



**FACULDADE SETE LAGOAS - FACSETE**

**LÍVIA ARAUJO ALVES**

**ESTRUTURA MOLECULAR E EFEITOS CLÍNICOS DAS PRINCIPAIS  
TOXINAS BOTULÍNICAS DO TIPO A (TXB/A): *scoping review***



**LÍVIA ARAUJO ALVES**

**ESTRUTURA MOLECULAR E EFEITOS CLÍNICOS DAS PRINCIPAIS  
TOXINAS BOTULÍNICAS DO TIPO A (TXB/A): *scoping review***

Monografia apresentada ao curso de Especialização *Lato Sensu* da FACULDADE SETE LAGOAS - FACSETE, como requisito parcial para obtenção do título de **Especialista em Harmonização Orofacial**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Maria Altavista Romão

São Paulo - SP

2023

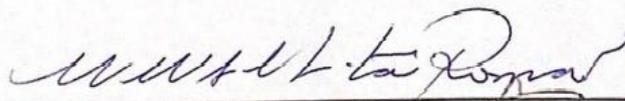
LÍVIA ARAUJO ALVES

**ESTRUTURA MOLECULAR E EFEITOS CLÍNICOS DAS PRINCIPAIS  
TOXINAS BOTULÍNICAS DO TIPO A (TXB/A): *scoping review***

Monografia apresentada ao curso de especialização *Lato Sensu* da Faculdade Sete Lagoas - FACSETE, como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Harmonização Orofacial

Área de concentração Harmonização Orofacial

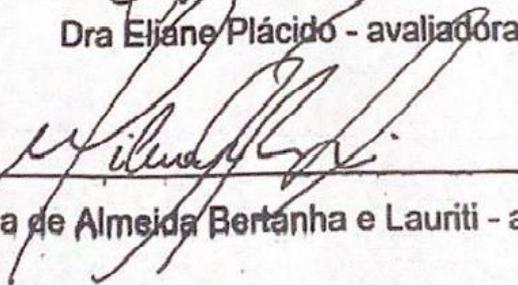
Aprovada em 30/06/2023 pela banca constituída dos seguintes professores:



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia Maria Altavista Romão – Orientadora



Dra Eliane Plácido - avaliadora



Milena de Almeida Bertanha e Lauriti - avaliadora

## RESUMO

A toxina Botulínica (TxB) é uma neurotoxina produzida pela bactéria *Clostridium botulinum*, sendo a toxina botulínica do tipo A (TxB/A) a mais estudada e aplicada clinicamente. O mecanismo de ação da TxB ocorre pela inibição da liberação da acetilcolina nos terminais nervosos motores levando a uma diminuição da contração muscular. Atualmente, as 7 marcas comerciais disponibilizadas no mercado brasileiro são do TxB/A. Embora todas as TxB/A possuam o mesmo mecanismo de ação, sua composição estrutural, proteínas acessórias e potência variam substancialmente, refletindo em efeitos clínicos e tempo de duração diferente após sua aplicação. Sendo assim, esse trabalho visa discutir e trazer evidências por meio de uma *scooping review* sobre as principais diferenças na estrutura molecular, no mecanismo de ação e nos efeitos clínicos, entre as TxB/A ONA (Botox®), ABO (Dysport®) e INCO (Xeomin®). Foram incluídos nessa revisão de escopo 63 artigos sobre esse tema, publicados na Pubmed, Scopus, Web of Science, sendo que destes, 16 foram estudos clínicos randomizados que compararam o efeito clínico dessas toxinas quando aplicadas em rugas faciais. Dentre os estudos clínicos analisados, a toxina mais frequente nos para aplicação em rítes faciais foi a ONA (10 estudos), seguidos da INCO (6 estudos) e ABO (6 estudos). O local de aplicação mais estudado foi as rugas glabellares. Apenas 2 estudos avaliaram simultaneamente o efeito das três toxinas, sendo que um estudo não mostrou diferença de efeito entre as toxinas e o outro estudo mostrou que a INCO teve menor tempo de duração, o que pode ser explicado pela menor concentração da molécula ativa da INCO-TxB/A contida em 100 U (2,25 e 3,37 vezes menos TxB/A ativa), quando comparado a ONA e ABO-TxB/A, respectivamente. Pode-se concluir que existem diferenças nas formulações entre as moléculas da TxB/A ONA, ABO e INCO, sendo assim suas doses não podem ser intercambiáveis. O conhecimento das diferenças na concentração de molécula ativa da TxB/A entre as principais marcas comerciais pode ajudar o profissional na escolha da toxina e na dose de aplicação.

**Palavras-chave:** Toxinas Botulínicas Tipo A; *Clostridium botulinum*; Estrutura molecular.

## ABSTRACT

Botulinum toxin (BoNT) is a neurotoxin produced by the bacterium *Clostridium botulinum*, with botulinum toxin type A (BoNT/A) being the most studied and clinically applied. The mechanism of action of BoNT occurs by inhibiting the release of acetylcholine in motor nerve endings, leading to a decrease in muscle contraction. Currently, the 7 trademarks available in the Brazilian market belong to BoNT/A. Although all BoNT/A have the same mechanism of action, their structural composition, accessory proteins and potency vary substantially, reflecting on clinical effects and different duration of time after application. Therefore, this work aims to discuss and bring evidence through a scoping review on the main differences in molecular structure, mechanism of action and clinical effects, between BoNT/A ONA (Botox®), ABO (Dysport®) and INCO (Xeomin®). This scope review included 63 articles on this subject, published in Pubmed, Scoopus, Web of Science, and of these, 16 were randomized clinical studies that compared the clinical effect of these toxins when applied to facial wrinkles. Among the clinical studies analyzed, the most frequent toxin for application in facial rhytides was ONA (10 studies), followed by INCO (6 studies) and ABO (6 studies). The most studied application site was the glabella wrinkles. Only 2 studies simultaneously evaluated the effect of the three toxins, one study showing no difference in effect between the toxins and the other study showing that INCO had a shorter duration, which can be explained by the lower concentration of the active INCO molecule - BoNT/A contained in 100U (2.25 and 3.37 times less active BoNT/A), when compared to ONA and ABO- BoNT/A, respectively. It can be concluded that there are differences in the formulations between the molecules of BoNT/A ONA, ABO and INCO, therefore their doses cannot be interchanged. Knowledge of the difference in the concentration of the active BoNT/A molecule between the main commercial brands can help the professional in choosing the toxin and in the application dose.

**Keywords:** Botulinum Toxins, Type A; *Clostridium botulinum*; Molecular structure.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Fluxograma da estratégia de busca PCC .....	11
Figura 2 - Estrutura molecular da proteína da toxina botulínica A (TxB/A).....	14
Figura 3 - Mecanismo de ação da toxina botulínica na junção neuromuscular.....	16

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Principais diferenças entre as formulações das toxinas.....	19
Tabela 2 - Dados coletados dos estudos clínicos com as TxB/A: ONA (Botox®), ABO (Dysport®) e INCO (Xeomin®).....	25

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

TxB: toxina botulínica

TxB/A: toxina botulínica do tipo A

ONA: OnabotulinumtoxinA; OnatoxinabotulínicaA.

ABO: abobotulinumtoxinA; OnatoxinabotulínicaA.

INCO: IncobotulinumtoxinA; IncotoxinabotulínicaA

CL: cadeia leve

CP: cadeia pesada

CP-N: domínio N terminal da cadeia pesada

CP-C: domínio C terminal da cadeia pesada

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2. PROPOSIÇÃO</b> .....	9
<b>3. PROCEDIMENTO METODOLÓGICO</b> .....	9
<b>4. REVISÃO DE ESCOPO</b> .....	12
4.1 Características gerais e composição estrutural da toxina botulínica.....	12
4.2. Mecanismo de ação da toxina botulínica.....	14
4.3 Diferenças estruturais na molécula da TxB/A entre as marcas comerciais.....	17
4.4 Alterações na molécula da TxB/A e seus diferentes efeitos clínicos.....	20
4.5 Analisando os estudos clínicos com as TxB/A: ONA (Botox®), ABO (Dysport®) e INCO (Xeomin®).....	23
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	27
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	30
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	31

## 1. INTRODUÇÃO

A toxina botulínica (TxB) é um grupo de proteínas produzidas como produto da fermentação da bactéria anaeróbia *Clostridium botulinum*. A TxB, uma das mais potentes toxinas bacterianas conhecidas, é capaz de alterar o funcionamento neuronal e, conseqüentemente, afetar a contração muscular (ROSSETTO; PIRAZZINI; MONTECUCCO, 2014; WENZEL, 2004).

Até o momento, oito sorotipos imunologicamente distintos da toxina botulínica foram identificados. Destes, sete sorotipos: A, B, C1, D, E, F e G são neurotoxinas (SETLER, 2002). A toxina botulínica do Tipo A (TxB/A) é o sorotipo mais amplamente estudado para o propósito terapêutico e estético, sendo a mais comercializada e uma das mais utilizadas no Brasil (CAMARGO *et al.*, 2021).

A TxB é uma neurotoxina que possui alta afinidade pelas sinapses colinérgicas, ocasionando um bloqueio na liberação de acetilcolina desses terminais nervosos sem, contudo, alterar a condução neural de sinais elétricos e/ou a síntese e armazenamento de acetilcolina (DRESSLER; BENECKE, 2007; SCHIAVO; MATTEOLI; MONTECUCCO, 2000). A aplicação local intramuscular da TxB é seguida de difusão rápida no espaço intersticial, depositando-se, especificamente, nas terminações nervosas motoras dos músculos esqueléticos (junção neuromuscular), levando a inibição da liberação de acetilcolina, tendo como consequência diminuição da contração muscular (DRESSLER; SABERI; BARBOSA, 2005; GART; GUTOWSKI, 2016).

Diferentes formulações da toxina botulínica tipo A são utilizadas na prática clínica. Atualmente, existem no mercado brasileiro 7 marcas comerciais disponíveis, sendo a ONA-TxB/A (Botox®), a ABO-TxB/A (Dysport®) e a INCO-TxB/A (Xeomin®), as mais utilizadas e estudadas (FIELD *et al.*, 2018). Embora todas TxB/A compartilhem o mesmo mecanismo de ação, inibindo a liberação de acetilcolina na terminação nervosa, a estrutura molecular, as proteínas acessórias e as propriedades farmacológicas demonstram algumas diferenças entre as formulações, fazendo com que suas potências variem substancialmente (BAKSHI; HARTSTEIN, 2011; CAR *et al.*, 2021).

