não necessariamente provam, que outro transmissor ou co-transmissor pode ser responsável pelo efeito biológico da BoNT/A dentro do canal de desnervação criado pelo ponto de injeção.³¹

Alguns autores têm sugerido que o peptídeo intestinal vasoativo ou outros componentes relacionados podem ser efetivamente bloqueados pela BoNT/A.³³

Ação sobre a Bexiga e Próstata

Com o entendimento da patologia e fisiologia da hiperatividade detrusora, assim como das macromoléculas envolvidas, aliada ao fato das características específicas de duração de efeitos da BoNt/A sobre a bexiga e glândulas, mais uma vez seria muito simplista associar o mecanismo de ação da BoNt/A em patologias urológicas somente ao bloqueio da liberação de acetilcolina. Evidências sugerem que as vias sensoriais envolvidas no urotélio e sub-urotélio exerçam um significativo papel no mecanismo de coordenação da atividade da bexiga.³⁴

Além disto, a utilização da BoNt/A sobre a bexiga mostrou que não só induz o relaxamento do músculo detrusor, mas também aumenta a capacidade vesical, o volume na primeira contração reflexa do detrusor e a complacência vesical. Também são notadas mudanças na função do detrusor com diminuição das pressões durante as fases de enchimento e esvaziamento da bexiga. Estas alterações levam a significativas diferenças nos parâmetros urodinâmicos, melhorando a frequência e a incontinência dos pacientes tratados, além de provocar melhora na sensação física da urgência urinária.³⁵

A musculatura lisa do corpo da bexiga é innervada predominantemente por fibras colinérgicas enquanto que as fibras adrenérgicas se apresentam tanto no corpo como no colo vesical. No sub-urotélio vesical pode-se identificar um extenso plexo de nervos aferentes, logo abaixo da linha epitelial. A sensação de "bexiga cheia" é transmitida ao cérebro via medula espinal através de dois tipos de fibras: A δ mielínica, que são sensíveis a estímulos mecânicos; e fibras C, amielínicas e primariamente nociceptivas.³⁴

Na fisiopatologia da hiperatividade detrusora, pensando-se na innervação sub-urotelial, estão envolvidos diferentes mediadores químicos como: TRPV1 (receptor capsaicina), P2X₃ (receptor purinérgico), Substância P (neuropeptídeo sensorial) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (PRGC). Nos pacientes com hiperatividade detrusora nota-se um aumento de TRPV1 e P2X₃ caracterizando uma innervação sub-urotelial imunorreativa.³⁵ A ação destes neurotransmissores também impacta fortemente sobre a mecano-sensação da bexiga.

O urotélio da bexiga também representa a maior área de superfície não neural para a liberação de acetilcolina durante o enchimento vesical. A liberação de acetilcolina no urotélio aumenta com o estiramento do detrusor e acontece sobre os receptores muscarínicos das células do músculo liso, regulando o tonus da bexiga e ainda exercendo influência sobre os receptores sub-uroteliais.³⁴

A descoberta de miofibroblastos ou células intersticiais no suburotélio, extremamente ligadas por aberturas juncionais e que podem responder ao ATP de modo similar a ativação do ATP bloqueado nos receptores P2Y, conduzem ao raciocínio que estas células possam representar o substrato para um órgão

receptor ao estiramento (Fig.12).³⁵ Pacientes portadores de hiperatividade detrusora apresentam significativo aumento no número de fibras nervosas expressadas por TRPV1 e P2X₃ quando comparados com sujeitos normais. Também apresentam aumento na densidade da Substância P, e dos Fatores de Crescimento Neurogênico em fibras nervosas imunorreativas, que não podem ser explicadas pelo aumento da densidade nervosa.³⁴ A diminuição dos receptores sub-uroteliais P2X₃, induzida pela aplicação de BoNT/A, sugere um mecanismo de ação em parte aferente mediado e está relacionada com a melhora do sintoma de urgência urinária.^{34,36}

