RODRIGO PINTO GIMENEZ

**Análise retrospectiva das alterações da dinâmica
facial após aplicações seriadas de toxina
botulínica tipo A**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Cirurgia Plástica
Orientador: Prof. Dr. Rolf Gemperli

SÃO PAULO

2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gimenez, Rodrigo Pinto

Análise retrospectiva das alterações da dinâmica facial após aplicações seriadas de toxina botulínica tipo A / Rodrigo Pinto Gimenez. -- São Paulo, 2006.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Cirurgia.

Área de concentração: Cirurgia Plástica.

Orientador: Rolf Gemperli.

Descritores: 1.Toxina botulínica tipo A 2.Face 3.Estética 4.Dose repetida
5.Rejuvenescimento

USP/FM/SBD-414/06

“A quem chamamos sábio?
Àquele que primeiro converte suas palavras em
realização, para depois ensinar”.

Confúcio (550-479 a.C.)

Dedicatória

À minha esposa Patrícia, pelo amor e eterno
companheirismo que guiam nossas vidas.

Aos meus filhos, Julia, Gisela e Vitor,
pelos momentos de minha ausência.

Aos meus pais, Claudinet e Marylides, pelo amor e constante
apoio à minha vida profissional.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rolf Gemperli, Professor Adjunto da Disciplina de Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, orientador deste projeto, pela paciência, orientação, incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. Marcus Castro Ferreira, Professor Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, orientador no início deste projeto, pelas oportunidades e confiança.

À Dra. Alessandra Grassi Salles, por incontáveis horas de parceria, colaboração, estudo e amizade, desde o princípio deste trabalho.

Ao Dr. Walter Soares Pinto, pelos ensinamentos em meus primeiros passos na especialidade de Cirurgia Plástica e pela amizade.

Ao Dr. José Carlos Marques de Faria, pelos ensinamentos, constante incentivo e amizade.

Aos colegas colaboradores do Grupo de Medicina Estética e Laser da Divisão de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da FMUSP, Drs. Priscila Helena Pinto Lotierzo, Maria Fernanda Dematté Soares, Cristina Pires Camargo e Carlos Fontana, pelo tempo em que seguimos juntos em busca de fortalecer as bases científicas desta área de atuação paralelamente à atividade assistencial, pela amizade e estímulo de todos.

Aos Assistentes e Colegas da Disciplina de Cirurgia Plástica da FMUSP, pela troca de conhecimentos, convívio, amizade, e colaboração profissional.

À Edna Maria Rodrigues dos Santos, pelo auxílio em diversas etapas da pós-graduação.

Ao Sr. Jimmy Adans Costa Palandi, pela análise estatística.

À Sra. Vanessa Alberto, pela revisão ortográfica e gramatical.

Ao Sr. Carlos Castilho Ferraz, pela revisão dos textos de língua inglesa.

À Cristiane Rubiniak e Alfredo Veloso, da Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda., pela colaboração com a literatura referente à toxina botulínica.

Aos membros da minha equipe, Patrícia, Eliana, Socorro, Fernanda, Alessandra, Silvia e Rodrigo, pelo carinho e dedicação aos nossos pacientes.

À Juliana Brito, pela supervisão da nossa Clínica, carinho, amizade e competência, possibilitando indiretamente a realização deste trabalho.

Ao Dr. Joseph Karan e Dra. Ana Hartmann pela amizade e horas de trabalho que passamos juntos.

Aos pacientes que colaboraram neste estudo.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação da FMUSP; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	8
2.1 Histórico da utilização médica da toxina botulínica	9
2.2 Farmacologia da toxina botulínica	12
2.2.1 Transmissão neuromuscular	13
2.2.2 Estrutura molecular da toxina botulínica	14
2.2.3 Mecanismo do bloqueio neuromuscular	17
2.3 Indicações e contra-indicações da utilização da toxina botulínica	30
2.4 Revisão da anatomia da musculatura das regiões frontal e glabelar...	32
2.5 Doses de toxina botulínica utilizadas para o tratamento de rugas das regiões frontal e glabelar.....	36
2.6 Efeitos colaterais e complicações da toxina botulínica.....	39
2.7 Aspectos imunológicos	41
2.8 Alterações histológicas após aplicação da toxina botulínica	43
2.9 Perspectivas em relação à toxina botulínica	44
3. MÉTODOS.....	46
3.1 Casuística	47
3.2 Métodos	50
3.2.1 Tratamento	50
3.2.2 Avaliação	60
3.2.3 Análise estatística.....	63
4. RESULTADOS.....	64
4.1 Avaliação das rugas da face.....	65
4.2 Intervalos entre as aplicações	69
4.3 Doses de toxina botulínica utilizadas.....	69
4.4 Documentação fotográfica.....	78
5. DISCUSSÃO	82
6. CONCLUSÕES.....	96
7. ANEXOS.....	98
8. REFERÊNCIAS	106

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

Acetil CoA	-	Acetil coenzima A
Arg	-	Arginina
ATP	-	Adenosina trifosfato
C. botulinum	-	Clostridium botulinum
DL ₅₀	-	Dose letal de 50%
DNA	-	Ácido desoxiribonucleico
ELISA	-	“Enzyme-linked immunosorbent assay”
FDA	-	“Food and Drug Administration”
HCFMUSP	-	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
JNM	-	Junção neuromuscular
Kd	-	Kilodalton
NSF	-	Fator sensível à N-etilmaleimida
SNAP-25	-	“Synaptosomal protein”, peso molecular 25 kilodaltons
SNARE	-	“Attachment protein receptor”
SNAREs	-	“Attachment protein receptors”
VAMP	-	“Vesicle-associated membrane protein”
4-di-2-ASP	-	Fluorescente vital
FM1-43	-	Marcador de endocitose e exocitose
ng	-	Nanograma
U	-	Unidade
Zn ²⁺	-	Zinco
Kg	-	Kilograma

RESUMO

Gimenez RP. *Avaliação retrospectiva das alterações da dinâmica facial após aplicações seriadas de toxina botulínica tipo A* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 120p.

INTRODUÇÃO: A presença de rugas na face devido à hipercinese muscular é comum nas regiões frontal, glabellar e peri-orbitárias. São descritos diversos métodos para o tratamento das rugas de expressão, como a dermoabrasão, a ablação a laser, o laser não ablativo, preenchimentos, cirurgia e aplicações de toxina botulínica. O tratamento das rugas da face com toxina botulínica tipo A é método consagrado, porém são pouco definidos os efeitos a longo prazo. Este estudo retrospectivo teve como objetivo avaliar as rugas das regiões frontal e glabellar da face em pacientes submetidas a aplicações seriadas da toxina botulínica tipo A com finalidade estética, analisando os intervalos entre as aplicações e as doses utilizadas. **MÉTODOS:** Foram analisadas 24 pacientes do sexo feminino, submetidas entre 5 a 7 aplicações da toxina botulínica tipo A, no período de julho de 1997 a junho de 2006. O tempo médio de acompanhamento foi de 42,2 ($\pm 4,0$) meses e o intervalo médio entre as aplicações de 8 ($\pm 0,51$) meses. A idade média observada de início da aplicação foi de 48,0 ($\pm 3,0$) anos, e da última aplicação foi de 51,6 ($\pm 3,0$) anos. Foram métodos de avaliação a análise da documentação fotográfica de antes da primeira e antes da última aplicação, sendo as rugas frontais e glabellares avaliadas segundo escala padronizada, e dados colhidos dos prontuários. **RESULTADOS:** A longo prazo, verificou-se: 1) amenização das rugas estáticas da região frontal em 62,5% das pacientes e em 37,5% tais rugas se mantiveram inalteradas; 2) amenização das rugas estáticas da região glabellar em 47,2% das pacientes, em 50% tais rugas se mantiveram inalteradas e em 2,8% verificou-se pouca acentuação; 3) amenização das rugas dinâmicas da região frontal em 84,7% das pacientes e em 15,3% tais rugas se mantiveram inalteradas; 4) amenização das rugas dinâmicas da região glabellar (corrugadores) em 63,9% das pacientes, em 26,4% tais rugas se mantiveram inalteradas e em 9,7% verificou-se pouca acentuação. 5) amenização das rugas dinâmicas da região glabellar (prócero) em 57% das pacientes, em 32% tais rugas se mantiveram inalteradas e em 11% verificou-se pouca acentuação. A média da dose total de toxina botulínica utilizada por sessão no presente estudo foi de $43,83 \pm 1,25$ U, e a dose total cumulativa foi de $272,08 \pm 20,42$ U. **CONCLUSÕES:** No longo prazo, existe maior porcentagem de pacientes com amenização ou aspecto inalterado das rugas estáticas e dinâmicas das regiões frontal e glabellar da face em relação a pacientes com acentuação das mesmas. Não houve variação estatisticamente significativa das médias dos intervalos entre as aplicações. A dose total de toxina botulínica aumentou de forma estatisticamente significativa até a terceira aplicação, mantendo-se sem variação significativa a partir de então.

Descritores: 1. Toxina botulínica tipo A 2. Face 3. Estética 4. Dose repetida 5. Rejuvenescimento

SUMMARY

Gimenez RP. *Retrospective analysis of facial dynamic alterations after multiple botulinum toxin A applications* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2006. 120p.