A bioequivalência de dose entre as diferentes formulações da TxB/A tem sido discutida desde o início do seu uso clínico (CAR *et al.*, 2021), uma vez que clinicamente observa-se diferença nos efeitos clínicos e tempo de duração após a

aplicação da diferentes marcas comerciais da TxB/A (ELRIDY; ZAKI; ELSHINAWY, 2018; THOMAS *et al.*, 2018). Assim, as diferenças na estrutura da molécula da TxB/A entre as marcas comerciais podem refletir nos diferentes efeitos clínicos observados.

Sendo assim, esse trabalho irá discutir e trazer evidências por meio de uma *scoping review* sobre as principais diferenças na estrutura molecular, no mecanismo de ação e nos efeitos clínicos, entre as TxB/A ONA (Botox®), ABO (Dysport®) e INCO (Xeomin®). Foram incluídos nessa revisão de escopo 63 artigos sobre esse tema, publicados na *Pubmed*, *Scopus* e *Web of Science*, sendo que destes, 16 foram estudos clínicos randomizados que compararam o efeito clínico dessas toxinas quando aplicadas em rugas faciais.

## 2. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho é discutir e abordar as diferenças estruturais na molécula e nas formulações da toxina botulínica tipo A (TxB/A) entre as principais marcas comerciais e avaliar, por meio de uma revisão de escopo de estudos clínicos já publicados, se essas diferenças podem influenciar no tempo de ação e efeito dessas toxinas quando utilizada para fins estéticos em ríntides faciais.

## 3. PROCEDIMENTO METODOLÓGICO

Esse estudo utilizou como procedimento metodológico uma revisão de escopo (*scoping review*) para mapear na literatura as diferenças estruturais na molécula da toxina botulínica tipo A (TxB/A) entre as principais marcas comerciais disponíveis, e assim avaliar com base nos artigos publicados, se a diferença na estrutura molecular e nas formulações influencia no tempo de ação e duração do efeito das toxinas após sua aplicação estética em ríntides faciais.

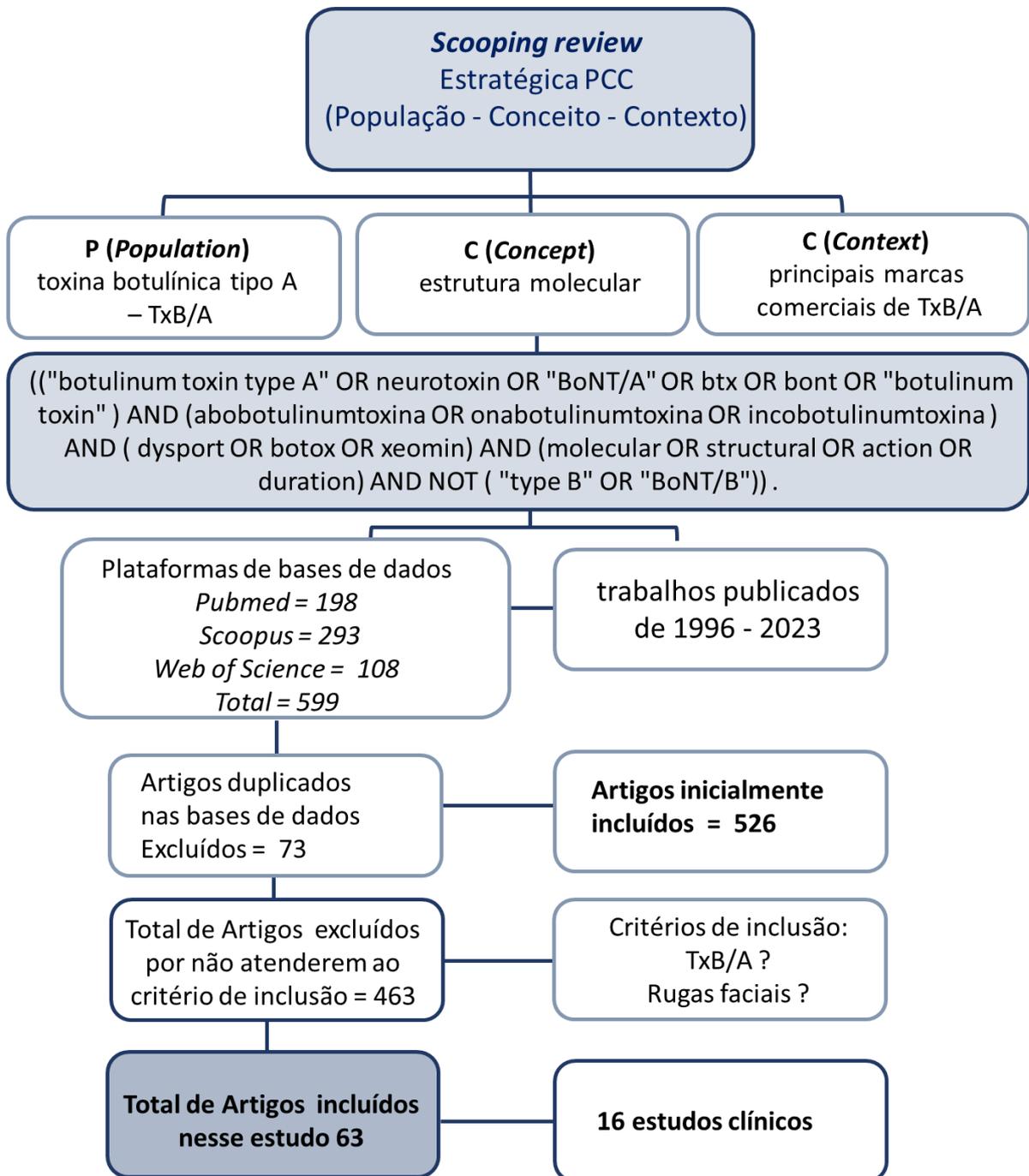
A primeira etapa da revisão de escopo consiste na elaboração da pergunta de pesquisa utilizando a estratégica PCC (População - Conceito - Contexto). Assim, a pergunta de pesquisa foi formulada utilizando o acrônimo *Population, Concept e Context* (PCC). Foi definido: P (*Population*) como toxina botulínica tipo A – TxB/A, C (*Concept*) estrutura molecular e C (*Context*) principais marcas comerciais de TxB/A. A estratégica PCC é utilizada para construir a pergunta de pesquisa na revisão de escopo, ajudando na estratégia de busca (“The Joanna Briggs Institute.”, 2015).

Sendo assim, foram elaboradas as seguintes perguntas de pesquisa: “Existe diferença na composição estrutural na molécula da toxina botulínica tipo A entre as marcas comerciais? As diferenças estruturais na molécula da toxina podem levar a diferentes efeitos terapêuticos? Por que algumas toxinas têm ação mais rápida e duram mais que outras mesmo quando aplicadas o mesmo número de unidades? Existe bioequivalência de dose entre as diferentes toxinas? As doses entre as diferentes toxinas são intercambiáveis?”

Como estratégia de pesquisa aplicou-se a coleta de artigos em plataformas virtuais internacionais, como *Pubmed*, *Scopus* e *Web of Science*. Para seleção dos artigos o pesquisador selecionou descritores (palavras-chave) que se enquadrassem na estratégia PCC, elegendo descritores que deveriam aparecer no conteúdo dos estudos. Junto aos descritores foram empregados os termos booleanos: AND, OR e NOT para unir e/ou excluir os descritores a serem utilizados na busca das bases de dados.

Assim, foi utilizado a estratégia de busca avançada nas plataformas de base de dados utilizando os termos: (“botulinum toxin type A” OR neurotoxin OR “BoNT/A” OR btx OR bont OR “botulinum toxin”) AND (abobotulinumtoxina OR onabotulinumtoxina OR incobotulinumtoxina) AND ( dysport OR botox OR xeomin) AND (molecular OR structural OR action OR duration) AND NOT (“type B” OR “BoNT/B”)).

Os artigos foram buscados nas plataformas de bases de dados *Pubmed*, *Scopus* e *Web of Science* com trabalhos publicados de 1996 até o ano de 2023, totalizando 526 artigos, sendo que desses, apenas 63 foram incluídos nesse estudo por atenderem aos critérios de inclusão da estratégia de busca. O fluxograma da metodologia de busca de artigos deste estudo está demonstrado na Figura 1.



**Figura 1:** Fluxograma de estratégia de busca e artigos incluídos na *Scoping review* (estratégia PCC).

## 4. REVISÃO DE ESCOPO

### 4.1 Características gerais e composição estrutural da toxina botulínica

A Toxina Botulínica (TxB) é uma exotoxina biológica produzida como produto de fermentação de uma bactéria gram-positiva, anaeróbia, denominada *Clostridium botulinum* (JOHNSON; BRADSHAW, 2001). Tem sido identificado oito sorotipos imunologicamente distintos da TxB. Destes, sete sorotipos: A, B, C1, D, E, F e G são neurotoxinas (outra TxB, a C2, é também produzida pelo *C. botulinum*, mas não é neurotoxina (DONG; STENMARK, 2019; DRESSLER; SABERI; BARBOSA, 2005; SPOSITO, 2009).

Atualmente, apenas são comercializados os sorotipos A (toxina botulínica A ou TxB/A) e B (toxina botulínica B ou TxB/B), sendo a toxina botulínica A, a mais estudada para propósito terapêutico e estético (CHOUDHURY *et al.*, 2021; DONG; STENMARK, 2019). Estão disponíveis para comercialização várias marcas de TxB/A, tais como: Botox®, Botulim®, Botulift®, Prosigne®, Dysport® e Xeomim®, Nabota®, bem como, em alguns países já está disponível uma TxB do tipo B para uso terapêutico, Myobloc® (SAMIZADEH; DE BOULLE, 2018; SINGH; KUKREJA, 2015)

As Tx/A e TxB/B foram aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso médico e cosmético, enquanto TxB-E1 está sob ensaios clínicos (CHOUDHURY *et al.*, 2021; DONG; STENMARK, 2019). A primeira utilização da TxB/A como medicamento foi no tratamento de estrabismo, injeções aplicadas no músculo ocular externo, proporcionando relaxamento e alinhamento dos olhos, sem intervenção cirúrgica, em 1981. Porém, apenas em 1986, a FDA aprovou o uso do BOTOX® para o tratamento do estrabismo, blefaroespasma e espasmo hemifacial. E no ano de 2000 a TxB/A foi liberada para o uso estético, linhas de expressões, etc (CARRUTHERS, 2002; CHOUDHURY *et al.*, 2021; SPOSITO, 2009). Desde então, a toxina vem sendo utilizada para fins estéticos, e também terapêuticos.

