

FACULDADE SETE LAGOAS – FACSETE
Pós-Graduação em Harmonização Orofacial

Isis Oliveira Gomes Imperiano

A IMUNOGENICIDADE NO EFEITO TERAPÊUTICO DA TOXINA BOTULÍNICA

Rio de Janeiro

2021

Isis Oliveira Gomes Imperiano

A IMUNOGENICIDADE NO EFEITO TERAPÊUTICO DA TOXINA

Monografia apresentada ao programa de pós-graduação em Odontologia da Faculdade Sete Lagoas- FACSETE, como requisito parcial para a obtenção do título de especialista em Harmonização Orofacial.

Orientador: Prof. Marcos Valério
Teixeira

Rio de Janeiro

2021



Isis Oliveira Gomes Imperiano

A IMUNOGENICIDADE NO EFEITO TERAPÊUTICO DA TOXINA BOTULÍNICA

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao programa de pós-graduação em Odontologia, Faculdade Sete Lagoas - FACSETE, como requisito parcial para obtenção do título de especialista em Harmonização Orofacial.

Aprovado em ___/___/___ pela banca constituída dos seguintes professores:

Prof. Dr. Marcos Valério Teixeira

Doutor em Odontologia

Orientador

Profa. Ana Carolina Nogueira B. Basile

Especialista em Harmonização Orofacial

Profa. Nubya Mattos de Azevedo

Pós-graduada em Harmonização Orofacial

Rio de Janeiro, 17 de agosto de 2021.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por ter me dado sabedoria para escolher o caminho certo, que me deu forças para passar pelos momentos de dificuldades e incertezas até chegar até aqui. Gostaria de agradecer aos meus pais que sempre me apoiaram e sempre priorizaram a educação e busca pelo conhecimento ao longo de toda minha vida. Meus agradecimentos também ao meu marido que sempre me apoiou e incentivou.

Aos meus colegas de turma, com quem aprendi muito e cultivamos uma amizade que foi além da sala de aula durante esses meses de curso, especialmente, a Letícia minha amiga desde a graduação, aos amigos que conheci no curso Márcia, Raíza e Fábio.

Obrigada a todos os professores que ministraram as aulas, passando conhecimento e suas experiências. Agradeço especialmente aos professores; Marcus Valério por ter sido meu orientador, professora Nubya Mattos por sempre estar disposta a nos ouvir, professora Ana Carolina Basile por ter nos acolhido como seus alunos, agradeço especialmente a professora Lívia Lacerda pelo apoio e incentivo na área da Harmonização, agradeço também a professora Waleska Demps por sempre nos ajudar. Muito obrigada a Daira e a Monique por sempre estarem presentes na clínica e nos ajudarem com tanta paciência e profissionalismo.

RESUMO

A toxina botulínica é produzida pela bactéria *Clostridium botulinum*, que atua na junção neuromuscular e inibe a ação da acetil colina, impedindo que haja contração muscular. Devido ao seu mecanismo de ação, o seu uso possui diversas finalidades terapêuticas e estéticas. Porém o seu efeito é transitório, sendo necessário a realização de aplicações frequentes do produto. Com isso, tem se levado em consideração o desenvolvimento da formação de anticorpos, fazendo com que os pacientes criem resistência ao tratamento com a toxina. O objetivo desse estudo foi realizar uma revisão de literatura para avaliar os fatores que podem causar imunogenicidade e seu impacto no tratamento dos pacientes.

Palavras-chave: Imunogenicidade, Toxina Botulínica, Botox.

ABSTRACT

Botulinum toxin is produced by the bacterium *Clostridium botulinum*, which acts at the neuromuscular junction and inhibits the action of acetyl choline, preventing muscle contraction. Due to its mechanism of action, its use has several therapeutic and esthetic purposes. However, its effect is transitory, requiring frequent applications of the product. With this, the development of antibodies has been taken into consideration, causing patients to become resistant to treatment with the toxin. The objective of this study was to conduct a literature review to evaluate the factors that can cause immunogenicity and its impact on patient treatment.