INTRODUCTION: The presence of wrinkles on the face due to the over activity of muscles is rather common on the frontal, glabellar, and periocular regions. A number of methods for the treatment of face lines, such as skin abrasion, laser resurfacing, fillers, surgery and botulinum toxin A have been described. The treatment of facial rhytids with botulinum toxin A is widely used. However, its long term effects are not well defined. This retrospective study assesses the rhytids of both the frontal and glabellar regions of the face on patients submitted to multiple botulinum toxin A applications for aesthetic use, analyzing intervals between applications and dosages. **METHODS:** 24 female patients who had undergone 5 to 7 botulinum toxin A applications from July, 1997 to June, 2006 were studied. The mean time of follow up was 42.2 ($\pm$ 4.0) months and the mean interval between applications was 8 ($\pm$ 0.51) months. The mean age of the patients at the beginning of application was 48.0 ($\pm$ 3.0) years old, and 51.6 ($\pm$ 3.0) years old at the last application. The evaluation was carried through the analysis of photographic documentation from before the first and last applications, and both frontal and glabellar rhytids were evaluated according to standardized scale, as well as data collected from patients charts. **RESULTS:** the long term analysis demonstrated that: 1) improvement of the static rhytids of the frontal region in 62,5% of patients and such rhytids remained unaltered in 37.5% of the patients; 2) improvement of the static rhytids of the glabellar region in 47.2% of the patients, they remained unaltered in 50% of the patients and there was a slight worsening in 2.8% of the patients; 3) improvement of the dynamic rhytids of the frontal region in 84.7% of patients, and they remained unaltered in 15.3% of the patients; 4) improvement of the dynamic rhytids of the glabellar region (corrugator) in 63.9% of the patients, they remained unaltered in 26.4% of the patients and there was a slight worsening in 9.7% of the patients; 5) improvement of the dynamic rhytids of the glabellar region (procerus) in 57% of the patients, they remained unaltered in 32% and there was a slight worsening in 11% of the patients. The mean total dosage of botulinum toxin A used per session in this study was 43.83 ± 1.25 U, and the total cumulative dosage was 272.08 ± 20.42 U. **CONCLUSIONS:** In the long run, a higher percentage of patients showed improvement or unaltered aspect of their static and dynamic rhytids of the frontal and glabellar regions of the face, when compared to the patients that showed worsening. There was no variation of the mean intervals between the applications. The total dosage of botulinum toxin was significantly increased up to the third application, and kept stable in the following sessions.

Descriptors: 1. Botulinum toxin type A 2. Face 3. Esthetics 4. Dose repetition 5. Rejuvenation

1. INTRODUÇÃO

O padrão de beleza está relacionado a valores culturais e sociais. A sociedade vigente determinou que a beleza está associada à juventude. Concordando ou não com esta premissa, o interesse em parecer mais jovem sempre fez parte da história. Atualmente o chamado rejuvenescimento facial vem apresentando suporte de bilhões de dólares através das indústrias de cosméticos e afins, propondo inúmeros tratamentos no intuito de fornecer a aparência mais jovial¹. Produtos tópicos, substâncias de preenchimento, equipamentos a laser e diversos tipos de toxina botulínica foram lançados no mercado de maneira intempestiva, dificultando o estudo, a confiabilidade e a comprovação científica destes novos métodos.

Os sinais exteriores da idade variam enormemente de indivíduo para indivíduo. Os principais determinantes da idade facial incluem a predisposição genética, o tabagismo, a exposição solar e a atividade muscular. Com o processo de envelhecimento da face, algumas estruturas, como ossos e tecidos de partes moles, sofrem alterações progressivas e permanentes ao longo do tempo. Os ossos sofrem atrofia, alterando assim o suporte oferecido às estruturas de partes moles da cobertura da superfície cutânea. O tecido gorduroso da face sofre atrofia, redistribuição e, em determinadas localizações, herniação. Com o envelhecimento da pele e a perda do suporte dos tecidos de partes moles da face, aumentam as rugas e sulcos. Tabagismo

e irradiação solar contribuem para a perda da elasticidade da pele e aceleram o processo de formação das rugas. A orientação e a profundidade destes sulcos e rugas são influenciadas pela atividade muscular. Tanto as alterações de estruturas fixas como as que ocorrem lentamente na superfície cutânea levam às alterações estruturais verificadas no processo de envelhecimento da face². Estas características, que rápida e visivelmente alteram a aparência durante as expressões faciais, denotam algumas particularidades do indivíduo, como saúde, emoção e idade³.

A face é o foco da comunicação humana e também o centro da interação social, percepção e atratividade. As expressões faciais na espécie humana evoluíram para uma forma de comunicação não verbal e também de modulação da comunicação verbal. Entretanto, com o processo de envelhecimento, algumas rugas faciais gradualmente, perdem seu caráter dinâmico, que comunica emoções, e se tornam rugas estáticas, passando a integrar a face em repouso. Para alguns indivíduos, essas rugas que passam a ser estáticas podem alterar negativamente a comunicação, a atratividade e potencialmente a auto-estima³.

Com relação à etiologia, a contração dos músculos da face, além de proporcionar as expressões faciais, leva à formação de rugas perpendiculares à direção de contração do músculo. Quando a ruga facial se forma somente quando há contração muscular, esta é chamada ruga dinâmica. O aparecimento frequente das rugas dinâmicas pode levar à formação de rugas que aparecem mesmo sem a ação muscular, ou seja, surgem as rugas estáticas. Rugas estáticas e rugas dinâmicas indesejadas

que ocorrem mais freqüente ou intensamente que o necessário para a expressão facial são chamadas de rugas faciais hiperfuncionais. Estas rugas freqüentemente transmitem emoções equivocadas e indesejadas, aumentando a percepção de idade.

Rugas hiperfuncionais são comuns nas regiões frontal, glabella, ao redor dos olhos e na boca. Na região frontal, as rugas horizontais são causadas pela contração do músculo frontal. A contração do músculo frontal eleva estruturas como sobrancelhas e pálpebras, e sua ação pode ser um sinalizador de emoção, de surpresa ou de interesse. Rugas hiperfuncionais frontais podem dar a impressão de envelhecimento. No movimento de medializar as sobrancelhas, a contração dos músculos corrugadores e orbiculares dos olhos causam a formação de rugas verticais na região glabellar. Rugas horizontais na base superior da pirâmide nasal são causadas pela contração do músculo prócer e dos depressores dos supercílios. A presença destas rugas hipercinéticas na região glabellar pode dar a impressão de insatisfação ou agressividade⁴.

Para os pacientes em que as rugas hiperfuncionais interferem na acurácia da transmissão das informações de emoção, o tratamento para a suavização das rugas pode estar indicado. Além de suavizar as rugas de expressão, estes pacientes também podem ser tratados para obter aparência mais jovem, melhorando sua aceitação social e auto-estima. A auto-estima é um importante componente da interação social, e indivíduos que se sentem bem com sua aparência apresentam atitudes mais positivas no contato com outras pessoas.

São disponíveis alguns tratamentos para a suavização das rugas de expressão. Dependendo da localização e da profundidade das rugas, podem estar indicados a dermoabrasão, a ablação a laser, tratamentos a laser não ablativos, preenchimentos, cirurgia e aplicações de toxina botulínica tipo A. Estes tratamentos podem ser utilizados individualizadamente ou em combinação, para criar uma aparência mais atraente e jovem. A efetividade do tratamento depende do diagnóstico correto do problema, assim como discussão franca com o paciente no que diz respeito a expectativas, período pós-tratamento e duração de efeitos⁴.

Através de tratamentos como o cirúrgico, que inclui o rejuvenescimento facial, e o não cirúrgico, como as aplicações de toxina botulínica tipo A, as manifestações exteriores de envelhecimento tornam-se menos aparentes. Após o tratamento, pacientes freqüentemente reportam melhora do humor e diminuição do nível de estresse. Os mecanismos envolvidos neste tipo de resposta ainda não são claros, mas podem estar relacionados à mudança na interação social devido à alteração da aparência, ou interrupção da tensão causada pela hiperatividade muscular. A diminuição da tensão muscular é o mecanismo pelo qual há redução da dor, com melhora das cefaléias tratadas com aplicações de toxina botulínica do tipo A⁵.

O tratamento das rugas de expressão facial com toxina botulínica do tipo A vem se tornando cada vez mais freqüente em nosso meio. A evolução da qualidade das toxinas, a segurança do tratamento com baixos índices de complicação e a motivação financeira são os fatores que levam ao uso cada vez mais freqüente e indiscriminado desta droga⁶. Como consequência

deste fato, há a necessidade de se avaliar o que ocorre com a face, tanto estática como dinamicamente, após aplicações seriadas de toxina botulínica, assim como avaliar dados, como idade no início das aplicações, intervalos entre alas e evolução das doses utilizadas.

Poucos estudos foram conduzidos até o momento no sentido de determinar a eficácia e a segurança a longo prazo das aplicações seriadas de toxina botulínica na face. Carruthers e Carruthers⁷, em estudo retrospectivo de cinquenta pacientes submetidos, em média, a 19 aplicações de toxina botulínica com finalidade estética, demonstraram que a toxina botulínica do tipo A apresenta excelente perfil de segurança e tolerabilidade em múltiplos tratamentos a longo prazo.