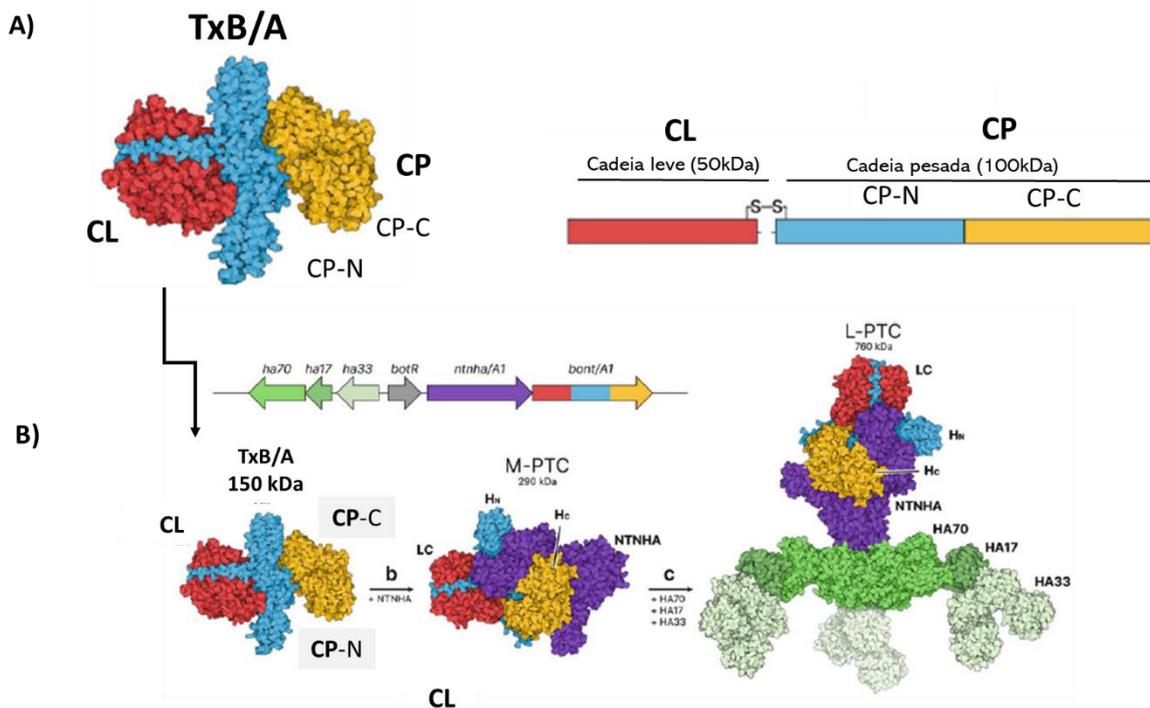
As sequências de DNA e proteínas para os protótipos das sete TxB, bem como das proteínas relacionadas a TxB, foram definidas no início de 1990, revelando variação de ~ 37-70% nas sequências de proteínas entre os diferentes sorotipos (DONG; STENMARK, 2019).

A forma purificada da TxB/A pode ser separada em componente tóxico e não tóxico. Como ilustrado na Figura 2, a TxB/A é um complexo molecular com peso final

de 760 KDa, formado por uma neurotoxina de cadeia dupla de 150 kDa (consiste em uma cadeia leve (CL) de 50 kDa, que se encontra ativa e uma cadeia pesada (CP) de 100 kDa inativa), que se liga de maneira não covalente a outras proteínas não tóxicas ou acessórias, também conhecidas como NAPS, que ajudam a estabilizar e proteger a neurotoxina da degradação (DONG; STENMARK, 2019; LEE *et al.*, 2014; SUGAWARA *et al.*, 2010). Os genes que codificam a TxB/A1 estão localizados dentro de dois tipos de agrupamentos de genes, ambos contendo um gene que codifica NTNHA (proteína não tóxica e não hemaglutinina) e outra região com um agrupamento de genes designado como o *cluster* HA, que codifica três proteínas (HA17, HA33 e HA70) que formam um complexo com atividade de hemaglutinina (HA) (DONG; STENMARK, 2019; SINGH; KUKREJA, 2015).

A estrutura molecular da TxB/A é formada por duas cadeias e três domínios funcionais: a cadeia leve (CL, ~ 50 kDa), é uma metaloprotease dependente de zinco que cliva as proteínas-alvo nos neurônios e a cadeia pesada (CP), ainda é dividida em duas partes, no domínio C-terminal de ligação ao receptor (CP-C, ~ 50 kDa) e no domínio N-terminal de translocação de membrana (CP-N, ~ 50 kDa), responsáveis pelo reconhecimento do receptor e translocação da toxina na membrana pré-sináptica, respectivamente. Essas toxinas são inicialmente produzidas como um único polipeptídeo conhecido como pró-toxina. A região do ligante entre a CL e a CP precisa ser clivada por proteases bacterianas ou hospedeiras, que convertem a pró-toxina inativa em uma forma ativa de cadeia dupla. A cadeia leve e a cadeia pesada permanecem conectadas por meio de uma única ligação de ponte dissulfeto (DONG; STENMARK, 2019; PIRAZZINI *et al.*, 2017) .

Embora a estrutura molecular base da TxB/A (150 kDa) seja muito semelhante entre as marcas comerciais, existem diferenças nas moléculas acessórias entre as toxinas. É importante ressaltar que na prática clínica, essas formulações não são intercambiáveis, devido às características específicas de cada uma das formulações comercialmente disponível (SAMIZADEH; DE BOULLE, 2018; SINGH; KUKREJA, 2015).



**Figura 2:** Estrutura molecular da proteína da toxina botulínica A (TxB/A) mostrando a arquitetura de três domínios. (a) Desenho esquemático da arquitetura da cadeia e dos três domínios da TxB/A. A cadeia leve (CL) em vermelho, o domínio de translocação da cadeia pesada (CP-N) em azul e o domínio de ligação ao receptor (CP-C) em amarelo. As duas cadeias são conectadas por meio de uma ligação dissulfeto. (b) As estruturas cristalinas da TxB/A de tamanho completo com as proteínas acessórias. As estruturas das proteínas são mostradas em uma representação de preenchimento de espaço.

#### 4.2. Mecanismo de ação da toxina botulínica

Na década de 1950, foi gerada a hipótese de mecanismo de ação da toxina botulínica nas sinapses através de observações do comportamento da neurotoxina. Notou-se que esta possuía afinidade pelas fendas sinápticas neuronais, inibindo a liberação da acetilcolina por exocitose nas terminações nervosas, sem alterar a condução neural dos outros mediadores e/ou a síntese de armazenamento de acetilcolina. A injeção intramuscular em dosagem e local correto ajuda a promover denervação química parcial na fenda neuromuscular, e, conseqüentemente, promove o relaxamento da musculatura (DRESSLER; SABERI; BARBOSA, 2005).

O mecanismo de ação da toxina botulínica está ilustrado na Figura 3 e inclui as seguintes etapas: 1) ligação da TxB aos terminais nervosos; 2) internalização da TxB dentro de um compartimento endocítico; 3) translocação da TxB para o citosol; 4)

clivagem do complexo SNARE pela cadeia leve (CL) da TxB; e 5) redução da liberação de acetilcolina do terminal pré-sináptico (CAR *et al.*, 2021; DRESSLER; SABERI; BARBOSA, 2005). Assim, a TxB, uma neurotoxina que possui alta afinidade pelas sinapses colinérgicas, ocasiona bloqueio na liberação de acetilcolina pelo terminal nervoso, levando a diminuição da contração muscular na junção neuromuscular.

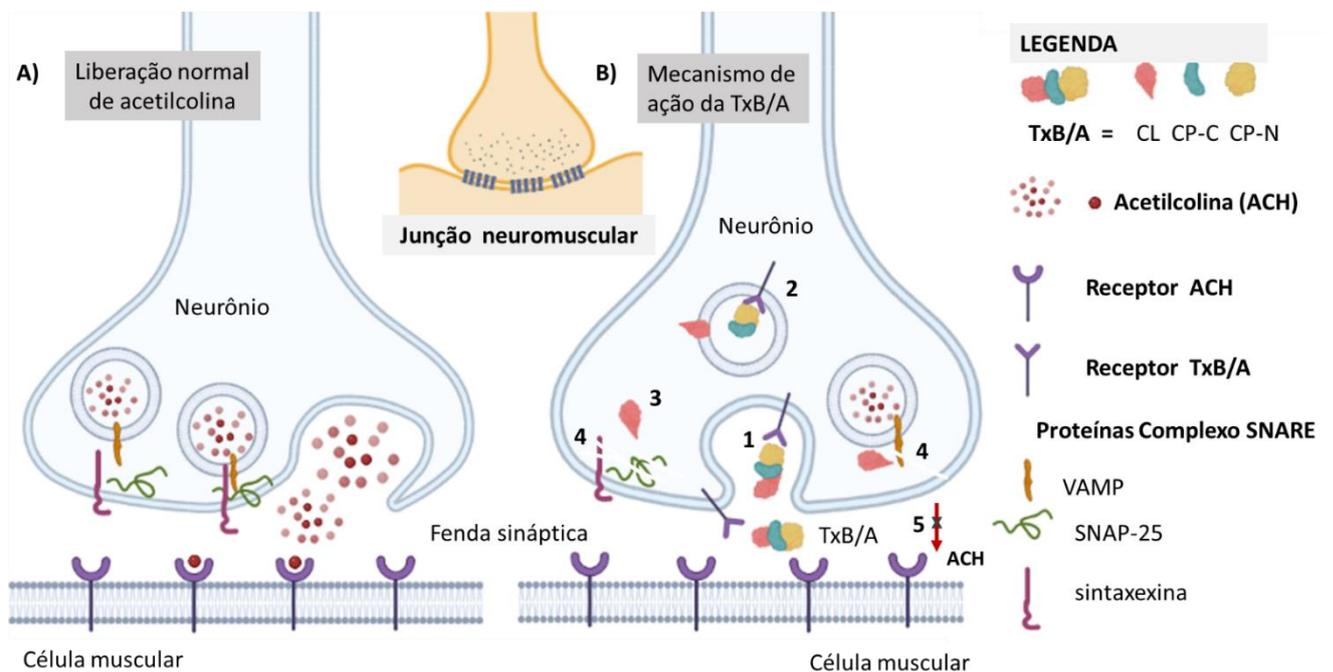
Como ilustrado na Figura 3A, a liberação da vesícula de acetilcolina na junção neuromuscular requer a presença do complexo de proteínas chamado SNARE (receptor da proteína de ligação ao fator sensível à *N-etilmaleimida*) para poder se ligar as membranas celulares e então liberar seu conteúdo de acetilcolina na fenda sináptica por exocitose. Esse complexo é constituído por três proteínas: a proteína sinaptossomal-25 kDa (SNAP-25), sintaxina e a proteína da membrana associada à vesícula (VAMP). Em condições normais, a acetilcolina é liberada nas junções neuromusculares, atravessando o espaço sináptico, onde se liga aos receptores nicotínicos encontrados nas células musculares, promovendo contração muscular (DONG; STENMARK, 2019; JAHN; SCHELLER, 2006).