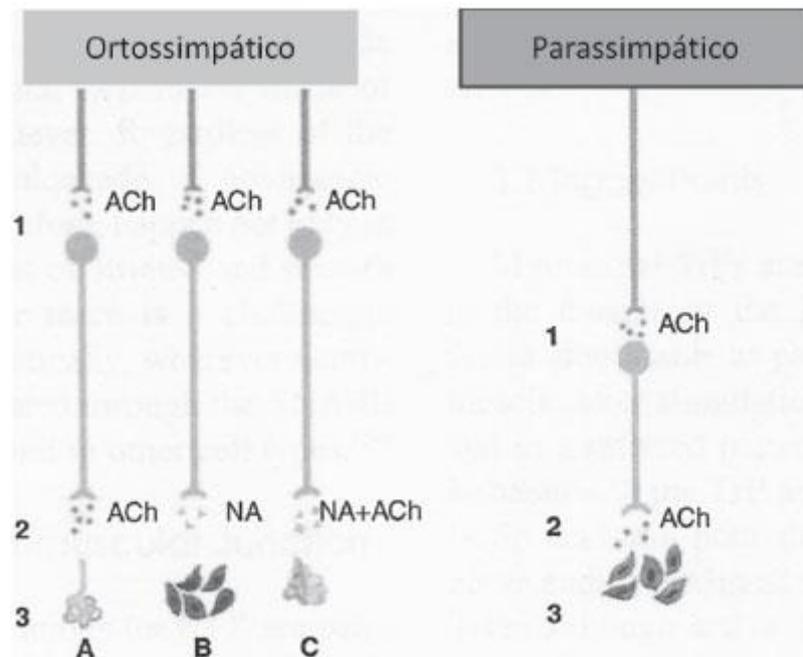


Figura 12. Divisão do Sistema Nervoso Autônomo em dois braços: ortossimpático e parassimpático

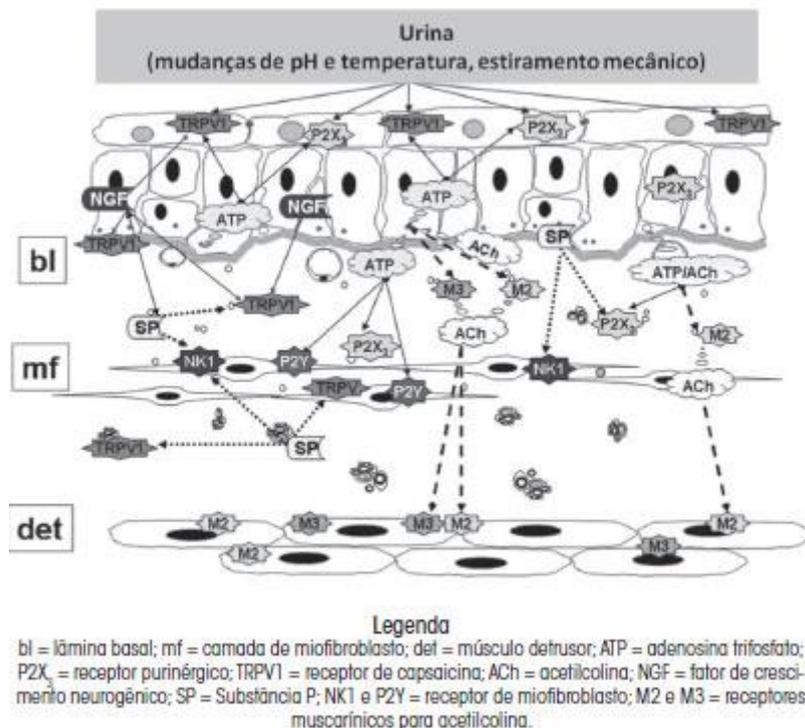


Figura 13. Mecanismo de ação em cascata proposto para a ação da toxina botulínica quando injetada intravesicalmente, através da múltipla inibição da liberação de neurotransmissores e de neuropeptídeos pelos nervos do urotélio e sub-urotélio reduzindo a expressão axonal do complexo SNARE dependente de proteínas que estariam envolvidas na mecâno-sensação da bexiga.³⁵