Danrose et al.⁸ observaram 102 pacientes, acompanhados por no mínimo 2 anos e tratados de disfonia espasmódica com aplicações seriadas de toxina botulínica tipo A em músculos da laringe, que apresentaram resposta positiva ao tratamento.

No tratamento das rugas de expressão das regiões frontal e glabellar, discute-se se é necessária a alteração das doses em aplicações repetidas para a obtenção do mesmo efeito, se ocorre atrofia muscular ou outras alterações clínicas ou se os intervalos entre as aplicações devem ser mantidos ou alterados.

A falta de estudos que demonstrem os efeitos a longo prazo da toxina botulínica torna o assunto de interesse para orientar médicos que atuam nesta área da medicina, assim como salvaguardar a saúde e integridade dos pacientes que são submetidos a estes tratamentos.

O objetivo do presente estudo foi avaliar retrospectivamente as rugas das regiões frontal e glabellar da face em pacientes submetidos a aplicações seriadas de toxina botulínica do tipo A com finalidade estética, analisando os intervalos entre as aplicações e as doses utilizadas, e apresentar uma revisão da literatura sobre o tema.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO DA UTILIZAÇÃO MÉDICA DA TOXINA BOTULÍNICA

Em 1817, Justinus Kerner descreveu pela primeira vez o quadro clínico do botulismo. A doença foi assim denominada por estar associada à ingestão de salsicha (do latim, *botulus* = salsicha)⁹. O agente etiológico de tal patologia foi identificado somente no ano de 1896, por Emile Pierre Van Ermengem, na cidade de Ellenselles, Bélgica, e denominado *Bacillus botulinus*¹⁰. Kempner, em 1897, subsequentemente demonstrou que a cultura de Van Ermengem produzia uma substância que, se injetada na forma inativa, induzia à síntese de uma anti-toxina no sangue de cabras. Esta foi a primeira evidência de que uma anti-toxina poderia neutralizar a toxina botulínica, prevenindo então a toxicidade, o botulismo ou até mesmo a morte¹¹. Em 1922, o bacilo recebe nova denominação, passando a chamar-se *Clostridium botulinum*, pois *bacillus* era termo utilizado para identificar organismos aeróbios, e *clostridium*, além de indicar a natureza anaeróbia, refletia também sua morfologia (*Kloster*, do grego = fio torcido)¹². Nesta mesma década, um grupo chefiado pelo Dr. Hermann Sommer, da Universidade da Califórnia, isolou a forma não purificada da toxina botulínica do tipo A, sendo que a forma purificada, cristalina desta toxina foi isolada em Maryland pelo Dr. Carl Lamanna em 1946¹³. Em 1949, Burgen et al.

comprovam que o mecanismo de ação da toxina botulínica deve-se ao bloqueio do impulso nervoso na junção neuromuscular, mediante inibição da liberação de acetilcolina¹⁴.

A toxina botulínica produzida pelo *Clostridium botulinum* em condições anaeróbias é uma proteína de elevado peso molecular, 900.000 daltons, formada por unidades tóxicas de 150.000 daltons ligadas de forma não covalente a proteínas não tóxicas que servem de proteção às unidades tóxicas contra a ação de enzimas digestivas. Esta proteção da toxina por proteínas não tóxicas a torna uma substância muito perigosa, que por outro lado permite sua conservação para possível uso médico^{15,16}.

A utilização da toxina botulínica em medicina para o tratamento de patologias aconteceu devido a uma seqüência de eventos que levaram à realização do trabalho de Alan B. Scoth, oftalmologista do Smith-Kettlewell Eye Research Institute em São Francisco, Califórnia, que estava em busca de uma substância que pudesse ser injetada em músculos hiperativos que ocasionavam o desalinhamento ocular no caso do estrabismo. A intenção era reduzir a atividade muscular através de denervação química, podendo substituir então a cirurgia convencional que era executada pela ressecção parcial do músculo hiperativo¹⁷.

Anteriormente à utilização da toxina botulínica em seres humanos, vários estudos foram conduzidos para a obtenção da toxina do tipo A purificada. Para evitar reações indesejadas em seres humanos, foi necessário purificar a toxina, eliminando-se o ácido ribonucléico e outros materiais contaminantes. O desenvolvimento da cepa, condições de cultura e

purificação foram modificados o necessário para a obtenção da qualidade da toxina para uso médico. A toxina botulínica de uso médico consiste naquela produzida em meio de cultura específico utilizando-se cepa específica de *C. botulinum*. São isolados cristais brancos, com formato de agulha, com toxicidade de 3 a $3,5 \times 10^7$ DL₅₀ em ratos (U) por miligrama. A qualidade da toxina foi consistente, independente da partida da cepa utilizada, podendo ser quantificada somente pelo método da morte em ratos ou mensurando-se o bloqueio da liberação de acetilcolina na terminação neuro-muscular¹⁵.

Nas décadas de 70 e 80, vários estudos sobre a utilização da toxina botulínica tipo A para o tratamento do estrabismo e outras distonias foram conduzidos¹⁸.

Após 20 anos de estudos, em dezembro de 1989, o FDA liberou, nos Estados Unidos, a utilização da toxina botulínica do tipo A como droga para o tratamento do estrabismo, do blefaroespaemo e do espasmo hemifacial. Neste período, desde 1985 à presente data, surgiram muitas outras indicações para o uso da toxina botulínica, incluindo o uso com finalidade estética. Em 1991, algumas partidas de cepas do *C. botulinum* e muita informação chegaram ao conhecimento da indústria farmacêutica, e a partir de então a toxina passou a ser de uso comum¹³.

O uso da toxina botulínica com finalidade estética se iniciou na década de 90, quando Carruthers e Carruthers (1990)¹⁹ verificaram a diminuição das rugas da glabella de pacientes tratados para blefaroespasma e apresentaram sua experiência com a utilização da toxina botulínica para o tratamento coadjuvante das rugas glabellares, no "Meeting" da Sociedade Americana de Cirurgia Dermatológica realizado no Havaí e publicado a

seguir²⁰. Borodic, Cheney, e McKenna (1992)²¹, relataram concomitante diminuição das rugas faciais unilaterais em pacientes que eram tratados de espasmo hemi-facial com toxina botulínica tipo A. Com estes achados iniciais e subseqüentes estudos clínicos iniciou-se o uso da toxina botulínica tipo A como um método efetivo e seguro para o tratamento das rugas faciais devido à hipercinese da musculatura facial^{21,22,23}.

2.2 FARMACOLOGIA DA TOXINA BOTULÍNICA

Quando utilizada adequadamente, a toxina botulínica é uma droga única com várias propriedades farmacêuticas. A primeira propriedade se deve ao seu específico mecanismo de ação, inibindo a liberação de acetilcolina em neurônios motores periféricos. Isso indiretamente diminui a atividade excessiva de músculos involuntários pelo bloqueio da liberação de acetilcolina nos neurônios motores.

A segunda propriedade da toxina botulínica se deve à sua elevada toxicidade, que requer somente quantidades em nanograma para se obter o bloqueio desejado das contrações dos músculos involuntários. Devido à sua especificidade de ação e atividade em doses mínimas, os efeitos colaterais da toxina botulínica tipo A são raros, apresentando ampla margem de segurança.

A terceira propriedade da toxina botulínica tipo A é a prolongada durabilidade de seu efeito, permitindo que aplicações sejam repetidas a cada dois a seis meses, dependendo da indicação²⁴.

2.2.1 TRANSMISSÃO NEUROMUSCULAR

A toxina botulínica proporcionou contribuição valiosa para a compreensão do mecanismo de transporte das vesículas de acetilcolina e sua liberação, assim como dos mecanismos de endocitose e de liberação de hormônios e enzimas²⁵.

A microscopia eletrônica nos mostra que na terminação nervosa pré-sináptica existem pequenas vesículas claras, as vesículas sinápticas de acetilcolina. A membrana muscular pós-sináptica, também visualizada, tem formato irregular em proeminências e vales. Nestas proeminências são visualizadas estruturas de alta densidade, que são os receptores de acetilcolina²⁶.

A neuro transmissão colinérgica é dividida em seis etapas, quais sejam, a síntese, estocagem, liberação, ligação, degradação e reciclagem da acetilcolina^{27,28}. A colina é inicialmente transportada do espaço extracelular para o citoplasma do neurônio colinérgico por um sistema de carreadores dependente de sódio (Na^+), quando é transformada em acetilcolina por reação enzimática mediada pela colina acetil-transferase e acetil CoA, sendo armazenada em vesículas ou grânulos sinápticos. Nas chamadas zonas de atividade são encontrados os canais de cálcio, proteínas de fundamental importância no processo de neuro transmissão, sendo ativados por voltagem²⁶. Quando um potencial de ação chega à terminação nervosa, os canais de cálcio da membrana pré-sináptica se abrem, ocasionando aumento da concentração de cálcio intracelular. Neste momento, as vesículas de acetilcolina se transformam em um estágio intermediário, dependente de ATP, denominado “priming”, podendo então sofrer neuro-

exocitose regulada pelo cálcio²⁹. A elevação dos níveis plasmáticos de cálcio ocasiona a fusão das vesículas sinápticas com a membrana celular por mecanismo complexo mediado por ligações protéicas, liberando assim a acetilcolina na placa neuro-muscular. A acetilcolina liberada se liga a receptores nicotínicos pós-sinápticos na fibra muscular, ocasionando a contração muscular. A acetilcolina na placa motora é rapidamente clivada em colina e acetato pela ação da acetilcolinesterase, sendo a colina reciclada por sistema de transporte de alta afinidade que transporta a molécula de volta ao citoplasma do neurônio.