Keywords: Immunogenicity, Botulinum Toxin, Botox.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 PROPOSIÇÃO	10
3 REVISÃO DA LITERATURA	11
3.1 Tipos de toxinas	13
3.2 Relação de imunogenicidade	14
3.3 Ensaio	16
3.4 Soluções	17
3.5 Relação com o tipo de aplicação	18
4 DISCUSSÃO	19
5 CONCLUSÃO.....	20

1 INTRODUÇÃO

A toxina botulínica foi clinicamente utilizada pela primeira vez na década de 1970 em oftalmologia para tratar o estrabismo e ao longo dos últimos 20 anos ganhou ampla utilização em diversas áreas da medicina e estética. A vasta gama de indicações médicas para toxina botulínica inclui desde distúrbios do movimento (por exemplo, espasticidade, distonia cervical), distúrbios urológicos (por exemplo bexiga hiperativa), até aplicações cosméticas.

Na odontologia, a toxina botulínica é usada como forma de tratamento para cefaléia tensional, disfunção temporomandibular (DTM), dor orofacial, bruxismo, sorriso gengival, queilite angular, sorriso assimétrico, hipertrofia de masseter, pós-operatório de cirurgias periodontais e de implantes, sialorreia além de aplicações estéticas.

Neurotoxinas botulínicas (BoNTs) são toxinas proteicas produzidas pela bactéria anaeróbica Gram-positiva *Clostridium botulinum*. Elas são expressas como um polipeptídeo de cadeia única inativa, que é fracionado pós tradução em duas subunidades de cadeias peptídeas, uma subunidade pesada com 100 kDa e outra subunidade leve com 50 kDa, que estão ligadas por uma ponte de dissulfeto (KUMARAN et al, 2008).

De acordo com Atassi (2015) injeções de doses subletais da toxina no músculo afetado provocam o seu relaxamento temporário. Porém, a ação clínica da toxina tende a reduzir em semanas ou meses (dependendo do sorotipo usado) após a injeção, sendo necessária a reaplicação em 3 a 6 meses, o que pode resultar na resposta a anticorpos que podem bloquear a ação da toxina.

Múltiplos fatores podem induzir a imunogenicidade, tais como a produção de carga de proteínas antigênicas e a presença de proteínas acessórias. Além disso, fatores relacionados com o tratamento; tais como a dose global de toxinas, a frequência das injeções, e a exposição prévia a toxina botulínica também pode influenciar na imunogenicidade.

A imunogenicidade pode ser primária ou secundária. A não-resposta primária ocorre quando há falta de resposta à primeira aplicação de toxina

botulínica e a não-resposta secundária ocorre em pacientes que responderam anteriormente, mas a o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes tornou a toxina botulínica menos eficaz ou ineficaz (NAUMANN et al, 2013).

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo desta revisão de literatura é avaliar o impacto da imunogenicidade na resposta do paciente ao tratamento com toxina botulínica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A terapia com toxina botulínica tem sido uma opção de tratamento segura e eficaz para uma variedade de condições neurológicas e não neurológicas. De acordo com Naumann et al (2013), o uso da toxina botulínica é recomendado para tratar condições crônicas como distonia cervical, blefarospasmo, estrabismo, hiperidrose, entre outras doenças. Em geral, sabe-se que sua aplicação é segura, no entanto, esses procedimentos não estão livres do acionamento de anticorpos neutralizantes produzidos pelo próprio organismo. Este resultado, por sua vez, pode acarretar reações indesejáveis durante o procedimento, embora sejam inofensivos, em sua maioria (BIGALKE, 2013).

Ao avaliar 471 casos de pacientes tratados com toxina botulínica, Walter et al (2020) puderam investigar os principais riscos decorrentes da produção desses anticorpos. A priori, foram avaliadas o comportamento da relação entre esses anticorpos com condições como espasmos hemifaciais, bleofroespasmo, distonia cervical, outras distonias e espasticidade. Os resultados apontam que o risco global de NAB-cSTF é baixo nas indicações e formulações da BoNT, no entanto, é recomendável utilizar a dose mais baixa possível, particularmente na distonia cervical e evitar a combinação desnecessária entre diferentes formulações. Tais conclusões, portanto, apontam para uma necessidade de dedicar atenção ao assunto.