A BoNt/A sobre a bexiga tem mostrado uma significativa redução nos elevados níveis dos receptores sensoriais das fibras nervosas do sub-urotélio, mas não do urotélio, sem causar a degeneração das mesmas. Também não se notam alterações histológicas na densidade das fibras musculares, atrofia muscular, ou outra mudança degenerativa; além de existir poucas evidências em relação a brotamentos axonais neoformados. A falta de brotamentos axonais pode ser explicada pela diminuição nos níveis do fator de crescimento neurotrófico na bexiga após a aplicação de BoNt/A.³⁵ Estes fatos reforçam o conceito que o mecanismo de ação BoNt/A difere para músculos estriados e lisos.³⁴

A BoNt/A inibe a anormal liberação urotelial de ATP, reduz a contração do detrusor induzida pela capsaicina e inibe a liberação de fatores de crescimento neuronal na mucosa modulando os padrões vesicais através da inervação sensitiva.³⁴ Somando-se ao efeito direto sobre os nervos levando informações aferentes para a bexiga, a BoNt/A também exerce ação no detrusor através do bloqueio da função eferente dos nervos sensoriais.³⁴

Assim, o mecanismo de ação proposto em nível de bexiga inclui não só o bloqueio da liberação de acetilcolina, mas também bloqueio do ATP, substância P, e redução na expressão axonal de receptores purinérgicos e de

capsaicina.³⁷ Isto pode ser seguido de uma dessensibilização central através do decréscimo do aporte de substância P e de fatores neurotróficos. A somatória destes efeitos leva a uma duradoura inibição dos mecanismos aferentes e eferentes, que formam a base fisiológica para a sintomatologia da hiperatividade detrusora.³⁵

Próstata

A BoNT/A tem sido utilizada também sobre a próstata, para o tratamento das obstruções com ou sem hiperplasia. Os resultados mostram melhora nos sintomas, com diminuição do volume prostático, aumento do fluxo máximo, diminuição do resíduo urinário, e melhora nos índices de qualidade de vida.³⁰

O mecanismo de ação aventado para este fato é o aumento dos índices de apoptose e redução nos índices de proliferação celular, resultando em uma marcada redução do volume da glândula por atrofia. O aumento da apoptose ocorre também nos componente do estroma da glândula, porém como nem todos os pacientes tratados mostram uma redução do volume prostático, o mecanismo de ação da BoNT/A neste nível ainda é alvo de investigação.³⁰

Ainda a BoNT/A, em modelos animais, induz ao decréscimo de células inflamatórias e de marcadores como o COX-2,³⁸ o que suporta a teoria da sua utilização, de forma intraprostática, no tratamento de quadros de prostatite. A melhora dos níveis de PSA e aumento da apoptose também implicam na possibilidade de utilização no tratamento do câncer de próstata.^{39,40,41}

D. SISTEMA NERVOSO CENTRAL - EFEITOS DIRETOS E INDIRETOS

A toxina botulínica não pode atingir o Sistema Nervoso Central (SNC) por difusão; a barreira hematoencefálica impede. Devido ao fato da neurotoxina botulínica necessitar de meio ácido para a translocação da cadeia leve para o citoplasma da junção neuromuscular, e esta condição existe, provavelmente um possível transporte retrogrado fica dificultado¹⁰ e quando ocorre este seria predominantemente de metabolitos da toxina e não da porção ativa.^{22,28} Porém, continua incerto se a BoNT/A poderia ter um transporte retrógrado para o SNC através de certas populações de neurônios, apesar de ter sido demonstrado que fragmentos de toxina botulínica nos aferentes nociceptivos de gânglios das raízes dorsais podem inibir neurotransmissores, em particular a Substância P.²⁸