2.2.2 ESTRUTURA MOLECULAR DA TOXINA BOTULÍNICA

As neurotoxinas produzidas pelo *Clostridium botulinum*, bacilo anaeróbico, gram-positivo, são as mais potentes toxinas à raça humana, causadoras da doença chamada de Botulismo³⁰. O sistema nervoso humano é suscetível a cinco sorotipos da toxina (A, B, E, F e G), não sendo afetado por três deles (C1, C2 e D)³¹.

São descritos 8 subtipos de toxina botulínica, todos Zn^{2+} dependentes, A, B, C1, C2, D, E, F e G, dos quais o subtipo A é o mais utilizado na prática clínica³². Os subtipos possuem similaridade funcional, estrutural e suas seqüências de aminoácidos demonstram elevado grau de homologia. Quanto às diferenças entre os subtipos, relacionam-se ao sítio de atuação, a potência e duração do efeito. A toxina do subtipo A é a mais potente, de efeito mais prolongado e mais facilmente obtida em cultura, sendo a primeira a ser isolada na forma cristalina, estável e altamente purificada.

As neurotoxinas botulínicas são produzidas como polipeptídeos inativos de 150 kd, que são clivados por uma protease bacteriana semelhante à tripsina, originando assim a forma ativa de dupla cadeia da toxina. A proporção de toxina de cadeia única em relação à de cadeia dupla originada, depende do sorotipo da toxina e da produção adequada de protease pela cepa bacteriana³³. A cadeia pesada de 100 kd e a leve de 50 kd são unidas por pontes dissulfeto e por forças não-covalentes. As pontes dissulfeto são sensíveis ao calor, o que causa a inativação da toxina^{34,35}. Associado a esta estrutura, em soluções para uso clínico existe um complexo protéico perfazendo estrutura com peso molecular de 900 kd. Estas proteínas associadas são proteínas hemaglutinínicas e não hemaglutinínicas que teriam a função de estabilizar a neurotoxina, assim como de limitar sua difusão no sítio de aplicação (Figura 1).

Imagem cedida pela Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda.

Figura 1: Estrutura bioquímica da molécula da toxina botulínica tipo A.

Através do seqüenciamento de genes, verifica-se que todas as toxinas conservam uma seqüência de aminoácidos na cadeia leve, codificando um padrão de ligação zinco dependente. As cadeias leves são, portanto, proteases zinco dependentes que inativam sua SNARE (receptor protéico de ligação) correspondente. A estrutura tridimensional da toxina botulínica do tipo A revela domínios funcionais separados^{36,37}. O terminal C da toxina contribui para sua ligação a receptores distintos, que são localizados em terminações nervosas periféricas de nervos colinérgicos. Esta é a base da especificidade colinérgica periférica da toxina botulínica³⁸.

O melhor método quantitativo para a dosagem da toxina botulínica em cultura, fluidos ou amostras alimentares consiste no ensaio biológico com ratos ("mouse biologic assay"). Este ensaio também possibilita a pesquisa e o desenvolvimento de anti-toxinas. Este é o método mais sensível e específico para a mensuração da atividade da toxina botulínica³⁹.

A técnica laboratorial padronizada denominada de ELISA ("enzyme-linked immunodiffusion assay") é a única que tem potencial para substituir os métodos de ensaio biológicos em relação à toxina botulínica. O teste de ELISA, como é chamado, utilizando anticorpos policlonais é altamente específico, razoavelmente rápido, e pode ser utilizado em larga escala. A sensibilidade do teste de ELISA pode ser melhorada com algumas alterações de ciclo e amplificação de sistemas. A maior desvantagem do teste de ELISA é que o mesmo não diferencia a toxina ativa da inativa⁴⁰. Um teste específico baseado na endopeptidase da toxina está sendo investigado, sendo que, diferentemente do ELISA, este mensura a atividade biológica da toxina⁴¹.

A toxina botulínica tipo A, atualmente disponível no BOTOX[®], derivada de cepa preparada pela Allergan, em 1997, substituiu a cepa original preparada por Schantz em 1979⁴². Esta toxina é uma forma estéril, liofilizada, purificada, mantida seca e a vácuo da toxina botulínica do tipo A, produzida por cultura da cepa Hall do *Clostridium botulinum*. A toxina é isolada da solução de cultura através de uma série de precipitações ácidas, obtendo-se um complexo cristalino com elevado peso molecular associado a proteínas hemaglutinínicas. O complexo cristalino é então dissolvido em solução salina contendo albumina para estabilização, filtrada sob técnica estéril antes de armazenada a vácuo. Na preparação de Schantz e Kautter⁴³, 1 U do complexo cristalino apresenta peso de aproximadamente 0,043 ng. O montante de toxina botulínica do tipo A purificada desta amostra, determinado cromatograficamente, é de aproximadamente 0,006 ng. A nova cepa apresenta somente 20% do conteúdo protéico da cepa original⁴⁴.

2.2.3 MECANISMO DO BLOQUEIO NEUROMUSCULAR

Devido aos bons resultados dos tratamentos com a toxina botulínica tipo A, verificou-se aumento no interesse e desenvolvimento de pesquisas em relação ao seu mecanismo de ação⁴⁵.

Tanto no sistema nervoso central como no periférico, a plasticidade neuronal representa fator importante no processo de recuperação após

lesão e em aprendizado e memória. No entanto, os mecanismos neuronais intrínsecos determinantes para a regulação deste fundamental processo ainda são pouco conhecidos⁴⁶.

Pesquisas envolvendo toxina botulínica foram importantes para a identificação da função de três alvos protéicos necessários à neuro transmissão localizados na membrana neural pré-sináptica: a proteína sinaptossomal de peso molecular de 25 kd (SNAP-25), a proteína de membrana associada a vesícula (VAMP), mais conhecida como sinaptobrevina, e a syntaxina. A sinaptobrevina se liga à membrana das vesículas sinápticas pela sua terminação C. Juntas, estas proteínas formam um complexo protéico com quatro bandas e dois domínios ativos, um através da SNAP-25 e outro por uma das demais proteínas. Um fator descrito como fator sensível à N-etilmaleimida (NSF) liga-se avidamente a este complexo pré formado, transformando a receptor SNAP em SNARE. O complexo SNARE desempenha papel essencial no mecanismo de exocitose, trazendo a vesícula sináptica para posição próxima à membrana plasmática do neurônio. A dissociação do complexo SNARE em SNAP e NSF é necessária à continuidade do processo de neuro transmissão, e ocorre pela ação de uma enzima ATPase²⁹.

A toxina botulínica, através da clivagem do complexo SNARE, apresenta efeito único, impede a liberação de acetilcolina em nervos periféricos quando aplicada extracelularmente e bloqueia a exocitose de todos os transmissores, incluindo peptídeos, quando administrada intracelularmente⁴⁷.

Todos os sorotipos da toxina botulínica agem no sistema nervoso periférico inibindo a liberação de acetilcolina do terminal pré-sináptico da junção neuromuscular⁴⁸.

A neuro-toxicidade da toxina botulínica do tipo A ocorre em três etapas: ligação, internalização e bloqueio neuro-muscular⁴⁹.

A primeira etapa descrita é a de ligação. Nesta etapa, a toxina botulínica, através de sua cadeia pesada (100 kd), liga-se à terminação nervosa pré-sináptica. O sítio de ligação não está bem esclarecido. Estudos preliminares sugeriram a existência de receptores distintos para cada sorotipo da toxina botulínica⁵⁰; já estudos posteriores indicam o isolamento de uma proteína que seria o sítio de ligação das toxinas de sorotipo A, B e E, a sinaptotagmina⁵¹ (Figura 2).

Imagem cedida pela Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda.

Figura 2: Mecanismo de ação da toxina botulínica tipo A, etapa de ligação.

A segunda etapa é a de internalização. Nesta etapa ocorre a internalização da neurotoxina por mecanismo de endocitose mediada por receptor⁵², processo independente de cálcio e parcialmente dependente da estimulação nervosa^{53,54}. A ponte dissulfeto que une as cadeias leve e pesada da toxina botulínica tipo A é essencial no mecanismo da internalização, e as duas hélices longas e paralelas na porção N-terminal da cadeia pesada fazem a mediação do processo de translocação através da membrana, para que a metade tóxica, a cadeia leve, adentre o citoplasma neural onde vai agir⁵⁵ (Figura 3).

Imagem cedida pela Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda.

Figura 3: Mecanismo de ação da toxina botulínica tipo A, etapa de internalização.

A terceira etapa consiste no bloqueio neuro-muscular. Esta etapa ocorre pela atividade de metalo-endoprotease da cadeia leve da toxina botulínica, que promove a clivagem de proteínas específicas da terminação nervosa, impedindo assim a liberação dos grânulos de acetilcolina⁵⁶ (Figura 4).