Uma vez que a TxB/A tem alta afinidade pelas terminações nervosas colinérgicas, após sua aplicação a cadeia pesada (CP) da toxina reconhece os receptores nas terminações nervosas colinérgicas, permitindo que a toxina entre nos neurônios via endocitose mediada pelo receptor para neurotoxina presente na membrana dos neurônios pré-sinápticos. A porção N-terminal da cadeia pesada (CP-N) medeia a translocação da cadeia leve (CL) através das membranas endossomais para o citosol. A CL é a porção catalítica responsável por clivar as proteínas do substrato neuronal, incluindo Sintaxina, SNAP-25 e VAMP, que são necessárias para a liberação do neurotransmissor acetilcolina, bloqueando assim a liberação desse neurotransmissor e conseqüentemente a neurotransmissão na junção neuromuscular (DONG; STENMARK, 2019; JAHN; SCHELLER, 2006; SÜDHOF; ROTHMAN, 2009).

A ação de perda da contração muscular no local acontece como mostrado na Figura 3B, quando a toxina botulínica se liga ao receptor colinérgico na extremidade nervosa (1), penetrando na terminação nervosa por endocitose (2). A cadeia leve da toxina é liberada no citosol celular (3), clivando proteínas do complexo SNARE (4) e quebrando as ligações peptídicas dos transportadores proteicos, como consequência existe o bloqueio da exocitose e da secreção de acetilcolina (5), que causariam a contração muscular (JAHN; SCHELLER, 2006; SÜDHOF; ROTHMAN, 2009). Dessa

forma, existe paralisação muscular pela não liberação da acetilcolina nas terminações nervosa colinérgicas da junção neuromuscular.

A importância em entender o mecanismo de ação da TxB é que a nível molecular, a eficácia do tratamento depende da capacidade da cadeia leve da TxB se ligar ao neurônio, internalizar e liberar a cadeia leve dentro do citoplasma. Assim, se a TxB apresentar uma maior concentração de porção ativa e liberar uma maior quantidade de cadeia leve (CL) dentro do citoplasma, haverá melhor funcionalidade ou maior efetividade, e ainda, se a internalização no citoplasma acontecer de forma rápida, o resultado da toxina começará aparecer em poucos dias. Os trabalhos mostram que existe variação na concentração de porção ativa (CL) e no tempo de internalização da cadeia leve no citoplasma, entre as marcas comerciais Dysport®, Botox® e Xeomin® (FIELD *et al.*, 2018; FREVERT, JÜRGEN, 2010), com isso variando o início do efeito do tratamento da TxB.



**Figura 3:** Mecanismo de ação da toxina botulínica na junção neuromuscular. A) Na ausência da toxina botulínica na fenda sináptica, há liberação normal de acetilcolina da junção neuromuscular levando a contração muscular. B) Quando a toxina botulínica é aplicada na musculatura, o mecanismo de ação ocorre nas seguintes etapas: 1) ligação aos terminais nervosos; 2) internalização dentro de um compartimento endocítico; 3) translocação para o citosol; 4) clivagem do complexo SNARE pela cadeia leve (CL); e 5) redução da liberação de acetilcolina do terminal pré-sináptico, levando a diminuição da contração muscular. (Ilustração: ALVES, 2023)

### 4.3 Diferenças estruturais na molécula da TxB/A entre as marcas comerciais

As três principais TxB/A disponíveis comercialmente no mundo são derivadas da *Clostridium botulinum* Hall: *onabotulinumtoxinA* (ONA-TxB/A) comercializada como Botox®/Vistabel por Allergan Inc. (Irvine, CA, EUA); *abobotulinumtoxinA* (ABO-TxB/A) comercializada como Dysport®/Azzalure por Ipsen/Galderma (Paris, França); e *incobotulinumtoxinA* (INCO-TxB/A) comercializada como Xeomin®/Bocouture por Merz Pharmaceutical (Frankfurt, Alemanha). Embora as três TxB/A disponíveis sejam originadas do mesmo sorotipo A, elas possuem pequenas diferenças nas suas preparações, que levam a diferenças na estrutura molecular e resultam em efeitos clínicos distintos (CAR *et al.*, 2021; SAMIZADEH; DE BOULLE, 2018).

Apesar das três principais marcas comerciais disponíveis Botox®, Dysport® e Xeomin® apresentarem o mesmo mecanismo de ação nas sinapses colinérgicas, essas preparações têm formulações distintas, com diferenças significativas na sua estrutura e potência. Essas diferenças podem resultar em diferentes eficácia clínica e isso tem sido discutido na literatura no decorrer dos últimos anos (CAR *et al.*, 2021; CHOUDHURY *et al.*, 2021; SAMIZADEH; DE BOULLE, 2018). Assim, por meio de uma busca estratégica de 63 artigos, essa revisão de escopo visa abordar as diferenças na estrutura e potência entre as principais marcas comerciais, como forma de alertar aos profissionais que as diferentes formulações da TxB/A podem apresentar eficácia diferente, justificando as diferenças observadas nos resultados clínicos após sua aplicação. Dessa forma, a escolha da marca comercial da TxB/A deve ser baseada no conhecimento da sua formulação, composição estrutural e potência.

A onatoxinabotulínicaA (ONA-TxB/A; Botox®) e abotoxinabotulínicaA (ABO-TxB/A; Dyspor®) são complexos de neurotoxinas purificadas, incluindo as moléculas de toxina TxB/A1 e TxB/A2, respectivamente, junto com as proteínas acessórias de neurotoxina: NAPs - três proteínas hemaglutininas (HA) e uma proteína não tóxica (não-HA). Tem sido sugerido que a HA não apenas estabiliza a atividade biológica do produto *in vivo*, mas também permite adesão do complexo HA-toxina botulínica ao tecido muscular (CAR *et al.*, 2021; JOHNSON; BRADSHAW, 2001). A incotoxinabotulínicaA (INCO- TxB/A, Xeomin®) é uma exceção, já que contém apenas TxB/A1 sozinha, sem as proteínas acessórias, sendo isolada por meio de purificação adicional da forma complexa e original (FREVERT, J., 2009; FREVERT, JÜRGEN, 2015; PICKETT, 2014). Os resultados de alguns estudos mostraram que a proteína

TxB/A de ~150 kDa está principalmente ligada as NAPs em níveis de pH fisiológico, (CAI; SARKAR; SINGH, 1999; WAGMAN; BATEMAN, 1953), mas outros estudos sugeriram que antes ou logo após a injeção, as NAPs se dissociam da toxina botulínica (EISELE *et al.*, 2011; FREVERT, JÜRGEN, 2010).

Todos os produtos comerciais contêm um excipiente, conhecido como albumina sérica humana (ASH), que melhora a estabilidade da toxina e diminui a perda de toxina durante liofilização, prevenindo a agregação de proteínas e adsorção superficial, bem como prolonga a vida útil da molécula (DRESSLER; ADIB SABERI; BIGALKE, 2016; FREVERT, JÜRGEN, 2010). A ONA-TxB/A (Botox®) é seca a vácuo, enquanto ABO-TxB/A (Dysport®) e INCO-TxB/A (Xeomin®) são liofilizadas. Todas as formulações antes do uso clínico são reconstituídas em solução salina estéril, produzindo uma solução ligeiramente ácida (DRESSLER; ADIB SABERI; BIGALKE, 2016; FREVERT, JÜRGEN, 2010). O processo de reconstituição da ONA-TxB/A resulta em uma completa dissociação dos complexos de 900 kDa e a liberação de mais de 85% das neurotoxinas na forma livre (EISELE *et al.*, 2011).

Vários produtos TxB/A são atualmente comercializados, cada um com processos de fabricação exclusivo, excipientes, formulação e unidades de potência não intercambiáveis. No entanto, os efeitos de todos os produtos são mediados pela neurotoxina TxB/A de 150 kDa, especificamente pela porção ativa (cadeia leve) de 50 kDa (FIELD *et al.*, 2018). As principais diferenças entre a molécula das toxinas ONA-TxB/A (Botox®), ABO-TxB/A (Dysport®) e INCO-TxB/A (Xeomin®) estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Principais diferenças entre as formulações das toxinas ONA-TxB/A (Botox®), ABO-TxB/A (Dysport®) e INCO-TxB/A (Xeomin®).

	<b>Botox</b>	<b>Dysport</b>	<b>Xeomin</b>
<b>Nome genérico/nome abreviado</b>	OnabotulinumtoxinA/ (ONA-TxB/A)	AbobotulinumtoxinA/ (ABO-TxB/A)	IncobotulinumtoxinA/ (INCO-TxB/A)
<b>cepa de <i>C. botulinum</i></b>	Hall A-hiper	Hall A	Hall A (ATCC 3502)
<b>Tipo de toxina</b>	A1	A2	A1
<b>Peso molecular</b>	complexo de 900 kDa	não mencionado	150 kDa
<b>Método de purificação</b>	Cristalização	Cromatografia	Cromatografia
<b>Forma farmacêutica para reconstituição</b>	Pó seco a vácuo	pó liofilizado	pó liofilizado
<b>Armazenamento após reconstituição</b>	Até 24 horas a 2–8°C	Até 8 h a 2–8°C	Até 24 horas a 2–8°C
<b>Validade</b>	2–8°C/36 meses	2–8°C/24 meses	Temperatura ambiente /36 meses
<b>pH reconstituído</b>	7,4	7,4	7,4
<b>Excipientes em frasco</b>	100 U: albumina de soro humano 0,5 mg, NaCl 0,9 mg	500 U: albumina de soro humano 0,125 mg, lactose 2,5 mg	100 U: albumina de soro humano 1 mg, sacarose 4,7 mg
<b>Unidade/frasco</b>	100 U ou 200 U Botox/50 U Vistabel	300 U ou 500 U Dysport/125 U Azzalure	100 U ou 200 U Xeomin/50 U Bocouture
<b>Carga/frasco de proteína</b>	5 ng/100 U	4,35 ng/500 U	0,44 ng/100 U
<b>Quantidade de neurotoxina (ng proteína/100 U)</b>	~0.73ng/100 U *	~0.65 ng/100 U *	~0.44 ng/100 U *
<b>Quantidade de molécula ativa (CL) da neurotoxina (ng proteína/100 U)</b>	0,90 ng/100 U *	0,54 ng/100 U *	0,40 ng/100 U *
<b>Quantidade de CL enzimaticamente ativa (ng proteína/100 U)</b>	0,96 ng/100 **	1,42 ng/300 U **	0,35 ng/100 U **
<b>Quantidade de toxina ativa injetada na dose recomendada (glabela)</b>	0,18 **	0,27 **	0,08 ** 2,25 x menos que ONA 3,37 x menos que ABO

\*Frevert *et al.*, 2010; \*\*Field *et al.*, 2018.