No entanto, alguns estudos sugerem o transporte retrogrado da toxina botulínica a partir da periferia para o SNC. A injeção de toxina botulínica marcada radiativamente mostrou ser detectável nas raízes espinais da medula após 48hs, o que explica o tempo de o início da redução dos sintomas dolorosos, falando clinicamente.⁴²

Recentemente, foi demonstrado um transporte retroaxonal e transcitósico, ou seja, a toxina não só se moveu sobre o nervo ao qual se conectou através da junção neuromuscular, mas passou para as próximas sinapses medulares e centrais.⁴³ Porém, os autores deste estudo notaram que esta migração da toxina ficou limitada às células de projeção cerebral do músculo alvo, podendo teoricamente potencializar o efeito local da injeção.⁴⁴ Em outro estudo a injeção de BoNT/A na musculatura extraocular de gatos mostrou alterações nos padrões dos motoneurônios tanto do lado ipsi-lateral como do lado contralateral ao injetado.^{45,46} Modificações morfológicas na organização sináptica ao redor dos motoneurônios e muitas mudanças no sistema motor (incluindo níveis corticais) também têm sido reportadas, porém todas parecem ser ações indiretas. Para uma ação direta da BoNT/A sobre o SNC seria necessário haver uma falha na barreira hematoencefálica, como fenestras capilares por onde ela entraria. Isto poderia explicar alguns fenômenos autônomos eventualmente observados como midríase, alterações vasculares e cardíacas.³¹

Em resumo, apesar dos diferentes achados experimentais, até o momento não podemos excluir a hipótese que as alterações notadas no SNC sejam resultado indireto das alterações sensório-motoras induzidas pela ação periférica da BoNT/A.⁷

CONSIDERAÇÕES

GERAIS

Antigenicidade

Desde que as toxinas botulínicas são proteínas estranhas ao organismo humano, anticorpos podem ser formados contra a porção tóxica ou contra as suas proteínas não tóxicas. A exposição a antígenos de toxina botulínica estimulam uma resposta imune ativando linfócitos B e T, células de memória imune, formação de citoquinas e finalmente a formação de anticorpos.¹⁵

Os anticorpos bloqueiam a atividade biológica e induzem a falha terapêutica. Estes anticorpos são chamados *neutralizantes ou bloqueadores*. Os anticorpos formados contra as porções protéicas não tóxicas são chamados *não neutralizantes*.⁹ Os anticorpos neutralizantes se ligam aos antígenos da toxina botulínica diminuindo sua efetividade e as células de memória irão ser acionadas provocando respostas imunes em aplicações seqüenciais. Este fato tem alta relevância clínica uma vez que repetidas aplicações são normalmente necessárias para o tratamento de afecções crônicas.¹⁵

Os fatores de risco para a falha terapêutica associada a anticorpos, incluem a dose de tratamento e o intervalo entre as aplicações sucessivas. A importância da dose reside na correlação com a carga protéica injetada, e este fato está relacionado com a formulação utilizada. O risco não está associado á atividade biológica *per si*, mas com a quantidade e a freqüência com que o antígeno se

apresenta ao sistema imune.⁹

Quando uma toxina é fabricada e estocada mudanças na sua conformação podem levar a inativação parcial de moléculas. A inativação leva á perda da atividade biológica, mas o potencial imune é mantido e conseqüentemente pode haver a indução da formação de anticorpos. Assim, a quantidade de toxina inativa contida em uma preparação determina seu potencial imunogênico. A relação entre a potência biológica e quantidade de neurotoxina é chamada de "atividade biológica específica" e é utilizada como parâmetro para a determinação da qualidade imunológica de uma preparação terapêutica.⁹

Outro fator de risco para a falha terapêutica é a reagibilidade do sistema imune, e esta é uma característica individual, fatores de risco ainda incluem a imunocompetência do tecido injetado e o sexo feminino. Dose cumulativa, tempo de tratamento e idade não tem se mostrado como fatores de risco.⁹