Imagem cedida pela Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda.

Figura 4: Mecanismo de ação da toxina botulínica tipo A, etapa de bloqueio.

Cada sorotipo da toxina botulínica tem atividade proteolítica em um sítio protéico específico (SNARE). A toxina botulínica tipo A age através da clivagem da proteína SNAP-25; a toxina botulínica tipo B age na proteína VAMP (ou sinaptobrevina); a do tipo C age clivando duas proteínas, a SNAP-25 e a syntaxina; a do tipo D quebra a proteína VAMP; a do tipo E quebra a SNAP-25; e as toxinas dos tipos F e G agem na VAMP³². É interessante notarmos que tanto a toxina tipo A como a do tipo E agem através da clivagem da proteína SNAP-25 na terminação C, porém em locais diferentes. A toxina do tipo A age nos aminoácidos Gli¹⁹⁷-Arg (glicina 197 –

Arginina) e a toxina do tipo E nos aminoácidos Arg¹⁸⁰-Ile (Arginina 180 – Isoleucina), removendo 9 e 26 resíduos respectivamente, mas surpreendentemente induzindo a paralisias de durações bastante diferentes⁵⁷.

A sinaptobrevina (VAMP), com a porção principal da proteína situada no interior do citosol, serve de substrato para quatro sorotipos de toxina, B, D, F e G, mas cada um promove a clivagem em pontos diferentes do peptídeo⁵⁶.

No caso da toxina botulínica tipo C1, esta realiza a clivagem da SNARE correspondente na membrana plasmática e a syntaxina é clivada próxima à porção da membrana onde a toxina botulínica tipo A remove 9 resíduos da SNAP-25, uma pequena diferença que explica sua sofisticada ação. A toxina botulínica tipo E tem sua ação pela clivagem de 26 aminoácidos da terminação C da SNAP-25⁵⁸.

De acordo com estudos recentes, as toxinas botulínicas dos tipos A e E, quando bloqueiam em torno de 90% da contração muscular induzida por impulso nervoso, promovem a clivagem de apenas pequena parcela (7% a 12%) da SNAP-25, que está localizada em zonas motoras importantes na junção neuro muscular. Estas zonas de receptores de alta afinidade pela toxina e os processos de endo e exocitose ocorrem em locais não mielinizados da membrana pré sináptica dos neurônios motores⁵⁰. Deve ser notado ainda que a limitada proteólise da SNAP-25 observada corresponde a uma estimativa aumentada por limitações do modelo experimental adotado no estudo referendado. Em suporte a este achado, Jurasinski et al. (2001)⁵⁹ reportaram a clivagem limitada da SNAP-25 pela toxina botulínica do tipo A em músculos de ratos, “in vivo”.

A alta especificidade da toxina botulínica tipo A pela terminação nervosa leva à hipótese de que a toxina entra na mesma em região próxima à zona ativa, onde age clivando uma sub-população de SNAP-25. O restante da SNAP-25, situada ao redor do nervo, persiste intacta e, apesar de o mecanismo de exocitose continuar bloqueado, o carreamento de proteínas através da membrana se dá normalmente, impedindo assim a degeneração neuronal. Sendo assim, mesmo com o prolongado período de bloqueio da transmissão nervosa devido à ação da toxina botulínica do tipo A, não se verifica atrofia da terminação nervosa⁵⁸.

A toxina botulínica do tipo A tem seu pico de ação 5 a 7 dias após a injeção⁶⁰. Dependendo da indicação, seus efeitos benéficos podem perdurar por um período de 3 a 6 meses, sendo este diretamente relacionado com a dose utilizada.

Se o bloqueio neuromuscular provocado pela aplicação da toxina botulínica tipo A tiver duração mínima de 3 a 5 dias, a transmissão neuromuscular se transforma do estado maduro e estável para a transmissão por sinapses extra juncionais⁴⁶. Estas sinapses são devidas ao surgimento de brotamentos que provêm da terminação nervosa de origem e surgem em todas as direções, atingindo extensão de até 150 microns 42 dias após a aplicação. Estes brotamentos causados pela paralisia resultante da ação da toxina do tipo A, através de suas novas sinapses, são responsáveis pelo início das transmissões sinápticas no processo de recuperação muscular após a paralisia⁶¹ (Figura 5).

Imagem cedida pela Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda.

Figura 5: Mecanismo de ação da toxina botulínica tipo A, etapa de formação dos brotamentos.

Após 24 horas da injeção intramuscular da toxina botulínica do tipo E, verifica-se bloqueio completo da neuro transmissão, atividade similar a terminações nervosas não estimuladas. Após 48 horas, verifica-se total recuperação da atividade de endocitose e exocitose da terminação nervosa e a formação de brotamentos não é verificada⁴⁶.

A duração do efeito da toxina botulínica do tipo B é muito menor que a do tipo A, o que se deve ao seu mecanismo de ação. Quando a toxina botulínica do tipo B promove a clivagem da porção maior da sinaptobrevina que está voltada para o citoplasma do neurônio na vesícula sináptica, se

forma um complexo instável e o mesmo é substituído por um SNARE íntegro. Portanto, a duração da paralisia causada pela toxina do tipo B é determinada pela sua meia vida. É o que demonstram culturas de neurônios do sistema nervoso central⁶².

Quando utilizada a toxina botulínica do tipo F, verifica-se bloqueio da atividade de neuro transmissão 24 a 48 horas após a aplicação, mas ao contrário do que ocorre com a toxina botulínica do tipo E, são observados pequenos brotamentos em torno de 7 dias após, que logo envolvem pelo reinício da atividade de neuro transmissão da junção neuro muscular original. O efeito desta toxina tem seu máximo de ação em torno de 14 dias e término em 28 dias após a aplicação, quando a atividade de endo e exocitose está retomada e os brotamentos regrediram. Esta é a seqüência de eventos que ocorre com a paralisia devido à aplicação da toxina botulínica do tipo A, em menor escala⁶¹.

Coletivamente, em todos os tipos de toxina, estes achados sugerem a relação inversamente proporcional entre a atividade de endo e exocitose da terminação nervosa original e a dinâmica de remodelamento da junção neuro muscular. A perda de atividade nesta junção por um período de 3 dias parece ser o pré-requisito para a indução ao surgimento de brotamento, enquanto a regressão dos mesmos requer o retorno da função de transmissão na placa neuro motora original⁶¹. Estes brotamentos recém formados contêm proteínas essenciais à neuro transmissão, como sinaptotagmina II, sinaptofisina, canais de cálcio e de sódio e potássio sensíveis à voltagem, necessários para a condução do potencial de ação. O ciclo de renovação das vesículas de acetilcolina também foi observado nestas novas terminações⁶¹.

Estudos iniciais chegaram a sugerir que o tempo de duração destes brotamentos depende da atividade muscular, já que a estimulação elétrica direta e crônica em músculo injetado com toxina botulínica tipo A diminui de forma significativa os brotamentos⁶³. Estudos de imagem conduzidos “in vivo”, analisando-se a atividade de endo e exocitose utilizando-se marcador fluorescente em meio lipídico (“FM1-43 steryl dye”), revelou que o nível de atividade sináptica nos novos brotamentos é inferior ao observado em terminações neuro musculares originais não tratadas com toxina botulínica. Baseado nestes achados, foi proposto que a retomada da atividade transmissora pela terminação neuro muscular original após tratamento com toxina botulínica tipo A leva à inativação e eliminação da plasticidade sináptica⁴⁶ (Figura 6).

Imagem cedida pela Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda.

Figura 6: Mecanismo de ação da toxina botulínica tipo A, retomada da transmissão neuro muscular.

As terminações nervosas originais permanecem sem atividade de endo ou exocitose detectáveis até aproximadamente 2 meses após a injeção de toxina botulínica do tipo A, período que é considerado muito maior que o tempo de meia vida da SNAP-25, ao menos quando o mesmo é mensurado no trato óptico e em culturas de células PC12⁶¹. Algumas das hipóteses sugeridas na tentativa de se explicar este achado foram a toxina botulínica tipo A, que em sua forma ativa, permaneceria em compartimentos isolados na terminação nervosa original, que realizaria a clivagem de qualquer nova SNAP-25 sintetizada. Outras hipóteses seriam de que a SNAP-25 clivada permaneceria na terminação nervosa, ou então, de que a proteólise da SNAP-25, devido à ação da toxina botulínica tipo A, induziria a uma cascata de eventos que culminariam no comprometimento da fisiologia normal da terminação nervosa original, que somente poderia ser tratada através do processo de remodelação neuronal a longo prazo. Futuros estudos podem incluir anticorpos capazes de inibir novas SNAP-25, o que ajudaria a se estabelecer uma base do real tempo de duração do bloqueio da liberação de acetilcolina pela toxina botulínica tipo A⁶¹.

Em estudos com seguimento mais prolongado, verificou-se que a terminação nervosa original começa a se recuperar 63 dias após a aplicação da toxina botulínica do tipo A, quando o crescimento dos brotamentos cessa. Concomitantemente, dá-se início ao processo de involução dos mesmos, que se completa em 91 dias. Nesta fase, estão recuperadas as capacidades de endo e exocitose da terminação nervosa original⁶¹.