#### 4.4 Alterações na molécula da TxB/A e seus diferentes efeitos clínicos

As principais formulações da toxina botulínica tipo A disponíveis comercialmente: ONA-TxB/A (Botox®), ABO-TxB/A (Dysport®) e INCO-TxB/A (Xeomin®) apresentam diferenças na sua estrutura molecular, como mencionado nos trabalhos apresentados no sub-tópico acima, e essas pequenas alterações repercutem em ações e efeitos clínicos diferentes logo após sua aplicação no tecido alvo.

Um dos principais efeitos clínicos observados e comprovado por estudos, é o rápido efeito de bloqueio da liberação da acetilcolina nas terminações nervosas e consequente paralisação da musculatura após a aplicação da ABO-TxB/A (Dysport®) quando comparado as outras TxB/A ONA (Botox®) e INCO (Xeomin®). Esse efeito pode ser explicado pelo etapa inicial de internalização da molécula da TxB/A pelos receptores presentes nos neurônios (CAR *et al.*, 2021; DOVER *et al.*, 2018).

Dentre as etapas do mecanismo de ação da TxB/A, a primeira etapa consiste no reconhecimento e internalização da toxina, que é mediado pela cadeia pesada (CP) da TxB/A, que contém o domínio de translocação na membrana (N-terminal) e um domínio de ligação (C-terminal). O subdomínio N-terminal da cadeia pesada (CP-N) é responsável apenas pela translocação da molécula da toxina pela membrana, não apresentando especificidade. Por outro lado, o subdomínio C-terminal da cadeia pesada (CP-C) se liga seletivamente a receptores específicos de neurônios duplos gangliosídeo GT1b e ao receptor da proteína SV2C na membrana plasmática pré-sináptica em particular de neurônios (JHANG; KUO, 2016; MAHRHOLD *et al.*, 2016). Os sorotipos A1 e A2 da TxB ligam-se à glicoproteína 2C (SV2C) da vesícula sináptica glicosilada do receptor SV2C (MAHRHOLD *et al.*, 2016), que permite a rápida penetração de toxinas, em taxas semelhantes, através das mesmas vesículas sinápticas. Porém, foi demonstrado que a cadeia pesada da A2 (CP-A2), presente na molécula da ABO-TxB/A (Dysport®), tem maior afinidade por receptores e neurônios do que a cadeia pesada da A1 (CP-A1) (LACY *et al.*, 1998), explicando assim, o efeito mais rápido de paralisação da musculatura após a aplicação clínica dessa formulação da toxina. Assim, diferentes quantidades de toxina ligada provavelmente correspondem a diferentes números de cadeias leves (CL) que entram no citosol no terminal nervoso, resultando nos diferentes efeitos clínicos observados entre os pacientes entre as formulações das toxinas.

A segunda etapa do mecanismo de ação das toxinas é sua entrada nas vesículas sinápticas dos terminais dos axônios motores por endocitose. A internalização de TxB/A é mediada pelo receptor de um polisialogangliosídeo (PSG), o domínio luminal glicosilado de uma proteína da vesícula sináptica e N-glicanos únicos ligados às glicoproteínas da vesícula sináptica (VS) (KROKEN *et al.*, 2017), bem como à E-caderina (KAMMERER; BENOIT, 2014; LEE *et al.*, 2014; SUGAWARA *et al.*, 2010), fator de crescimento de fibroblastos e receptores vanilóides (JACKY *et al.*, 2013; LI; COFFIELD, 2016). Foi demonstrado que a proteína HA não tóxica (presente nas TxB/A ONA e ABO) (SUGAWARA *et al.*, 2010), sequestra a E-caderina no estado monomérico, rompe a barreira epitelial intercelular e facilita a absorção paracelular da TxB/A (JACKY *et al.*, 2013; LI; COFFIELD, 2016). Isto poderia explicar o efeito mais rápido de ação das formulações das toxinas ONA-TxB/A (Botox®) e ABO-TxB/A (Dysport®), comparado a INCO-TxB/A (Xeomin®), que não apresenta a proteína HA não tóxica, sendo sua absorção mais lenta e conseqüentemente, efeito de paralisação da musculatura mais lento, quando comparado as TxB/A que possuem a parte não tóxica (CAR *et al.*, 2021).

Depois que a molécula da TxB/A (150 kDa) é internalizada no neurônio, a cadeia leve (CL) é translocada através da membrana da vesícula para o citosol, sendo liberada da cadeia pesada (CP) pela quebra da ponte dissulfeto (DRESSLER; SABERI; BARBOSA, 2005). Assim, a cadeia leve fica livre para exercer sua atividade catalítica, clivando proteínas do complexo SNARE (Figura 3B), especificamente da proteína sinaptossomal de 25 kDa, SNAP-25. Sabendo que a clivagem e inativação da SNAP-25 pela cadeia leve (CL) da TxB/A previne o encaixe e a exocitose da acetilcolina das vesículas pré-sinápticas nas junções neuromusculares, a concentração disponível da porção ativa e catalítica da cadeia leve (CL) da TxB/A tem função essencial na potência e efeito da TxB/A (CAR *et al.*, 2021). Assim, a quantidade de toxina ativa (cadeia leve) e a atividade catalítica da cadeia leve da TxB/A foi mensurada nas três principais formulações comerciais (Dysport®; Botox®; Xeomin®) em dois estudos clássicos (FIELD *et al.*, 2018; FREVERT, JÜRGEN, 2010).

Inicialmente, Frevert (2010) mensurou por ensaio imunoenzimático (ELISA) a quantidade da neurotoxina TxB/A entre as marcas comerciais Botox®, Dyport® e Xeomin®. A concentração média de TxB/A foi de 0,73 ng em Botox® (100 U), 3,24 ng (frasco de 500 unidades) de Dysport®, que equivale a 0,65 ng em 100 U e 0,44 ng

por frasco de 100 U de Xeomin® (FREVERT, JÜRGEN, 2010). Em 2018, Field quantificou a concentração da porção ativa da TxB/A, mensurando o conteúdo da cadeia leve de TxB/A de 50 kDa por frasco medido por ELISA. Os dados mostraram que a porção ativa (CL) foi de 1,81 ng/300 U frasco Dysport® (equivalente a 0,54 ng/100U frasco Dysport®), 0,90 ng/100 U frasco Botox® e 0,40 ng/100 U frasco Xeomin® (FIELD *et al.*, 2018). Ainda, no estudo de Field (2018) foi mensurado a atividade proteolítica da cadeia leve pelo ensaio de EndoPed entre as marcas comerciais testadas, obtendo valores de 1,42 ng/300 U frasco Dysport®, 0,96 ng/100 U frasco Botox® e 0,35 ng/100 U frasco Xeomin®. Através desse estudo foi mostrado que a quantidade de TxB/A ativa injetada na dose recomenda na glabella foi de 0,27 para Dysport®, 0,18 para Botox® e 0,08 para Xeomin®. As concentrações da TxB/A e as principais informações desses estudos estão resumidas na Tabela 1.

Portanto, quando a TxB/A Dysport® é usada nas doses recomendadas, mais neurotoxina ativa é administrada comparado a dose do Botox® ou Xeomin®. Sabe-se que a duração da paralisia do músculo TxB/A é conhecida por ser dose dependente, ou seja, depende da quantidade de neurotoxina ativa aplicada (HAENZI *et al.*, 2015). Assim, a maior quantidade de TxB/A ativa em Dysport® na dose recomendada potencialmente prolonga a desnervação pós-injeção e duração da ação, em relação a outros produtos.

Outra característica molecular abordada por alguns estudos é a capacidade de espalhamento da toxina devido ao tamanho e peso molecular da TxB/A. A lei de difusão de Fick explica que a difusão está relacionada ao peso molecular. Assim, a propagação da neurotoxina nos tecidos adjacentes seria mais lenta com as toxinas com complexos com alto peso molecular em comparação com as com menor peso molecular ou livre de moléculas acessórias (EISELE *et al.*, 2011). No entanto, isso é discutível e mais estudos clínicos são necessários. Kerscher e colaboradores (2012) demonstraram que a ONA-TxB/A com proteínas acessórias e um peso molecular de 900 kDa e a INCO-TxB/A sem proteínas acessórias e peso molecular de 150 kDa têm propagação semelhante (KERSCHER *et al.*, 2012). Além disso, o tamanho da toxina progenitora parece ser irrelevante uma vez que os complexos progenitores se dissociam no frasco logo após a reconstituição com solução salina normal e em condições fisiológicas (EISELE *et al.*, 2011; PICKETT, 2009). Assim, o peso molecular

e a presença de proteínas complexantes não parecem afetar a propagação ou difusão das toxinas (EISELE *et al.*, 2011).

#### **4.5 Analisando os estudos clínicos com as TxB/A: ONA (Botox®), ABO (Dysport®) e INCO (Xeomin®)**

Para tentar compreender se de fato, as diferenças estruturais nas formulações da principais TxB/A comercializadas: ONA (Botox®), ABO (Dysport®) e INCO (Xeomin®) alteram o efeito clínico, foi realizado uma revisão de escopo analisando os 16 estudos publicados entre os anos de 1996 - 2023 de ensaios clínicos com o uso das TxB/A Botox®, Dysport® e Xeomin® aplicadas em ríntides faciais. A Tabela 2 apresenta os itens analisados em cada estudo clínico que incluía pelo menos uma dessas TxB/A. Foram coletadas informações sobre local de aplicação, tempo de duração do efeito da toxina, dose, número de sujeitos (n), tipo de estudo e desfecho principal do estudo.