Um conceito adicional, no que tange a formação de anticorpos, é que o fenômeno de reação cruzada pode ocorrer entre os sorotipos de toxina botulínica e com a neurotoxina do tétano. Também a formação de anticorpos contra um segundo sorotipo é mais rápida quando já pré existem anticorpos contra outro sorotipo.^{15,21} Em sendo a formação de anticorpos um problema em potencial para a terapêutica com toxina botulínica, a sua formação deve ser evitada através a utilização da menor dose terapêutica possível, associada ao maior intervalo entre duas aplicações.^{15,21}

Início e duração de ação

A BoNT/A quando injetada no músculo estriado inicia seu efeito de parestesia normalmente entre o 2-5 dia e este persiste por 2-3 meses quando gradualmente acontece uma recuperação. Quando são formados anticorpos antitoxina botulínica, a duração de ação e a extensão do efeito máximo terapêutico tendem a diminuir (falha parcial) antes que haja a falha total no tratamento. A duração de ação pode variar entre pacientes que sofrem da mesma patologia e entre pacientes que sofrem de diferentes condições patológicas. Quando o mesmo paciente é tratado com os mesmos parâmetros e não desenvolveu anticorpos, os efeitos tendem a ser estáveis.¹⁹

Correlação dose-intensidade de resposta

Existe correlação entre a dose e a extensão da parestesia provocada. Por outro lado, uma dose relativamente baixa de BoNT/A pode provocar uma parestesia substancial. A observação das curvas dose-resposta podem ser úteis para a otimização da utilização da toxina.¹⁹

Correlação dose-duração de resposta

Existe também uma correlação entre a dose e a duração da resposta terapêutica. Porém esta correlação é mais forte quando baixas doses da toxina são utilizadas; com altas doses a duração de efeitos parece ser saturada em 3 meses (para músculos esqueléticos).¹⁹

Efeito da diluição

Está estabelecido que o aumento da diluição favorece a dispersão da toxina no músculo alvo e este fato impactará nos efeitos terapêuticos e nas reações adversas. Porém, não está até o momento estabelecido qual seria a relação de diluição ótima para cada aplicação da BoNT/A.¹⁹

Atrofia muscular

Quando injetada em músculos hiperativos, a paresia induzida pela BoNT/A provoca uma redução no diâmetro das fibras musculares do músculo alvo. Quando existe uma hipertrofia muscular a BoNT/A normaliza o tamanho do músculo. Se administrada por um longo período de tempo, a BoNT/A pode induzir a atrofia focal, porém este não é um efeito obrigatório.¹⁹

Direções Futuras

Atualmente, existe uma grande preocupação relacionada com bioterrorismo. O tratamento clássico, com terapia de suporte e anti-soro polivalente de cavalo, não seria suficientemente eficaz em termos de saúde pública, em uma situação de calamidade. Desta forma, vacinas estão sendo desenvolvidas para promover a proteção imune das populações. Vacinas recombinantes utilizando os domínios de ligação das toxinas ou holotoxinas inativas ou ainda as cadeias pesadas na forma de administração oral ou nasal estão em investigação.^{6,12}

A vacinação protege contra a exposição sistêmica á neurotoxina botulínica, mas também impede a sua utilização terapêutica. Uma alternativa para esta situação seria a utilização de anticorpos humanos monoclonais, porém esta opção é muito custosa economicamente.^{6,12}

Outra possibilidade é a reversão dos sintomas de botulismo através da inativação precoce da cadeia leve da toxina botulínica. Deste modo, a atividade enzimática da cadeia leve seria bloqueada aos primeiros sintomas de botulismo e assim a duração destes sintomas seria encurtada. Estes inibidores específicos estão sendo desenvolvidos para os sorotipos A e B das neurotoxinas botulínicas.^{6,12}