Embora a formação de NABs (anticorpos neutralizantes) continue a ser uma preocupação, existem hoje várias estratégias que podem ser utilizadas para mitigar o desenvolvimento da imunorresistência, como o desenvolvimento de formulações de produtos que estão associados a uma carga mínima de proteínas, evitar o uso de adjuvantes, intervalo seguro entre as injeções, e a utilização da dose menor que proporcione uma resposta clínica ótima e que não comprometa os potenciais benefícios (BELLOWS & JANKOVIC, 2019).

Sob esse viés, esse estudo realizou sua revisão em 19 artigos científicos, encontrados nas principais bases de dados disponíveis. Os resultados estão expostos na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1 – Estudos revisados.

Autor	Título
Naumann et al (2013)	Immunogenicity of botulinum toxins
Albrecht et al (2019)	High prevalence of neutralizing antibodies after long-term botulinum neurotoxin therapy
Atassi (2015)	Molecular basis of immunogenicity to botulinum neurotoxins and uses of the defined antigenic regions
Bellows & Jankovic (2019)	Immunogenicity Associated with Botulinum Toxin Treatment
Benecke (2012)	Clinical relevance of botulinum toxin immunogenicity
Chinnapongse et al (2012)	Immunogenicity and Long-Term Efficacy of Botulinum Toxin Type B in the Treatment of Cervical Dystonia: Report of 4 Prospective, Multicenter Trials
Frevert (2015)	Pharmaceutical, biological, and clinical properties of botulinum neurotoxin type A products
Rahman et al (2021)	Immunogenicity to Botulinum Toxin Type A: A Systematic Review With Meta-Analysis Across Therapeutic Indications
Mathevon et al (2019)	Immunogenicity induced by botulinum toxin injections for limb spasticity: A systematic review
Srinoulprasert et al (2020)	Antibody-induced botulinum toxin treatment failure: A review and novel management approach
Walter et al (2020)	Frequency and risk factors of antibody-induced secondary failure of botulinum neurotoxin therapy
Lacroix-Desmazes et al (2017)	Systematic analysis of botulinum neurotoxin type A immunogenicity in clinical studies
Jankovic et al (2006)	Clinico-immunologic aspects of botulinum toxin type B treatment of cervical dystonia
Mejia et al (2005)	Long-term botulinum toxin efficacy, safety, and immunogenicity
Fabbri et al (2016)	Neutralizing Antibody and Botulinum Toxin Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis
Hefter et al (2016)	High Botulinum Toxin-Neutralizing Antibody Prevalence Under Long-Term Cervical Dystonia Treatment
Borodic (2007)	Botulinum toxin, immunologic considerations with long-term repeated use, with emphasis on cosmetic applications
Bigalke (2013)	Botulinum toxin: application, safety, and limitations
Dressler et al (2003)	Botulinum toxin type B in antibody-induced botulinum toxin type A therapy failure

Fonte: Elaboração própria.

3.1 Tipos de toxinas

A toxina botulínica é uma proteína produzida por uma bactéria. A bactéria responsável por sua origem, chamada *Clostridium Botulinum*, também é responsável pelo desenvolvimento de sete tipos diferentes de toxinas, nomeadas de A a G, e a mesma é conhecida há muito tempo devido a suas propriedades de paralização muscular.

Dos sete BoNTs antigenicamente distintos, apenas dois são raros, tipo A (BoNT-A) e tipo B (BoNT-B), estão normalmente disponíveis para uso terapêutico. O Tipo A (TBA) é o mais potente e amplamente estudado, por isso, o mais utilizado em procedimentos estéticos.

Quanto maior a duração, maior a especificidade, e potência de BoNT-A e BoNT-B tornando-os agentes mais eficazes para aplicações terapêuticas. Cada BoNT com o seu nome distinto difere na composição, em quantidade do ingrediente ativo, excipientes, dosagem e potência. (BIGALKE, 2013)

Os benefícios terapêuticos da BoNT/A não são permanentes, e são necessárias injeções periódicas. Por outro lado, injeções repetidas de BoNT/A representam um risco inevitável de desenvolvimento das NABs (anticorpos neutralizantes) (ALBRECHT et al, 2019).