Dentre os 16 estudos clínicos analisados, a toxina mais frequente nos estudos clínicos para aplicação em ríntides faciais foi a ONA-TxBA (Botox®) (10 estudos), seguidos da INCO-TxBA (6 estudos) e ABO-TxBA (6 estudos), sendo que alguns dos estudos avaliaram mais de uma toxina ao mesmo tempo. O local de aplicação mais estudado foi as rugas glabellares. Dentre esses, 12 fizeram o uso da TxB/A para rugas glabellares, 5 para rugas periorbitais e 5 para rugas frontais, sendo que 7 desses analisaram mais de uma região facial. O tempo máximo das toxinas avaliado nos estudos foi 9 meses e o tempo mínimo 30 dias, sendo a média de tempo de 120 dias, que é o tempo em média de duração do efeito da TxB/A relatado na literatura (ELEOPRA *et al.*, 2020; SAMIZADEH; DE BOULLE, 2018).

Com relação a dose da TxB/A aplicada por músculo, as rugas glabellares receberam as maiores doses da toxina, variando de 100 U – 10 U, as rugas periorbitais de 10 - 24 U e as rugas frontais 20 U. Ainda, alguns estudos testaram doses variadas da TxB/A analisada. Polacco *et al.* (2021) através de um estudo duplo cego randomizado, avaliou as doses de 20, 60 e 100 U da toxina INCO-TxBA nas rugas glabellares e observou duração de 120, 180, 270 dias, respectivamente para cada dose aplicada, mostrando que maior dose da TxBA está associada a maior duração do efeito da toxina. De maneira semelhante, Kerscher (2020) avaliou a toxina INCO-TxBA para rugas frontais e rugas glabellares e observou duração de 185 dias para

dose 50U e 210 dias para dose 75U (KERSCHER *et al.*, 2020). Todos os estudos foram unânimes em relatar uma maior duração do efeito associada a maior dose, colaborando com os relatos da literatura que mostram que a toxina tem efeito dose-dependente (ELEOPRA *et al.*, 2020; JOSEPH JH, EATON LL, ROBINSON J, PONTIUS A, 2016).

Dos 16 estudos clínicos incluídos nessa revisão de escopo, apenas 2 estudos (RAPPL *et al.*, 2013; THOMAS *et al.*, 2018) avaliaram simultaneamente as três toxinas ONA (Botox®), ABO (Dysport®) e INCO (Xeomin®). Primeiramente, em 2013 foi avaliado durante 180 dias o efeito dessas toxinas para rugas glabellares com doses de 21 U INCO, 21 U ONA, 63 U ABO. Foram incluídos 60 indivíduos por grupo e foi observado que INCO demonstrou início mais rápido e uma duração mais longa de efeito que ONA (proporção de dose 1:1) e ABO (dose 1:3) (RAPPL *et al.*, 2013). Já em 2018, outro estudo comparou o tempo de efeito duração dessas três toxinas e mostrou que as toxinas não têm diferenças no efeito até 3 semanas, mas após 4 semanas a INCO-TxB/A demonstrou um menor tempo de duração (THOMAS *et al.*, 2018). Esse resultado pode ser explicado pela menor concentração da molécula ativa da INCO-TxB/A contida em 100 U (2,25 e 3,37 vezes menos TxB/A ativa), quando comparado a ONA e ABO-TxB/A, respectivamente.

O efeito simultâneo das toxinas ONA (Botox®) e ABO (Dysport®) foi avaliado em estudo clínico duplo cego randomizado, quando da aplicação de cada toxina em um lado da face nas rugas frontais, glabellares e periorbitais. Não foi observada diferença no efeito entre as toxinas ONA (25 U) de um lado e ABO (62.5 U) do outro lado da face no período de 150 dias (MICHAELS *et al.*, 2012). Por outro lado, outro estudo randomizado triplo cego comparou o efeito das toxinas ONA e ABO em rugas glabellares e periorbitais em cada lado da face, mostrou que a ABO (Dysport®) apresentou início mais rápido de ação e maior duração nos indivíduos (n=85) quando comparado com ONA Botox® por 5 meses (KASSIR; KOLLURU; KASSIR, 2013).

O efeito do espalhamento e dispersão da toxina ABO e ONA foi avaliado na aplicação em rugas frontais. A dose de 2,0:1,0 U (ABO:ONA) mostrou efeito semelhante, porém a equivalência de dose maior de 2,5:1,0 U (ABO:ONA) demonstrou maior área de espalhamento a dispersão da ABO (Dysport®) comparado a ONA (Botox®) (HEXSEL *et al.*, 2012).

**Tabela 2:** Dados coletados dos estudos clínicos com as TxB/A: ONA (Botox®), ABO (Dysport®) e INCO (Xeomin®)

Tipo de TxB/A	Local	Duração	Dose	N=	Tipo de estudo	Desfecho	Referência
INCO-TxB/A (Xeomin®)	RG	120, 180, 270 dias	20, 60, 100U	38	Duplo cego, Randomizado, fase IV	Maior dose – maior duração	(POLACCO et al., 2021)
ABO-TxB/A (Dysport®)	RG	150 dias	50 U	198	Duplo cego, Randomizado, fase III	Efeito até 150 dias com dose 50U	(BAUMANN et al., 2009)
ONA-TxB/A (Botox®) ABO-TxB/A (Dysport®) INCO-TxB/A (Xeomin®)	Rugas faciais	4 semanas (28 dias)	Não mencionado	28	Randomizado, Ensaio clínico	incobotulinumtoxinA menor tempo de duração	(THOMAS et al., 2018)
ONA-TxB/A (Botox®)	RG / RP	150/ 120 dias	24 U (6 pontos) / 20 U (5 pontos)	445/ 917	Estudo randomizado, placebo, controlado, fase III	Pacientes que trataram as RO e RG estavam mais satisfeitos que os receberam só a dose PO (24U)	(DAYAN et al., 2015)
ONA-TxB/A (Botox®)	RO	5 meses	24 U	222	Estudo randomizado, duplo cego	O tratamento das RO com ONA foi eficaz e bem tolerado quando comparado ao placebo	(CARRUTHERS, ALASTAIR et al., 2014)
ONA-TxB/A (Botox®)	RG/RF	180 dias	40 U (20;20U) ou 30 U (10 U; 20 U)	175	Randomizado, dose-depedente, controlado	A dose de 40 U demonstrou maior duração do efeito versus a dose de 30 U.	(SOLISH et al., 2016)
INCO-TxB/A (Xeomin®)	RG/ RF	6 meses	20U, 50U, 75U	151	Randomizado, intervalo dose, Fase II	Duração 185 dias para dose 50U e 210 dias para dose 75U	(KERSCHER et al., 2020)
daxibotulinumtoxinA ONA-TxB/A (Botox®)	RG	24 semanas (168 dias)	20U, 40U, 60U/ 20U	268	Randomizado, duplo cego, fase II	20U ONA exibiu maior taxa de resposta e duração mais longa	(CARRUTHERS, JEAN et al., 2017)
INCO-TxB/A (Xeomin®)	RG	30 dias	10, 20 30 U	-	Randomizado, Fase III, placebo controlado,	Maior resposta observada nas maiores doses (dose dependente)	(FULFORD-SMITH; GALLAGHER; BRIN, 2013)
ONA-TxB/A (Botox®)	RO	30 dias	24 U/ 12 U	300	Randomizado duplo cego, fase III	A resposta ao grupo ONA 24 U foi maior comparado ao grupo ONA 12 U.	(HARII et al., 2017)
ONA-TxB/A (Botox®) ABO-TxB/A (Dysport®) INCO-TxB/A (Xeomin®)	RG	180 dias	21 units INCO, 21 U ONA, 63 U ABO.	(U) 180 (60 por grupo)	Randomizado, duplo cego,	INCO demonstrou início mais rápido e uma duração mais longa de efeito que ONA (proporção de dose 1:1) e ABO (dose 1:3 razão).	(RAPPL et al., 2013)

ONA-TxB/A (Botox®)	RG/RF	180 dias	40 U, 64 U,	787	Duplo cego, placebo-controlado.	ONA distribuída entre o complexo foi seguro e eficaz para o tratamento de LFC moderado a grave. (SAMIZADEH; DE BOULLE, 2018)
ONA-TxB/A (Botox®) ABO-TxB/A (Dysport®)	RG/RF/RO	150 dias	25 U de ONA de um lado e 62.5 U de BoNT-ABO do outro lado		Estudo clínico, randomizado, duplo cego	Toxinas diferentes aplicadas em cada lado da face. Não houve diferença entre as toxinas (MICHAELS et al., 2012)
INCO-TxB/A (Xeomin®)	RG	90 dias	20 U	21	Estudo clínico	RG estáticas (expressão facial neutra) foram significativamente reduzidos em - 17% e - 24% (30 e 90 pós-tratamento) (RAPPL et al., 2019)
ONA-TxB/A (Botox®) ABO-TxB/A (Dysport®)	RG/RO	5 meses (150 dias)	Divididos em 85 cada lado da face: 20 U ABO e 8 U ONA em RG. 30 U ABO e 10 U ONA em RO		Randomizado, triplo cego	Início mais precoce e maior duração em indivíduos com ABO quando comparados com ONA. (KASSIR; KOLLURU; KASSIR, 2013)
ONA-TxB/A (Botox®) ABO-TxB/A (Dysport®)	RF	112 dias	(2.0:1.0 U, ABO:ONA) e (2.5:1.0 U, ABO:ONA)	59	Randomizado, duplo cego	A dose de 2,0:1,0 U (ABO:ONA), tem efeito semelhante, porém a equivalência de dose 2,5:1,0 U (ABO:ONA), tem maior área de espalhamento e dispersão da ABO comparado a ONA. (HEXSEL et al., 2012)
<b>TOTAL</b> ONA-TxB/A = 11 INCO-TxB/A = 6 ABO-TxB/A = 6	<b>TOTAL</b> 12 RG 5 RO 5 RF	<b>TOTAL</b> 30 dias – 6 meses (média 120 dias)	<b>100-10U: RG</b> 10 – 24 U: RO 20 U: RF	<b>Número</b> máximo de sujeitos analisado = 917	<b>16 estudos clínicos</b> randomizados	<b>Desfecho</b> observado: do efeito está relacionada a dose de toxina aplicada (efeito dose-dependente)

RG: rugas glabellares; RF: rugas frontais; RO: rugas orbitais; U: unidades.