Em estudos preliminares, devido a dificuldades técnicas não era possível evidenciar a completa eliminação dos brotamentos nervosos no processo de recuperação neuronal após aplicação de toxina botulínica tipo A. Em pacientes tratados de blefaroespasma com injeções de toxina botulínica tipo A, foram detectados brotamentos meses após a aplicação. A explicação para este fato seria de que os pacientes deste estudo teriam sido submetidos a múltiplas aplicações de toxina botulínica tipo A antes da biópsia muscular, o que resultaria em um efeito cumulativo e em um processo com padrão de remodelação nervosa muito mais complexo⁶¹. Com a utilização de padronizações rigorosas, técnicas citoquímicas clássicas, técnicas de imagens “in vivo” e extensa análise estatística, pode-se definir que, quando do retorno dos mecanismos de endo e exocitose pela terminação nervosa original, os brotamentos gradativamente perdem sua função em relação a estas mesmas atividades, com diminuição e posterior parada na captação de FM1-43, e ,vagarosamente, inicia-se o processo de involução⁶¹.

Esta denervação química promove efeito clínico com duração aproximada de três a seis meses, em pacientes tratados de distonias⁶⁴.

Diversas drogas agem na junção neuro muscular, interferindo com o efeito da toxina botulínica. Doses elevadas de antibióticos do grupo dos aminoglicosídeos, como canamicina, estreptomicina e gentamicina, podem inibir a liberação de acetilcolina na terminação nervosa, produzindo uma síndrome parecida com o botulismo. A utilização simultânea destas drogas com aplicação de toxina botulínica pode promover acentuação do efeito da

mesma⁶⁵. Este efeito se deve ao bloqueio dos canais de cálcio, e os sintomas cedem assim que haja a suspensão dos aminoglicosídeos⁶⁶.

As aminoquinolonas, como cloroquina e hidroxicloroquina, funcionam como drogas antagonistas à ação da toxina botulínica, devido à sua ação tanto na membrana celular, impedindo a ligação e internalização da toxina botulínica, como inibindo o metabolismo intracelular da mesma⁶⁷.

Existem relatos de que a ciclosporina causa bloqueio neuro muscular caracterizado por fraqueza muscular e falência respiratória. Seu mecanismo de ação ainda é desconhecido, todavia sugere-se sua ação por mecanismos de efeito imunossupressivo na musculatura ou bloqueio dos canais de cálcio⁶⁸.

A d-penicilamida pode levar à formação de anticorpos contra receptores de acetilcolina em indivíduos predispostos. Uma pequena porcentagem de pacientes portadores de artrite reumatóide que receberam d-penicilamida desenvolveram anticorpos contra receptores de acetilcolina e passaram a apresentar sintomas similares à miastenia gravis. Tanto os sintomas como os anticorpos desaparecem em alguns meses após a suspensão da droga. Os anticorpos de pacientes portadores de miastenia gravis e miastenia induzida por d-penicilamida possuem estruturas bastante semelhantes⁶⁹. Portanto, devido a estes efeitos relacionados, a d-penicilamida é uma droga que pode potencializar o efeito da toxina botulínica.

Muitas outras drogas de uso não dermatológico têm sua ação bloqueando a transmissão colinérgica entre terminações nervosas motoras e receptores nicotínicos pós-sinápticos na junção neuromuscular.

Estas drogas agem por mecanismo de competição, tanto por bloqueio antagonista (tubocurarina, pancurônio e galamina), quanto por bloqueio agonista (succinilcolina). Os bloqueadores antagonistas competem com a acetilcolina pelos sítios de ligação de seus receptores. Uma dose suficiente da droga vai bloquear os receptores de acetilcolina, impedindo assim a despolarização do músculo. O mecanismo de ação dos bloqueadores agonistas assemelha-se à ação de despolarização da acetilcolina, entretanto, a repolarização muscular após a ação da succinilcolina é mais lenta que a provocada pela acetilcolina, levando a um atraso no processo de contração muscular⁷⁰.

2.3 INDICAÇÕES E CONTRA-INDICAÇÕES DA UTILIZAÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA

Em 1978, Allan B. Scott, médico oftalmologista do Smith-Kettlewell Eye Research Fundation, em São Francisco, foi o primeiro a receber o parecer positivo do FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos a usar a toxina botulínica do tipo A (cepa Bath 79 – 11) para o tratamento do estrabismo em seres humanos¹². Em Dezembro de 1989, o FDA aprovou a utilização da toxina botulínica tipo A para o tratamento de distonias como estrabismo, blefaroespasma e espasmos focais incluindo espasmo hemifacial¹². No dia 15 de abril de 2002, o FDA aprovou a utilização da toxina botulínica do tipo A para a amenização de rugas moderadas a severas da região glabellar⁷¹.

No Brasil, a toxina botulínica tipo A* obteve sua primeira aprovação pelo Ministério da Saúde em 04 de Setembro de 1992, para o tratamento do blefaroespasma, da distonia e do estrabismo. Em 21 de Agosto de 2000, obteve sua segunda aprovação, para o tratamento de linhas faciais hiperkinéticas, espasticidade muscular e hiperidrose palmar e plantar.

Como se pode observar, a toxina botulínica do tipo A tem sido indicada para o tratamento de um grande número de patologias do movimento, como o blefaroespasma essencial benigno, estrabismo, discinesia facial associada à Síndrome de Meige, torcicolo espasmódico, torcicolo esporádico do adulto, distonias ocupacionais da mão e disfonia espasmódica⁷².

Outras indicações para a utilização da toxina botulínica são para a amenização das rugas de expressão das regiões frontal, glabellar e peri-orbitária, nasal⁷³, malar, peri-oral, mentoniana⁷⁴ e cervical⁷⁵. A toxina botulínica está indicada também para o tratamento da hipertrofia do músculo orbicular dos olhos pré-tarsal, cefaléia tensional, paralisia facial^{76,77}, bandas platismais^{74,78}, para a amenização das rugas de colo⁷⁹, tratamento da hiperidrose^{80,81} e hipertrofia do masseter⁸².

As contra indicações quanto à utilização da toxina botulínica podem ser divididas em absolutas e relativas. Dentre as contra indicações absolutas, pode-se citar pacientes portadores de patologias que alterem a transmissão neuro muscular, como na síndrome de Eaton-Lambert e na miastenia gravis. Na síndrome de Eaton-Lambert, anticorpos contra antígeno tumoral apresentam reação cruzada com canais de cálcio voltagem

* BOTOX[®](Allergan Inc., Irvine, Ca. – USA)

dependentes envolvidos na liberação de acetilcolina, levando a um distúrbio na neuro transmissão⁸³. Já na miastenia gravis, o sintoma de fraqueza é causado por degradação de receptores de acetilcolina mediada por anticorpos⁸³. Outras contra indicações absolutas são hipersensibilidade aos componentes da formulação, uso de antibióticos do grupo dos aminoglicosídeos ou espectinomicina por um período de três dias anterior ou posterior ao tratamento, infecção nos sítios de aplicação e pacientes gestantes ou em fase de amamentação⁸⁴.

As contra indicações relativas para a utilização da toxina botulínica são patologias da coagulação sanguínea ou uso de anticoagulantes, falsas expectativas quanto aos resultados do tratamento e paciente não cooperativo⁸⁴.

2.4 REVISÃO DA ANATOMIA DA MUSCULATURA DAS REGIÕES FRONTAL E GLABELAR

A musculatura facial, em sua ação, deve ser estudada em conjunto e ter como resultantes a harmonia e o equilíbrio. A ação individual de cada músculo está intimamente associada à anatomia do mesmo, porque mecanicamente a ação é o resultado direto das inserções de suas duas extremidades⁸⁵.

Praticamente todo músculo, quando age, é acompanhado por outro músculo que tem ação oposta. Um músculo deste par é o antagonista do outro. A execução da maioria dos movimentos requer a ação combinada de numerosos músculos. Aqueles que agem diretamente para efetuar o

movimento desejado são denominados protagonistas. Os que agem para manter a região do corpo em uma posição adequada são denominados músculos fixadores. Acontece freqüentemente que os protagonistas têm outras ações além daquela desejada, e neste caso os antagonistas da ação não desejada exercem sua função; são os músculos sinérgicos. Em algumas circunstâncias, quando uma ação é executada com força extrema, músculos que não são solicitados para uma ação moderada vêm em auxílio dos músculos protagonistas, são conhecidos como músculos de emergência⁸⁵.

O tamanho e a orientação das fibras musculares variam de acordo com as diferentes regiões anatômicas e com o sexo. As rugas de expressão são perpendiculares à resultante dos vetores de força muscular de determinado músculo estudado. Todos os músculos superficiais da face são parte do sistema músculo aponuerótico superficial⁸⁶.

Os músculos da face ou da expressão são músculos cutâneos que se localizam nas camadas da fáscia subcutânea. Em geral, originam-se ou da fáscia ou dos ossos da face e se inserem na pele. Cada músculo raramente permanece separado e distinto por todo o seu comprimento, devido a uma tendência de se fundir com seus vizinhos nas suas terminações ou inserções^{85,87}.

Os músculos de maior interesse para o tratamento com toxina botulínica e que serão revisados no presente estudo são o ventre frontal do músculo occipitofrontal e os músculos da região glabellar, como os corrugadores do supercílio, o prócero e o depressor do supercílio.