Ainda assim, existem alguns tipos de toxina botulínica A como Abobotulinumtoxina A, Incobotulinumtoxina A, e Onabotulinumtoxina A usadas para indicações terapêuticas que apresentam baixa incidência de anticorpos neutralizantes, porém as mesmas possuem suas especificidades, que serão abordadas por alguns estudos nessa revisão.

Hoje em dia, no Brasil, existem 7 marcas principais responsáveis pela comercialização de variações dos tipos dessa toxina, são elas: Botox, Xeomin, Prosigne, Dysport, Botulift, Botulim e Nabota.

3.2 Relação de imunogenicidade

A respeito da capacidade de prevalência de anticorpos neutralizantes contra a toxina botulínica tipo A (BoNT/A), Albrecht et al (2019) realizou um experimento com um tratamento a longo prazo em diferentes indicações neurológicas e observando a relação entre a resposta imunológica e a aplicação da toxina, considerando variáveis como duração do tratamento e condição a ser tratada. Os resultados deste estudo apontaram para um total de 13,9% de respostas imunológicas mensuráveis (83 de 596 pacientes), onde a principal relação identificada foi em relação a quantidade de doses, ao passo que a duração do tratamento ou a doença a ser tratada não tiveram muita influência.

De maneira semelhante, Bellows e Jankovic (2019) realizaram investigações acerca da relação de prevalência entre os anticorpos e as toxinas. Foi identificado que a presença de anticorpos foi atribuída aos intervalos de dosagem, onde uma menor periodicidade implica num fomento ao desenvolvimento dos anticorpos.

Mathevon et al (2019), por sua vez, identificaram em seus estudos que a prevalência de anticorpos neutralizantes foi de apenas 1%, com diferença insignificante entre os três tipos de toxina botulínica tipo A avaliados. Em contrapartida, Rahman et al (2021) constatam, a partir dos seus estudos, uma diferença um pouco superior de respostas secundárias a partir do tratamento com essas mesmas toxinas, com resultados de imunorresistência, sendo identificados numa proporção de 7,4% em pacientes tratados pela Incobotulinumtoxina A e 0,3% em pacientes tratados com a Onabotulinumtoxina A. Essa diferença pode ser justificada pela metodologia de estudo, onde o tipo de tratamento era diferenciado, no entanto, representa a variabilidade de possíveis reações da toxina.

Já nos estudos de Lacroix-Desmazes et al (2017), que fizeram avaliações semelhantes a Matheyon et al (2019), não foram encontradas diferenças significativas entre os resultados a partir da análise da abobotulinumtoxinA e incobotulinumtoxinA. Além disso, foi constatado que a taxa global de anticorpos neutralizantes foi, num quadro geral, inferior a 2,1% e, portanto, não apresentando grandes impactos em relação a não-responsividade clínica.

Ainda sobre essa perspectiva, Fabbri et al (2016) conduziram um estudo semelhante onde foi possível observar que a prevalência de NAbs foi mais baixa (3,5%) entre os pacientes clinicamente respondedores e mais elevada em 53,5% em pacientes sem resposta secundária. Cerca de metade dos pacientes que não apresentam resposta secundária não tem anticorpos neutralizantes.

A respeito da toxina botulínica tipo B (BoNT/B), Jankovic et al (2006) realizaram um estudo observacional, de forma que fosse possível investigar o comportamento dessa toxina no que tange a imunogenicidade. De acordo com o estudo, apesar de os efeitos de imunorresistência serem baixos na toxina tipo A, é observado que a utilização da toxina tipo B apresenta melhores resultados, a depender da situação. Dentre elas, a toxina pode se tornar uma alternativa para a aplicação em pacientes que já tenham desenvolvido anticorpos do tipo A. Além disso, Jankovic et al (2006) realizaram um experimento em pacientes e foi observado que um terço das amostras que foram negativadas na primeira análise apresentaram identificação de anticorpos na última.