A possibilidade da utilização de fragmentos das neurotoxinas botulínicas é muito estimulante. Por exemplo, aproveitar as propriedades das neurotoxinas em transportar grandes polipeptídios através das membranas pode ser útil para fazer chegar fármacos a alvos celulares. Também a utilização das bactérias *C.*

botulinum para o tratamento de câncer, onde bactérias apatogênicas poderiam colonizar áreas hipóxicas dos tumores e serem úteis para transportar drogas anticâncer especificamente para as células tumorais.⁸

CONCLUSÕES

Apesar das condições patológicas, que levam a alteração do tonus muscular e a distúrbios do movimento serem as indicações mais importantes para a utilização terapêutica da toxina botulínica, as suas propriedades de modificar o controle colinérgico do sistema vascular e as funções autônomas, a tem projetado no sentido do tratamento de outras e diferentes condições clínicas, como a hiperidrose e a hiperatividade detrusora.

Também a toxina botulínica afetando as fibras sensoriais intrafusais aferentes envolvidas no controle colinérgico dos γ -motoneurônios mostra que pode influenciar, mesmo que indiretamente, nos sistemas nociceptivo e antinociceptivo.

Ainda a toxina botulínica atuando sobre outros neurotransmissores, que não a acetilcolina, pode induzir uma sensibilização periférica, que levará a mudanças periféricas e centrais. Ela ainda é capaz de reduzir a dor neurogênica inflamatória e sendo transportada no nervo periférico, diretamente influencia a produção de Substância P, em nível dos gânglios dorsais, e assim adiciona mais um fator de inibição á hiperexcitabilidade medular. A toxina botulínica também pode afetar as funções neuronais centrais corticais supra-segmentares, mas este é provavelmente um efeito indireto.

Em situações específicas, como na dor neuropática ou durante a fase de inflamação neurogênica, as características de afinidade da toxina botulínica parecem ficar aumentadas, facilitando a sua interação com outras estruturas não colinérgicas, como é o caso dos aferentes nociceptivos.

Assim a toxina botulínica continua a despertar um grande interesse no meio médico e científico. À medida que sua estrutura e modo de ação têm sido dissecados" e "ampliados", novas indicações e usos têm sido aventados; incluindo vacinas, inibidores sorotipo específicos e formulações terapêuticas.

A sua utilização clínica requer do médico conhecimento da doença, da anatomia, da fisiologia, da farmacologia e da farmacocinética, porém a sua adequada utilização pode promover o alívio dos sintomas de diferentes pacientes, em diferentes indicações por vários meses.

A toxina botulínica, como previsto por Paracelsus e Kerner,^{6,12} tem demonstrado ser um poderoso veneno e um agente terapêutico de sucesso: tudo é uma questão de dose.

REFERÊNCIAS

1. Poli MA, Lebeda FJ. An overview of clostridial neurotoxins. In: Massaro EJ. Handbook of neurotoxicology. Totowa: Human Press; 2002. p. 293-304.
2. Hicks RP, Hartell MG, Nichols DA, Bhattacharjee AK, van Hamont JE, Skillman DR. The medicinal chemistry of botulinum, ricin and anthrax toxins. *Curr Med Chem.* 2005;12(6):667-90.
3. Middlebrook JL, Franz DR. Botulinum Toxin. In: Sidell FR, Takafuji ET, Franz DR. Textbook of Military Medicine. Falls Church: Office of the Surgeon General, US Army; 1997. p 643-54.
4. Smart JK. History of chemical and biological warfare: an American perspective. In: Sidell FR, Takafuji ET, Franz DR. Textbook of Military Medicine. Falls Church: Office of the Surgeon General, US Army; 1997. p 9-86.
5. Jankovic J. Botulinum toxin in clinical practice. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2004;75(7):951-7.
6. Aoki KR. Botulinum toxin: a successful therapeutic protein. *Curr Med Chem.* 2004;11(23):3085-92.
7. Poulain B, Popoff MR, Molgó J. How do the botulism neurotoxins block neurotransmitter release: from botulism to the molecular mechanism of action. *The Botulinum J.* 2008;1(1):14-87.
8. Turton K, Chaddock JA, Acharya KR. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. *Trends Biochem Sci.* 2002;27(11):552-8.
9. Dressler D, Benecke R. Pharmacology of therapeutic botulinum toxin preparations. *Disabil Rehabil.* 2007;29(23):1761-8.
10. Meunier FA, Herreros J, Schiavo G, Poulain B, Molgó J. Molecular mechanism of action of botulinum neurotoxins and the synaptic remodeling they induce in vivo at skeletal neuromuscular junction. In: Massaro EJ. Handbook of neurotoxicology. Totowa: Human Press; 2002. p 305-47.
11. Popoff MR, Marvaud JC, Raffestin S. Mechanism of action and therapeutic uses of botulinum and tetanus neurotoxins. *Ann Pharm Fr.* 2001;59(3):176-90.
12. Aoki KR. Pharmacology of Botulinum neurotoxins. *Oper Tech Otolaryngol*