O epicrânio é uma vasta lâmina musculotendinosa que reveste o vértice e as faces laterais do crânio, desde o osso occipital até a sobrancelha. Consiste de delgados e amplos ventres musculares reunidos por uma extensa aponeurose intermediária, a gálea aponeurótica. Os ventres musculares do epicrânio são o ventre occipital e o ventre frontal⁸⁵, que serão revisados no presente estudo. O ventre frontal, de forma quadrilátera, é mais amplo que o ventre occipital e seus fascículos são mais longos, mais finos e de cor mais pálida. Não possui inserções ósseas. Suas fibras mediais são contínuas com as do prócero, e as fibras intermediárias se fundem com as do corrugador e do orbicular do olho. Suas fibras laterais também se fundem com o último músculo, sobre o processo zigomático do osso frontal. As fibras se dirigem para cima e atingem a gálea aponeurótica abaixo da sutura coronal. As margens mediais dos músculos dos dois lados se reúnem por certa distância acima da raiz do nariz⁸⁵.

Os ventres occipital e frontal do occipitofrontal, atuando conjuntamente, tracionam para trás o couro cabeludo, elevando as sobrancelhas e enrugando a fronte, como uma expressão de surpresa. Os ventres frontais, agindo isoladamente, elevam as sobrancelhas, de um ou de ambos os lados. A inervação dos ventres frontais é realizada pelos ramos temporais do nervo facial⁸⁵.

O músculo corrugador do supercílio é um músculo piramidal, pequeno e estreito, situado na extremidade medial da sobrancelha, abaixo do frontal e do orbicular do olho. Origina-se da extremidade medial do arco superciliar, e suas fibras se dirigem para cima e lateralmente, entre as porções palpebral e

orbital do orbicular do olho, e se inserem na superfície profunda da pele, acima da parte média do arco orbital. O depressor do supercílio é a denominação dada à parte do músculo que traciona para baixo as sobrancelhas. O corrugador traciona a sobrancelha para baixo e medialmente, produzindo as rugas verticais da fronte. É o músculo da “carranca”, e pode ser considerado o principal músculo do sofrimento. É innervado pelos ramos temporal e zigomático do nervo facial⁸⁵.

O músculo prócero é um pequeno fascículo piramidal, originando-se por fibras tendinosas da fascia que reveste a parte mais inferior do osso nasal e a parte superior da cartilagem nasal lateral. Insere-se na pele da parte mais inferior da fronte entre as duas sobrancelhas, e suas fibras se cruzam com as do frontal. O prócero tem como ação tracionar para baixo o ângulo medial da sobrancelha e produz as rugas transversais sobre a raiz do nariz. Sua innervação se dá através dos ramos bucais do nervo facial⁸⁵.

O músculo depressor do supercílio se origina no processo nasal do osso frontal e se insere profundamente na pele, na porção medial da sobrancelha. Este músculo auxilia não só o movimento de abaixamento das sobrancelhas, mas também a compressão do saco lacrimal e o fechamento das pálpebras¹².

A porção médio orbitária do músculo orbicular dos olhos também participa do movimento de medialização e abaixamento das sobrancelhas. A porção orbitária do músculo orbicular do olho se origina de estruturas ósseas na órbita medial, e lateral do nariz, incluindo o ligamento cantal medial. Suas fibras situam-se superior e inferiormente, formando um anel ao redor da órbita, estendendo-se até a rima orbitária¹².

2.5 DOSES DE TOXINA BOTULÍNICA UTILIZADAS PARA O TRATAMENTO DE RUGAS DAS REGIÕES FRONTAL E GLABELAR

A unidade de medida utilizada para dosar a toxina botulínica para uso clínico é a unidade (U). Uma unidade é definida como sendo a mediana da dose aplicada intra-peritonealmente que leva a morte de 50% (DL₅₀) da partida de camundongos fêmeas, do tipo Swiss-Webster, pesando de 18 a 20 gramas, em um período de 3 a 4 dias⁸⁸. O método original de determinação da DL₅₀ da toxina botulínica foi realizado em macacos, o que pareceu ser menos confiável que os estudos em camundongos¹⁸ devido ao fato de os primatas não oferecerem dados confiáveis em relação à caracterização da potência da toxina para uso clínico, dependente da dose e do volume utilizados, assim como do músculo a ser tratado para utilização em seres humanos³². Isto mostra que a variação da sensibilidade das diferentes espécies à toxina botulínica dificulta o cálculo exato da dose tóxica para seres humanos. A DL₅₀ para seres humanos, extrapolada de estudos realizados em macacos, é estimada em torno de 40 U / Kg⁸⁹.

A região mais comumente submetida a aplicações de toxina botulínica para a amenização de rugas é a região glabelar. As rugas verticais e horizontais desta região são causadas pela ação de um grupo de músculos depressores das sobrancelhas¹².

Para o tratamento das rugas de expressão da região glabelar, a dose média de toxina botulínica do tipo A utilizada, segundo Huang e Huang (2000)³², deve ser de 30 U. Em estudo publicado em 1998, Carruthers e Carruthers⁹⁰ ressaltam a importância da manutenção do formato das sobrancelhas ao se tratar a região glabelar. Os músculos que se imbricam nesta região e são responsáveis pela medialização da sobrancelhas e formação das indesejáveis rugas glabellares são os corrugadores, o próceros, e pequena porção do orbicular. As doses médias de toxina botulínica tipo A* utilizadas para a amenização das rugas desta região situam-se entre 20 U e 35 U. Se os músculos são mais ativos ou apresentam-se com maior massa muscular, são necessárias doses mais elevadas. Em geral, pacientes do sexo masculino são tratados com 35 U nesta área.

Segundo Benedetto (1999)¹², em análise da musculatura que atua na formação das rugas da região glabelar demonstra-se a necessidade da utilização de 4 U a 6 U de toxina botulínica tipo A* para aplicação de cada músculo corrugador, 4 U a 6 U para aplicação conjunta dos músculos orbicular e depressor dos supercílios, e 4 U a 6 U para aplicação no músculo próceros. As variações de doses dependeram da força muscular observada no exame físico da face; músculos mais fracos recebiam doses menores (4 U) e músculos mais fortes recebiam doses maiores (6 U). Em homens, em geral era necessária a aplicação de doses adicionais de 6 U a 9 U para complementação do tratamento desta região.

* BOTOX® (Allergan Inc., Irvine, Ca. – USA)

As rugas de expressão horizontais da região frontal, causadas pela ação do músculo frontal, são importantes para a execução dos movimentos da expressão facial e interação social. A elevação das sobrancelhas pode expressar surpresa, empatia, perplexidade ou embaraço⁷⁴. O músculo frontal é o único na região frontal que promove a elevação da pele e conseqüentemente das sobrancelhas¹². Esta função se opõe à ação dos músculos depressores desta região, que promovem o abaixamento da glabella e das sobrancelhas. Cautela deve ser tomada com relação à aplicação de toxina botulínica na região frontal, para se evitar o enfraquecimento excessivo do músculo frontal, levando ao predomínio da ação dos músculos depressores com conseqüente queda das estruturas do terço superior da face a longo prazo⁷⁴.

São descritas diferentes técnicas para o tratamento da região frontal com a utilização de doses bastante variáveis de toxina botulínica tipo A. Segundo Keen e Aviv⁹¹, são necessários poucos pontos de aplicação na região frontal devido à difusão da droga, e este autor utiliza um total de 20 U de toxina botulínica tipo A* nesta região. Garcia e Fulton⁹² relatam a utilização de 15 U a 20 U de toxina botulínica tipo A* nesta região. Carruthers e Carruthers⁹⁰ indicam o uso de 10 U a 15 U de toxina botulínica tipo A que deve ser aplicado em ambos os lados das rugas da região frontal.

* BOTOX[®](Allergan Inc., Irvine, Ca. – USA)

2.6 EFEITOS COLATERAIS E COMPLICAÇÕES DA TOXINA BOTULÍNICA

Apesar da aplicação da toxina botulínica com finalidade estética ser considerada procedimento seguro, sendo seus efeitos adversos auto limitados, o mesmo não se encontra isento da ocorrência de complicações.

Atualmente, o número de procedimentos estéticos cirúrgicos e não cirúrgicos com finalidade de rejuvenescer a face aumentaram significativamente em número, sendo a aplicação de toxina botulínica tipo A uma das principais responsáveis por este incremento⁹³. Ao mesmo tempo, ocorreu um aumento do número de complicações após as aplicações de toxina botulínica tipo A, as quais podem ser classificadas em leves ou severas. As complicações leves incluem assimetrias, edema, cefaléia leve, náuseas após aplicação, ptose palpebral, ptose das sobrancelhas, dor no sítio de aplicação, acentuação das bolsas gordurosas em pálpebras inferiores e leve queda da pálpebra inferior⁹³. Por outro lado, as complicações severas incluem diplopia, paralisia do músculo reto lateral do olho, ptose palpebral severa, lagofalmo, incompetência do músculo orbicular da boca, disfagia, alteração do timbre da voz, síndrome do olho seco, oftalmoplegia e cefaléia severa⁹³.