## 5. DISCUSSÃO

As pequenas diferenças na estrutura molecular das principais formulações da toxina botulínica tipo A: ONA-TxB/A (Botox®), ABO-TxB/A (Dysport®) e INCO-TxB/A (Xeomin®) podem levar em ações e efeitos clínicos diferentes logo após sua aplicação. Assim, alguns estudos clínicos randomizados tentam comparar as doses, efeitos e duração dessas toxinas, a fim de demonstrar se realmente existe diferença clínica na escolha e utilização entre essas toxinas. Essas três formulações são consideradas de eficácia e perfil de segurança semelhantes, mas diferentes excipientes e diluentes são usados para cada preparação do frasco comercial, de forma que, a potência das unidades das três formulações não tenha efeito comparável na prática clínica. Geralmente, estima-se que 1 U de ONA-TxB/A corresponda a 1 U de INCO-TxB/A e 3–5 U de ABO-TxB/A (ELEOPRA *et al.*, 2020; SAMIZADEH; DE BOULLE, 2018).

Dos 16 estudos clínicos incluídos nessa revisão de escopo com as TxB/A onabotulinumtoxinA (Botox®), abobotulinumtoxinA (Dysport®) e incobotulinumtoxinA (Xeomin®), a toxina mais frequentemente testada para aplicação em ríndes faciais foi a onabotulinumtoxinA (Botox®), possivelmente por ser a primeira toxina aprovada pela FDA e a TxB/A pioneira liberada para o uso estético e de linhas de expressões (CARRUTHERS, 2002; CHOUDHURY *et al.*, 2021; SPOSITO, 2009). Dos estudos analisados, a média de tempo do efeito da toxina analisada foi de 120 dias, compatível com o tempo em média de duração do efeito da TxB/A relatado na literatura (ELEOPRA *et al.*, 2020).

Já o local de aplicação mais estudado foi nas rugas glabellares, uma vez que as rugas dinâmicas glabellares são as mais difíceis de tratar e paralisar, devido à grande força de contração muscular dos músculos corrugadores e prócero, necessitando frequentemente de altas doses de toxina nessa região (DESSY *et al.*, 2011; KAUFMAN-JANETTE *et al.*, 2021). O efeito das toxinas ONA-TxB/A (Botox®), ABO-TxB/A (Dysport®) e INCO-TxB/A (Xeomin®) foi avaliado durante 180 dias nas rugas glabellares, com doses de 21 U da INCO, 21 U da ONA e 63 U da ABO. Foram incluídos 60 indivíduos por grupo e foi observado que a INCO-TxB/A demonstrou início mais rápido e uma duração mais longa de efeito que ONA (proporção de dose 1:1) e ABO (dose 1:3) (RAPPL *et al.*, 2013). Esses achados clínicos não são compatíveis com as diferenças encontradas na estrutura molecular dessas toxinas, onde já foi

mostrado que a cadeia pesada da A2 (CP-A2), presente na molécula da ABO-TxB/A (Dysport®), tem maior afinidade por receptores e neurônios do que a cadeia pesada da A1 (CP-A1) (LACY *et al.*, 1998), o que explica o efeito mais rápido de paralisação da musculatura após a aplicação clínica das formulação da ABO-TxB/A. Porém, a glicosilação Asn559 em SV2C é crítica para a ligação de TxB/A à membrana plasmática pré-sináptica. Os padrões de glicosilação neste local variam entre indivíduos adultos (LAUC *et al.*, 2016). Assim, a variação entre os padrões de receptores entre os indivíduos poderia ser responsável por um diferente início e duração da neuromaxilisa induzida em humanos após a administração da mesma dose de TxB/A (PIRAZZINI *et al.*, 2017).

Por outro lado, Thomas *et al.* (2018) comparou o tempo de duração das toxinas ONA-TxB/A (Botox®), ABO-TxB/A (Dysport®) e INCO-TxB/A (Xeomin®), mostrando que essas toxinas não têm diferenças no efeito até 3 semanas, mas após 4 semanas a INCO demonstrou um menor tempo de duração. Esse achado clínico é compatível com a menor quantidade de neurotoxina encontrada no frasco de 100 U de Xeomin® (0,44ng), comparado a 0,73 ng em Botox® (100 U) e a 0,65 ng em 100 U de Dysport® (FREVERT, JÜRGEN, 2010) e ainda, a menor concentração de porção enzimaticamente ativa da cadeia leve encontrada na Xeomin (0,35 ng/100 U frasco), quando comparado a Dysport® (1,42 ng/300 U) e Botox® (0,96 ng/100 U frasco) (FIELD *et al.*, 2018). Assim, como 100 U da INCO-TxB/A (Xeomin®) apresenta menor concentração e atividade da porção ativa da TxB/A (cadeia leve), isso poderia explicar a menor duração do efeito observada no ensaio clínico de Thomas *et al.* (2018).

O efeito de espalhamento e dispersão entre as toxinas é muito discutido na literatura e requer estudos clínicos para comprovar esse efeito. Hexsel em 2012 comparou o efeito de espalhamento da TxB/A ONA e ABO quando aplicadas em rugas frontais, mostrando que na dose de 2,0:1,0 U (ABO:ONA) não existe diferença de espalhamento, enquanto que as doses de 2,5:1,0 U (ABO:ONA) mostraram maior área de espalhamento e dispersão da ABO comparado a ONA (HEXSEL *et al.*, 2012). A dose e equivalência de 2,5:1 U (ABO:ONA) é justamente a dose recomendada pelo fabricante para TxB/A-ABO (Dysport®) em aplicação em ríides faciais (KARSAI; RAULIN, 2010), o que pode explicar o maior efeito clínico de espalhamento observado da toxina Dysport®. Sendo assim, a difusão observada na toxina Dysport® parece ser

predominantemente dependente da maior dose dessa toxina quando aplicada nas doses recomendadas pelo fabricante.

Todos os estudos clínicos incluídos nessa revisão de escopo, que compararam o efeito da dose entre a mesma toxina avaliada ou entre toxinas diferentes, mostraram um efeito dose-dependente em relação a duração do efeito da toxina (DAYAN *et al.*, 2015; FULFORD-SMITH; GALLAGHER; BRIN, 2013; HARII *et al.*, 2017; HEXSEL *et al.*, 2012; KASSIR; KOLLURU; KASSIR, 2013; KERSCHER *et al.*, 2020; POLACCO *et al.*, 2021; SOLISH *et al.*, 2016). Esses achados clínicos podem ser explicados pelo efeito dose-dependente da TxB/A quando aplicada de forma intramuscular em modelo animal (ratos) e observado que a amplitude da paralisia muscular e o tempo de paralisia é maior com doses crescentes de TxB/A (CICHON *et al.*, 1995).

## 6. CONCLUSÃO

Com base nas evidências encontradas nos artigos e estudos clínicos incluídos nesta revisão de escopo, pode-se concluir que existem pequenas diferenças nas formulações entre as moléculas da TxB/A ONA (Botox®), ABO (Dysport®) e INCO (Xeomin®), principalmente na quantidade da neurotoxina ativa (cadeia leve) e na concentração da porção enzimaticamente ativa da cadeia leve.

Os estudos clínicos mostram que a principal diferença observada no resultado clínico da toxina em rugas faciais está relacionada ao efeito dose-dependente, assim, quanto maior a concentração da molécula ativa da TxB/A contida em determinada formulação da toxina, maior será a dose aplicada e, conseqüentemente, maior duração e efeito da toxina. Sendo assim, essas evidências permitem compreender que as formulações não são intercambiáveis e que existe diferença no efeito e tempo de duração da toxina de acordo com a formulação escolhida pelo profissional.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKSHI, Erez; HARTSTEIN, Morris E. Compositional differences among commercially available botulinum toxin type A. *Current Opinion in Ophthalmology*, v. 22, n. 5, p. 407–412, set. 2011.
- CAI, Shuowei; SARKAR, Hemanta Kumar; SINGH, Bal Ram. Enhancement of the Endopeptidase Activity of Botulinum Neurotoxin by Its Associated Proteins and Dithiothreitol. *Biochemistry*, v. 38, n. 21, p. 6903–6910, 1 maio 1999.
- CAMARGO, Cristina Pires *et al.* Botulinum toxin type A for facial wrinkles. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 2022, n. 1, 5 jul. 2021.
- CAR, Halina *et al.* Botulinum toxin type-A preparations are not the same medications — basic science (Part 1). *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, v. 55, n. 2, p. 133–140, 30 abr. 2021.
- CARRUTHERS, Alastair. Botulinum toxin type A: History and current cosmetic use in the upper face. *Disease-a-Month*, v. 48, n. 5, p. 299–322, maio 2002.
- CHOUDHURY, Supriyo *et al.* Botulinum Toxin: An Update on Pharmacology and Newer Products in Development. *Toxins*, v. 13, n. 1, p. 58, 14 jan. 2021.
- CICHON, John V. *et al.* The effect of botulinum toxin type a injection on compound muscle action potential in an in vivo rat model. *The Laryngoscope*, v. 105, n. 2, p. 144–148, fev. 1995.
- DAYAN, Steven *et al.* Effects of OnabotulinumtoxinA Treatment for Crow’s Feet Lines on Patient-Reported Outcomes. *Dermatologic Surgery*, v. 41, n. Supplement 1, p. S67–S74, jan. 2015.
- DESSY, Luca A. *et al.* Botulinum Toxin for Glabellar Lines. *American Journal of Clinical Dermatology*, p. 1, ago. 2011.
- DONG, Min; STENMARK, Pål. The Structure and Classification of Botulinum Toxins. [S.l.: s.n.], 2019. p. 11–33.
- DOVER, Jeffrey S. *et al.* Botulinum Toxin in Aesthetic Medicine: Myths and Realities. *Dermatologic Surgery*, v. 44, n. 2, p. 249–260, fev. 2018.
- DRESSLER, Dirk; ADIB SABERI, Fereshte; BIGALKE, Hans. Botulinum toxin therapy: reduction of injection site pain by pH normalisation. *Journal of Neural Transmission*, v. 123, n. 5, p. 527–531, 22 maio 2016.
- DRESSLER, Dirk; BENECKE, Reiner. Pharmacology of therapeutic botulinum toxin preparations. *Disability and Rehabilitation*, v. 29, n. 23, p. 1761–1768, 7 jan. 2007.
- DRESSLER, Dirk; SABERI, Fereshte Adib; BARBOSA, Egberto Reis. Botulinum toxin: mechanisms of action. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 63, n. 1, p. 180–185, mar. 2005.