- Head Neck Surg. 2004;15(2):81-5.
13. Silberstein S. Botulinum neurotoxins: origins and basic mechanisms of action. Pain Pract. 2004;4 Suppl 1:S19-26.
14. Frenkl TL, Rackley RR. Injectable neuromodulatory agents: botulinum toxin therapy. Urol Clin North Am. 2005;32(1):89-99.
15. Wenzel RG. Pharmacology of botulinum neurotoxin serotype A. Am J Health Syst Pharm. 2004;61(22 Suppl 6):S5-10.
16. Aoki KR. Review of a proposed mechanism for the antinociceptive action of botulinum toxin type A. Neurotoxicology. 2005;26(5):785-93.
17. Lipham WJ. What is botulinum toxin and how does it works? In: Lipham WJ. Cosmetic and clinical application of Botulinum Toxin. Thorofare: Slack; 2004. p. 5-9.
18. Paiva A, Meunier FA, Molgó J, Aoki KR, Dolly JO. Functional repair of motor end-plates after botulinum neurotoxin type A poisoning: biphasic switch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals. Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96(6):3200-5.
19. Dressler D, Saberi FA, Barbosa ER. Botulinum toxin: mechanisms of action. Arq Neuropsiquiatr. 2005;63(1):180-5.
20. Yoshida K, Kaji R, Kubori T, Kohara N, Iizuka T, Kimura J. Muscle afferent block for the treatment of oromandibular dystonia. Mov Disord. 1998;13(4):699-705.
21. Aoki KR. Pharmacology and immunology of botulinum toxin serotypes. J Neurol. 2001;248 Suppl 1:3-10.
22. Casale R, Tugnoli V. Botulinum toxin for pain. Drugs R D. 2008;9(1):11-27.
23. Welch MJ, Purkiss JR, Foster KA. Sensitivity of embryonic rat dorsal root ganglia neurons to Clostridium botulinum neurotoxins. Toxicon. 2000;38(2):245-58.
24. Durham PL, Cady R, Cady R. Regulation of calcitonin gene-related peptide secretion from trigeminal nerve cells by botulinum toxin type A: implications for migraine therapy. Headache. 2004;44(1):35-42.
25. Cui M, Khanijou S, Rubino J, Aoki KR. Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduces formalin-induced pain. Pain. 2004;107(1-2):125-33.