Com essa perspectiva, o autor sugere que seja realizada uma monitorização com MPA nesses casos, sendo necessária uma maior investigação avaliando outros determinantes da imunorresistência, tais como a frequência de administração, dosagem e outros fatores potenciais de risco, a fim de identificar a origem desses números.

Para Benecke (2012), a prevalência da imunorresistência é variante a depender dos fatores geracionais. Neste estudo foram avaliadas diversas composições e excipientes da toxina botulínica, e foi constatado por Benecke (2012) que a presença de proteínas complexantes nos agentes neurotóxicos botulínicos é responsável pelo aumento da carga proteica e pode ser o causador de respostas imunitárias mais exacerbadas.

Por outro lado, os estudos de Frevert (2012) apontam que os efeitos pós-operatórios de imunorresistência podem ter como origem a presença de toxinas inativas e proteínas complexantes, onde a presença dessas últimas contribui para a carga proteica global da preparação, ao passo que se torna irrelevante para sua eficácia clínica. Além disso, foi identificado que, apesar de essa resposta imunológica não ser uma questão considerada em procedimentos estéticos, é

importante se preocupar com os efeitos a longo prazo em pacientes que fazem o uso regular da toxina.

Hafter et al (2016) realizaram um estudo que objetivava investigar a influência da toxina botulínica a longo tempo. Através do resultado, foi identificado que houve uma prevalência de anticorpos neutralizantes em doentes tratados a longo prazo significativamente maior que aqueles tratados a curto prazo, apontando que o período de exposição é um fator considerável para esse estudo.

Sob essa perspectiva, para verificar o comportamento da resposta imunológica a partir da aplicação da toxina em pacientes com distonia cervical, Chinnapongse et al (2012) realizou ensaios clínicos em diferentes cenários, utilizando a toxina botulínica BoNT/B, por um longo período (6 anos), para avaliar a evolução temporal do tratamento. Com isso, foi identificado que a toxina tipo B se mostrou eficaz no tratamento a longo prazo, apresentando alto perfil de segurança e taxas de resposta clínica sem maiores relações com o tratamento.

Em consonância com esse objetivo, Meija et al (2005) realizaram um longo estudo durante 12 anos, avaliando de forma contínua em 45 pacientes. Como resultado desse estudo, pôde-se observar que, no total, 20 reações adversas ocorreram em 16 de 45 (35,6%) pacientes após a sua visita inicial e 11 reações adversas em 10 de 45 (22,2%) pacientes na sua última visita. Dessa forma, entendendo que um estudo de tamanha magnitude (por levar anos de pesquisa) possui suas limitações, mas os autores concluem que o uso da toxina é um tratamento eficaz com uma baixa incidência de imunogenicidade mesmo após 18 anos de utilização, particularmente se forem tomadas medidas apropriadas para minimizar o risco de formação de anticorpos.

3.3 Ensaios

Existe uma série de ensaios que podem ser realizados para determinar esses índices. Pode-se citar o ensaio ELISA (“Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay) que se baseia reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas e também bioensaios baseados em ratos. No entanto, percebe-se que

não existem relações consistentes entre a identificação dos anticorpos e sua resposta clínica (BELLOWS e JANKOVIC, 2019).

Além disso, de acordo com Fabbri et al (2016), um dos maiores desafios para entender a dinâmica relacionada a esses fatores é a limitação devido a heterogeneidade da concepção do estudo e dos resultados. Diversos fatores podem influenciar a produção de anticorpos a toxina, como por exemplo a verificação se há predisposição genética, frequência e local de injeção, técnica de injeção, dose cumulativa, entre outros.

Dessa forma, fica claro que a literatura exige estudos mais profundos e, portanto, ensaios altamente sensíveis e ensaios estruturais específicos que são baratos e facilmente acessíveis para monitorização a longo prazo. Uma vez que estes ensaios estejam disponíveis, devem ser avaliados criticamente em estudos longitudinais para definir e clarificar a relação entre NABs e SNR. Uma melhor compreensão da imunologia e mecanismos envolvidos no desenvolvimento de NABs conduzirão, sem dúvida, a estratégias para prevenir ou tratar a imunorresistência relacionada com a BoNT.