- EISELE, Karl-Heinz *et al.* Studies on the dissociation of botulinum neurotoxin type A complexes. *Toxicon*, v. 57, n. 4, p. 555–565, mar. 2011.
- ELEOPRA, Roberto *et al.* Clinical duration of action of different botulinum toxin types in humans. *Toxicon*, v. 179, p. 84–91, maio 2020.
- ELRIDY, Ahmed Shafik; ZAKI, Rania Gamal Eldin; ELSHINAWY, Reham Fawzy. Comparison of the Clinical Efficacy of Abobotulinumtoxin A (ABO) and Onabotulinumtoxin A (ONA) in the Treatment of Crow's Feet Wrinkles: A Split-Face Study. *Seminars in Ophthalmology*, v. 33, n. 6, p. 739–747, 18 ago. 2018.
- FIELD, Malgorzata *et al.* AbobotulinumtoxinA (Dysport®), OnabotulinumtoxinA (Botox®), and IncobotulinumtoxinA (Xeomin®) Neurotoxin Content and Potential Implications for Duration of Response in Patients. *Toxins*, v. 10, n. 12, p. 535, 13 dez. 2018.
- FREVERT, J. Xeomin®: an innovative new botulinum toxin type A. *European Journal of Neurology*, v. 16, p. 11–13, dez. 2009.
- FREVERT, Jürgen. Content of Botulinum Neurotoxin in Botox®/Vistabel®, Dysport®/Azzalure®, and Xeomin®/Bocouture®. *Drugs in R&D*, v. 10, n. 2, p. 67–73, 27 jul. 2010.
- FREVERT, Jürgen. Pharmaceutical, Biological, and Clinical Properties of Botulinum Neurotoxin Type A Products. *Drugs in R&D*, v. 15, n. 1, p. 1–9, 6 mar. 2015.
- FULFORD-SMITH, Antony; GALLAGHER, Conor J.; BRIN, Mitchell F. Multicentre, Randomized, Phase III Study of a Single Dose of IncobotulinumtoxinA, Free from Complexing Proteins, in the Treatment of Glabellar Frown Lines. *Dermatologic Surgery*, v. 39, n. 7, p. 1118–1119, jul. 2013.
- GART, Michael S.; GUTOWSKI, Karol A. Overview of Botulinum Toxins for Aesthetic Uses. *Clinics in Plastic Surgery*, v. 43, n. 3, p. 459–471, jul. 2016.
- HAENZI, Sara *et al.* Botulinum Toxin-A dose dependent perceptual loss on the hand after its cosmetic use on the face. *Cortex*, v. 63, p. 118–120, fev. 2015.
- HARII, Kiyonori *et al.* OnabotulinumtoxinA (Botox) in the Treatment of Crow's Feet Lines in Japanese Subjects. *Aesthetic Plastic Surgery*, v. 41, n. 5, p. 1186–1197, 21 out. 2017.
- HEXSEL, Doris *et al.* Field effect of two commercial preparations of botulinum toxin type A: A prospective, double-blind, randomized clinical trial. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 67, n. 2, p. 226–232, ago. 2012.
- JACKY, Birgitte P. S. *et al.* Identification of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) as a Protein Receptor for Botulinum Neurotoxin Serotype A (BoNT/A). *PLoS Pathogens*, v. 9, n. 5, p. e1003369, 16 maio 2013.

JAHN, Reinhard; SCHELLER, Richard H. SNAREs — engines for membrane fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 7, n. 9, p. 631–643, 16 set. 2006.

JHANG, Jia-Fong; KUO, Hann-Chorng. Botulinum Toxin A and Lower Urinary Tract Dysfunction: Pathophysiology and Mechanisms of Action. *Toxins*, v. 8, n. 4, p. 120, 21 abr. 2016.

JOHNSON, Eric A.; BRADSHAW, Marite. Clostridium botulinum and its neurotoxins: a metabolic and cellular perspective. *Toxicon*, v. 39, n. 11, p. 1703–1722, nov. 2001.

JOSEPH JH, EATON LL, ROBINSON J, PONTIUS A, Williams EF III. Does Increasing the Dose of Abobotulinumtoxina Impact the Duration of Effectiveness for the Treatment of Moderate to Severe Glabellar Lines? *J Drugs Dermatol.*, v. 15, n. 12, p. 1544- 1549., 2016.

KAMMERER, Richard A.; BENOIT, Roger M. Botulinum neurotoxins: new questions arising from structural biology. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 39, n. 11, p. 517–526, nov. 2014.

KARSAI, Syrus; RAULIN, Christian. Botox and Dysport: Is there a dose conversion ratio in dermatology and aesthetic medicine? *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 62, n. 2, p. 346–347, fev. 2010.

KASSIR, Ramtin; KOLLURU, Aparanjita; KASSIR, Martin. Triple-Blind, Prospective, Internally Controlled Comparative Study Between Abobotulinumtoxina and Onabotulinumtoxina for the Treatment of Facial Rhytids. *Dermatology and Therapy*, v. 3, n. 2, p. 179–189, 16 dez. 2013.

KAUFMAN-JANETTE, Joely *et al.* Botulinum Toxin Type A for Glabellar Frown Lines: What Impact of Higher Doses on Outcomes? *Toxins*, v. 13, n. 7, p. 494, 16 jul. 2021.

KERSCHER, Martina *et al.* Comparison of the spread of three botulinum toxin type A preparations. *Archives of Dermatological Research*, v. 304, n. 2, p. 155–161, 15 mar. 2012.

KERSCHER, Martina *et al.* Incobotulinumtoxina Demonstrates Safety and Prolonged Duration of Effect in a Dose-Ranging Study for Glabellar Lines. *Journal of Drugs in Dermatology*, v. 19, n. 10, p. 985–991, 1 out. 2020.

KROKEN, Abby R. *et al.* Entry of Botulinum Neurotoxin Subtypes A1 and A2 into Neurons. *Infection and Immunity*, v. 85, n. 1, jan. 2017.

LACY, D. Borden *et al.* Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nature Structural Biology*, v. 5, n. 10, p. 898–902, out. 1998.

LAUC, Gordan *et al.* Mechanisms of disease: The human N-glycome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1860, n. 8, p. 1574–1582, ago. 2016.

LEE, Kwangkook *et al.* Molecular basis for disruption of E-cadherin adhesion by botulinum neurotoxin A complex. *Science*, v. 344, n. 6190, p. 1405–1410, jun. 2014.

LI, Xiaqing; COFFIELD, Julie A. Structural and Functional Interactions between Transient Receptor Potential Vanilloid Subfamily 1 and Botulinum Neurotoxin Serotype A. *PLOS ONE*, v. 11, n. 1, p. e0143024, 8 jan. 2016.

MAHRHOLD, Stefan *et al.* Only the complex N559-glycan in the synaptic vesicle glycoprotein 2C mediates high affinity binding to botulinum neurotoxin serotype A1. *Biochemical Journal*, v. 473, n. 17, p. 2645–2654, 1 set. 2016.

MICHAELS, Basil M. *et al.* Prospective Randomized Comparison of OnabotulinumtoxinA (Botox) and AbobotulinumtoxinA (Dysport) in the Treatment of Forehead, Glabellar, and Periorbital Wrinkles. *Aesthetic Surgery Journal*, v. 32, n. 1, p. 96–102, 1 jan. 2012.

PICKETT, Andy. Botulinum Toxin as a Clinical Product: Manufacture and Pharmacology. *Clinical Applications of Botulinum Neurotoxin*. New York, NY: Springer New York, 2014. p. 7–49.

PICKETT, Andy. Dysport®: Pharmacological properties and factors that influence toxin action. *Toxicon*, v. 54, n. 5, p. 683–689, out. 2009.

PIRAZZINI, Marco *et al.* Botulinum Neurotoxins: Biology, Pharmacology, and Toxicology. *Pharmacological Reviews*, v. 69, n. 2, p. 200–235, 29 abr. 2017.

POLACCO, Marc A *et al.* A Double-Blind, Randomized Clinical Trial to Determine Effects of Increasing Doses and Dose-Response Relationship of IncobotulinumtoxinA in the Treatment of Glabellar Rhytids. *Aesthetic Surgery Journal*, v. 41, n. 6, p. NP500–NP511, 18 maio 2021.

RAPPL, Thomas *et al.* Onset and duration of effect of incobotulinumtoxinA, onabotulinumtoxinA, and abobotulinumtoxinA in the treatment of glabellar frown lines: a randomized, double-blind study. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, p. 211, set. 2013.

ROSSETTO, Ornella; PIRAZZINI, Marco; MONTECUCCO, Cesare. Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology*, v. 12, n. 8, p. 535–549, 30 ago. 2014.

SAMIZADEH, Souphiyeh; DE BOULLE, Koenraad. Botulinum neurotoxin formulations: overcoming the confusion. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, v. Volume 11, p. 273–287, maio 2018.

SCHIAVO, Giampietro; MATTEOLI, Michela; MONTECUCCO, Cesare. Neurotoxins Affecting Neuroexocytosis. *Physiological Reviews*, v. 80, n. 2, p. 717–766, 4 jan. 2000.

SETLER, Paulette E. Therapeutic Use of Botulinum Toxins: Background and History. *The Clinical Journal of Pain*, v. 18, n. Supplement, nov. 2002.

SINGH, Bal Ram; KUKREJA, Roshan. The botulinum toxin as a therapeutic agent:

molecular and pharmacological insights. *Research and Reports in Biochemistry*, p. 173, dez. 2015.

SOLISH, Nowell *et al.* Efficacy and Safety of OnabotulinumtoxinA Treatment of Forehead Lines. *Dermatologic Surgery*, v. 42, n. 3, p. 410–419, mar. 2016.

SPOSITO, Maria Matilde de Mello. Toxina Botulínica do Tipo A: mecanismo de ação. *Acta Fisiátrica*, v. 16, n. 1, p. 25–37, 9 mar. 2009.

SÜDHOF, Thomas C.; ROTHMAN, James E. Membrane Fusion: Grappling with SNARE and SM Proteins. *Science*, v. 323, n. 5913, p. 474–477, 23 jan. 2009.

SUGAWARA, Yo *et al.* Botulinum hemagglutinin disrupts the intercellular epithelial barrier by directly binding E-cadherin. *Journal of Cell Biology*, v. 189, n. 4, p. 691–700, 17 maio 2010.

The Joanna Briggs Institute. *Joanna Briggs Institute Reviewers' Manual*: [S.l.]: Adelaide: JBI, 2015. .

THOMAS, Andrew J. *et al.* Effect of 3 Commercially Available Botulinum Toxin Neuromodulators on Facial Synkinesis. *JAMA Facial Plastic Surgery*, v. 20, n. 2, p. 141–147, mar. 2018.

WAGMAN, Jack; BATEMAN, J.B. Botulinum type A toxin: Properties of a toxic dissociation product. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 45, n. 2, p. 375–383, ago. 1953.

WENZEL, Richard G. Pharmacology of Botulinum Neurotoxin Serotype A. *American Journal of Health-System Pharmacy*, v. 61, n. suppl\_6, p. S5–S10, 1 nov. 2004.