26. Cui M, Aoki KR. Mechanisms of antinociceptive effect of subcutaneous Botox: inhibition of peripheral and central nociceptive processing. In: Olesen J, Silberstein SD, Tfelt-Hansen P. Preventive pharmacotherapy of headache disorders. Oxford: Oxford University Press; 2004. p.158-62.
27. Morenilla CP, Planells RC, Garcia NS, Ferrer AM. Regulated exocytose contributes to protein kinase C potentialization of vanilloid receptor activity. J Biol Chem. 2004;279:2566-72.
28. 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; 2003. p.14-22.
29. Dressler D, Benecke R. Autonomic side effects of botulinum toxin type B treatment of cervical dystonia and hyperhidrosis. Eur Neurol. 2003;49(1):34-8.
30. Apostolidis A, Fowler CJ. The use of botulinum neurotoxin type A (BoNTA) in urology. J Neural Transm. 2008;115(4):593-605.
31. Borodic GE, Acquadro M, Johnson EA. Botulinum toxin therapy for pain and inflammatory disorders: mechanisms and therapeutic effects. Expert Opin Investig Drugs. 2001;10(8):1531-44.
32. Kreyden OP, Scheidegger EP. Anatomy of the sweat glands, pharmacology of botulinum toxin, and distinctive syndromes associated with hyperhidrosis. Clin Dermatol. 2004;22(1):40-4.
33. Kellogg DL Jr, Pégola PE, Piest KL, Kosiba WA, Crandall CG, Grossmann M, et al. Cutaneous active vasodilation in humans is mediated by cholinergic nerve cotransmission. Circ Res. 1995;77(6):1222-8.
34. Apostolidis A, Haferkamp A, Aoki KR. Understanding the role of botulinum toxin A in the treatment of the overactive bladder-more than just muscle relaxation. Eur Urol. 2006;Suppl 5:670-8.
35. Apostolidis A, Dasgupta P, Fowler CJ. Proposed mechanism for the efficacy of injected botulinum toxin in the treatment of human detrusor overactivity. Eur Urol. 2006;49(4):644-50.
36. Sahai A, Khan MS, Le Gall N, Dasgupta P; GKT Botulinum Study Group. Urodynamic assessment of poor responders after botulinum toxin-A treatment for overactive bladder. Urology. 2008;71(3):455-9.
37. Lemack GE. Intradetrusor botulinum toxin injections for neurogenic overactive bladder: are we there yet? Eur Urol. 2008;53(2):240-1.

38. Chuang YC, Yoshimura N, Wu M, Huang CC, Chiang PH, Tyagi P, et al. Intraprostatic capsaicin injection as a novel model for nonbacterial prostatitis and effects of botulinum toxin A. *Eur Urol.* 2007;51(4):1119-27.
39. Maria G, Brisinda G, Civello IM, Bentivoglio AR, Sganga G, Albanese A. Relief by botulinum toxin of voiding dysfunction due to benign prostatic hyperplasia: results of a randomized, placebo-controlled study. *Urology.* 2003;62(2):259-64.
40. Chuang YC, Chiang PH, Huang CC, Yoshimura N, Chancellor MB. Botulinum toxin type A improves benign prostatic hyperplasia symptoms in patients with small prostates. *Urology.* 2005;66(4):775-9.
41. Chuang YC, Tu CH, Huang CC, Lin HJ, Chiang PH, Yoshimura N, et al. Intraprostatic injection of botulinum toxin type-A relieves bladder outlet obstruction in human and induces prostate apoptosis in dogs. *BMC Urol.* 2006;6:12.
42. Wiegand H, Erdmann G, Wellhöner HH. ¹²⁵I-labelled botulinum A neurotoxin: pharmacokinetics in cats after intramuscular injection. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1976;292(2):161-5.
43. Antonucci F, Rossi C, Gianfranceschi L, Rossetto O, Caleo M. Long-distance retrograde effects of botulinum neurotoxin A. *J Neurosci.* 2008;28(14):3689-96.
44. Kuehn BM. Studies, reports say botulinum toxins may have effects beyond injection site. *JAMA.* 2008;299(19):2261-3.
45. Moreno-López B, de la Cruz RR, Pastor AM, Delgado-García JM. Botulinum neurotoxin alters the discharge characteristics of abducens motoneurons in the alert cat. *J Neurophysiol.* 1994;72(4):2041-4.
46. Moreno-López B, de la Cruz RR, Pastor AM, Delgado-García JM. Effects of botulinum neurotoxin type A on abducens motoneurons in the cat: alterations of the discharge pattern. *Neuroscience.* 1997;81(2):437-55.