3.4 Soluções

Uma alternativa para bloquear a formação destes anticorpos é o uso de peptídeos sintéticos. De fato, estes foram capazes de inibir a ação da toxina in vivo. Nos estudos de Benecke (2012), a combinação de três peptídeos sintéticos fortes antigênicos foi capaz de bloquear os anticorpos em 88% dos soros de doentes imunorresistentes.

Por outro lado, Atassi (2015) afirma que a administração de epítopos selecionados, pré-ligados no seu grupo de N (alfa) para monometoxietilenoglicol, em ratos com anticorpos neutralizantes anti-toxina promove níveis reduzidos de anticorpo bloqueador nos destinatários. Sendo assim, uso de peptídeos sintéticos pode ser adequado para aplicações clínicas. Os epítopos definidos também devem ser valiosos na concepção de vacinas sintéticas.

As preparações utilizadas para indicações cosméticas devem ser testadas quanto à antigenicidade em estudos prospectivos com testes de anticorpos disponíveis. Além disso, como os doentes terapêuticos necessitam frequentemente de injeções crônicas por muitos anos, as preparações com o menor potencial antigênico devem ser preferidas. (BORODIC, 2007)

3.5 Relação com o tipo de aplicação

Em relação ao tipo de aplicação para que é utilizado, a prevalência de anticorpos neutralizantes é muito mais baixa após tratamento com BoNT para a espasticidade dos membros do que a distonia cervical.

Os estudos analisados indicam que devem ser definidos critérios consensuais para diagnosticar a não-resposta à injeção de BoNT, porque a imunogenicidade não é a causa mais comum de não resposta a este tipo de tratamento. Os anticorpos neutralizantes devem ser procurados em indivíduos sem resposta secundária e sem outra causa que explique a ineficácia do tratamento (MATHEVON et al, 2019).

O risco global da falha no tratamento pela formação de anticorpos neutralizantes é baixo nas indicações e formulações da BoNT, logo é recomendável utilizar a dose mais baixa possível, particularmente na distonia cervical e evitar a combinação desnecessária entre diferentes formulações. (WALTER et al, 2020).

4 DISCUSSÃO

A toxina botulínica (BTX) é um tratamento eficaz com uma baixa incidência de imunogenicidade mesmo após longo tempo de utilização, particularmente se forem tomadas medidas apropriadas para minimizar o risco de formação de anticorpos. (MEJIA et al, 2005). A análise de vários fatores que podem influenciar o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes (NABs), ou seja, se há predisposição genética, frequência e local de injeção, técnica de injeção, dose cumulativa, e desnaturação de toxinas que não foram especificamente avaliados devido à escassez e heterogeneidade dos dados. A identificação de todos estes dados em falta devem ser tidos em conta a fim de melhorar a metodologia de estudos futuros. (FABBRI et al, 2016)

Devido a sua elevada eficácia e potência, a toxina botulínica (BoNT) é benéfica para um elevado número de pacientes que sofrem de sintomas dolorosos, perturbadores e desfigurantes. A aplicação é segura quando são utilizadas doses recomendadas. Apenas poucas e suaves reações adversas podem ocorrer. Nos piores casos, pode ocorrer o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes. (BIGAKLE,2013)

A falha no tratamento e não-resposta secundária aos produtos de neurotoxinas botulínicas são frequentemente o resultado de outros fatores que não a presença de anticorpos neutralizantes. No entanto, tendo em conta o risco potencial de insucesso do tratamento secundário, estratégias clínicas para reduzir ou eliminar potenciais fatores de risco que podem levar ao desenvolvimento de anticorpos neutralizantes devem ser considerados. Neste momento, uma boa estratégia é mitigar a formação de anticorpos usando a menor quantidade de doses que produzem um efeito terapêutico significativo e empregar um intervalo entre as injeções mais longo clinicamente aceitável. (NAUMANN et al ,2013)

5 CONCLUSÃO

O desenvolvimento da imunogenicidade vai depender de vários fatores como frequência das injeções, técnica, composição do fabricante (se há presença ou não de proteínas complexantes), sistema imunológico do próprio paciente que podem ser contornados utilizando-se a dose mínima suficiente para ter o efeito terapêutico desejado, realizando as injeções em intervalos maiores e utilização de formulações mais recentes que tenham menor potencial alergênico.

REFERÊNCIAS

Albrecht P, Jansen A, Lee JI, Moll M, Ringelstein M, Rosenthal D, Bigalke H, Aktas O, Hartung HP, Hefter H. High prevalence of neutralizing antibodies after long-term botulinum neurotoxin therapy. *Neurology*. 2019.

Atassi MZ. Molecular basis of immunogenicity to botulinum neurotoxins and uses of the defined antigenic regions. *Toxicon*. 2015.

Bellows S, Jankovic J. Immunogenicity associated with botulinum toxin treatment. *toxins (Basel)*. 2019.

Benecke R. Clinical relevance of botulinum toxin immunogenicity. *BioDrugs*. 2012.

Bigalke H. Botulinum toxin: application, safety, and limitations. *Curr top microbiol. Immunol*. 2013.

Borodic G. Botulinum toxin, immunologic considerations with long-term repeated use, with emphasis on cosmetic applications. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2007.

Chinnapongse RB, Lew MF, Ferreira JJ, Gullo KL, Nemeth PR, Zhang Y. Immunogenicity and long-term efficacy of botulinum toxin type B in the treatment of cervical dystonia: report of 4 prospective, multicenter trials. *Clin Neuropharmacol*. 2012.

Dressler D, Bigalke H, Benecke R. Botulinum toxin type B in antibody-induced botulinum toxin type A therapy failure. *J Neurol*. 2003.

Fabbri M, Leodori G, Fernandes RM, Bhidayasiri R, Marti MJ, Colosimo C, Ferreira JJ. Neutralizing Antibody and Botulinum Toxin Therapy: A Systematic review and meta-analysis. *Neurotox Res*. 2015.

Frevert J. Pharmaceutical, biological, and clinical properties of botulinum neurotoxin type A products. *Drugs R D*. 2015.

Hefter H, Rosenthal D, Moll M. High Botulinum toxin-neutralizing antibody prevalence under long-term cervical dystonia treatment. *Mov Disord Clin Pract*. 2016.

Jankovic J, Hunter C, Dolimbek BZ, Dolimbek GS, Adler CH, Brashear A, Comella CL, Gordon M, Riley DE, Sethi K, Singer C, Stacy M, Tarsy D, Atassi MZ. Clinico-immunologic aspects of botulinum toxin type B treatment of cervical dystonia. *Neurology*. 2006.

Kumaran, D., Rawat, R., Ahmed, S.A., Swaminathan, S.. Substrate binding mode and its implication on drug design for botulinum neurotoxin A. *PLoS Pathog*. 2008; 4 (9), e1000165.

Lacroix-Desmazes S., S. Mouly, M. Popoff and C. Colosimo. Systematic analysis of botulinum neurotoxin type A immunogenicity in clinical studies. *Basal ganglia* 9. 2017.

Mathevon L, Declémy A, Laffont I, Perennou D. Immunogenicity induced by botulinum toxin injections for limb spasticity: A systematic review. *Ann Phys Rehabil Med*. 2019.

Mejia NI, Vuong KD, Jankovic J. Long-term botulinum toxin efficacy, safety, and immunogenicity. *Mov Disord*. 2005.

Naumann M, Boo LM, Ackerman AH, Gallagher CJ. Immunogenicity of botulinum toxins. *J Neural Transm (Vienna)*. 2013.

Rahman E, Alhitmi HK, Mosahebi A. Immunogenicity to toxin type A: A systematic review with meta-analysis across therapeutic indications. *Aesthetic Surgery Journal*. 2021.

Srinoulprasert Y, Wanitphakdeedecha R. Antibody-induced botulinum toxin treatment failure: A review and novel management approach. *J Cosmet Dermatol*. 2020.

Walter U, Mühlhoff C, Benecke R, Dressler D, Mix E, Alt J, Wittstock M, Dudesek A, Storch A, Kamm C. Frequency and risk factors of antibody-induced secondary failure of botulinum neurotoxin therapy. *Neurology*. 2020.