Com o uso cada vez mais difundido da toxina botulínica tipo A, as complicações tendem a ser mais freqüentes, sendo importante diagnosticá-las e tratá-las. Na maioria dos casos, o tratamento envolve apenas sintomáticos e precisam ser individualizados. Deve ser sempre preenchido o Termo de Consentimento Informado antes da aplicação da toxina botulínica

tipo A, e realizada documentação fotográfica criteriosa⁹³. Complicações a longo prazo ou intercorrências clínicas latentes devido a aplicações de toxina botulínica tipo A não foram reportadas.

A utilização da técnica de eletromiografia de fibra única, SFEMG ("single fiber electromyography"), demonstrou alteração na transmissão neuro muscular em músculos situados à distância do local de injeção de toxina botulínica tipo A* para o tratamento de distonias em pacientes que receberam doses entre 285 U a 570 U em seus tratamentos⁹⁴. O padrão de alteração observado demonstra que esta se deve à disfunção pré-sináptica. Este achado leva à conclusão de que a toxina botulínica tipo A, injetada localmente, migra, provocando efeitos à distância. O mecanismo responsável por tal migração não é conhecido, porém existem indícios de que a mesma se deva ao transporte vascular da toxina⁹⁴.

Não são observados casos de fraqueza generalizada após tratamento das distonias com altas doses de toxina botulínica tipo A, mas as alterações observadas são de extrema importância clínica. Pacientes que se mantêm por período indeterminado com alterações da transmissão neuromuscular, mesmo que sub-clínicas, podem estar mais suscetíveis a efeitos de outras drogas que, por seu mecanismo de ação ou efeitos colaterais, atuem na transmissão neuromuscular, como alguns antibióticos ou anestésicos⁹⁴.

* BOTOX®(Allergan Inc., Irvine, Ca. – USA)

2.7 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

A toxina botulínica tipo A é uma proteína imunogênica que pode levar à formação de anticorpos circulantes neutralizantes do tipo imunoglobulina G. Aproximadamente um terço das falhas terapêuticas estão relacionadas à presença destes anticorpos. Quando são verificados anticorpos circulantes contra a toxina botulínica tipo A, pode-se fazer uso dos sorotipos de toxina botulínica menos potentes, como os tipos B ou F, pois investigações recentes mostraram que não existem reações cruzadas entre eles¹². É possível reação cruzada entre anticorpos contra diferentes sorotipos de toxina, especialmente entre os sorotipos C e D ou E e F, bem como contra a toxina do tétano^{39,95}.

O desenvolvimento de anticorpos contra a toxina botulínica tipo A está relacionado a aplicações repetidas, dose utilizada a cada aplicação, dose total cumulativa e intervalo entre as aplicações⁹⁶, sendo portanto mais frequentes em pacientes que receberam altas doses sequenciais por longos períodos⁹⁷.

Não existe consenso da dose máxima a ser utilizada para que se evite a formação de anticorpos, porém um estudo conduzido por Biglan et al.⁹⁸ revelou a ausência da formação de anticorpos em pacientes que receberam dose menor que 50 U por sessão.

Estatisticamente, a formação de anticorpos ocorre mais em aplicações com doses superiores a 200 U, em intervalos inferiores ou iguais a um mês e injeções endovenosas acidentais⁹⁹. Jankovic e Schwartz¹⁰⁰

observaram relação entre a dose total cumulativa de 1.709 U e a formação de anticorpos e se preconiza a não aplicação de doses complementares com intervalo inferior a três meses.

A resistência imunológica tem sido descrita em torno de 3 a 5% dos pacientes tratados por distonia cervical, e não é conhecida, até o presente momento, a porcentagem de pacientes que desenvolvem anticorpos após aplicação com finalidade estética^{101,102}.

Estudos têm demonstrado que a frequência de formação de anticorpos é de aproximadamente 12 casos para 7.000 tratamentos. Os pacientes que desenvolvem anticorpos receberam doses maiores que 400 U ou 100 U com aplicações repetidas em intervalos inferiores a um mês¹⁰³.

O poder antigênico da neurotoxina não está relacionado com a dose DL₅₀ injetada, mas com a quantidade de toxina em nanogramas, proteína total, utilizada por injeção, uma vez que a resposta imune irá ocorrer contra a massa antigênica exposta por inoculação⁹⁶.

Na primeira formulação de toxina botulínica tipo A*, comercializada até 1998, complexo de neurotoxina originada da cepa 79-11, cada 100 U do frasco continha 25 ng de proteínas. Com a utilização da nova formulação, contendo a cepa BCB 2024, então aprovada pelo FDA, cada 100 U de toxina do frasco passou a conter 4,8 ng de proteínas. Mesmo após a significativa diminuição da carga protéica com a utilização da nova cepa, denotando menor potencial para formação de anticorpos em seres humanos, este fato requer estudos complementares que o comprovem¹².

* BOTOX® (Allergan Inc., Irvine, Ca. – USA)

2.8 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS APÓS APLICAÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA

As alterações histológicas que ocorrem no músculo denervado são atrofia e leve grau de desmielinização na terminação nervosa associada¹⁰⁴.

Em estudos de microscopia eletrônica, os músculos da face, quando denervados, apresentam amplo espectro de alterações ultra-estruturais, como inclusões anômalas, alterações em sarcômeros e organelas. Os elementos de contração se encontram em número reduzido, particularmente em fibras em degeneração. Observa-se ruptura localizada em miofilamentos que se estende ao espaço inter-fibrilar, a nível da linha Z. Os sarcômeros se encontram atenuados, com diminuição do número e densidade dos filamentos de miosina. A linha Z freqüentemente exhibe alteração de tamanho e formato, o que se estende às bandas I e A. Nas regiões de maior lesão, as mitocôndrias mostram-se diminuídas em densidade ou ausentes. Nota-se a presença abundante de corpos de inclusão, o que parece ser característica da musculatura facial denervada¹⁰⁵.

Em biópsia muscular de pacientes submetidos a aplicações repetidas de toxina botulínica tipo A para o tratamento de blefaroespasma, verifica-se presença dos brotamentos nervosos mais tardiamente, denotando um padrão de remodelação nervosa muito mais complexo⁶¹.

Em estudos com o músculo grande dorsal de coelhos, verificou-se que, após a aplicação de toxina botulínica, ocorre atrofia muscular, porém a mesma é reversível. A atrofia muscular verificada é localizada e observada 2 semanas após a aplicação da toxina, permanecendo por 4 semanas e então

é revertida¹⁰⁶. Achados similares de atrofia foram observados em músculos orbiculares dos olhos de pacientes tratados de blefaroespasma com toxina botulínica tipo A¹⁰⁷. A recuperação funcional do músculo requer de 3 a 6 meses, quando se verifica retorno de 70% a 80% da massa muscular original³⁵. A junção neuro muscular, segundo alguns estudos, pode levar até 3 anos para completar seu processo de remodelação após a aplicação de toxina botulínica^{108,109}.

2.9 PERSPECTIVAS EM RELAÇÃO À TOXINA BOTULÍNICA

Atualmente, dispõe-se de oito subtipos de toxina botulínica e espera-se, para breve, novas toxinas e novos subtipos no sentido de atender as principais necessidades médicas em relação ao produto, que são segurança, preparações estáveis, fácil conservação, baixa imunogenicidade, menor custo e, principalmente, maior durabilidade do efeito clínico¹¹⁰.

Devido a recentes pesquisas em relação ao uso clínico dos diferentes sorotipos da toxina botulínica e ao entendimento da base molecular para o tratamento de situações ou patologias que necessitem de paralisia transitória, o que é verificado com o uso da toxina botulínica tipo E⁵⁷, abre-se a possibilidade da utilização da mesma para tratamentos como imobilizações de curta duração em tratamentos ortopédicos, recuperação pós operatória em cirurgia plástica, ou até mesmo para avaliar casos mais apropriadamente antes da aplicação com toxina de longa duração, como a toxina do tipo A.

Médicos e pacientes esperam por novas formas farmacêuticas da toxina botulínica, especialmente as tópicas, nas quais a dor da aplicação possa ser eliminada ou reduzida. Porém, até o presente momento, não se tem notícia de que formas tópicas possam ser igualmente efetivas. Isso pode estar relacionado ao fato de os *Clostridium* serem microorganismos que não invadem espontaneamente os seres vivos, necessitando de uma forma ativa para serem introduzidos ou mantidos no corpo humano, produzindo infecção. Novos estudos poderão abrir perspectivas de veículos apropriados para aplicações tópicas das toxinas clostrídicas, que terão que vencer a barreira cutânea e conseguir levar a toxina ao seu sítio de ação¹¹¹.

Métodos de biologia molecular, como o PCR ("Polimerase Chain Reaction"), são capazes de detectar quantidades mínimas de antígenos através da amplificação de seqüências específicas do DNA de microorganismos. Estes testes poderão tornar-se úteis para monitoramento das quantidades residuais de toxina botulínica no organismo dos pacientes¹¹². Assim, as doses posteriores à primeira aplicação poderão ser calculadas baseando-se na quantidade residual de toxina no organismo, otimizando o seguimento do tratamento e evitando ou retardando a formação de anticorpos e outras complicações.

Pode-se mencionar, ainda, o avanço nos estudos em farmacocinética, que poderá permitir um tratamento individualizado, quando necessário, tendo em vista que alguns pacientes apresentam diferentes respostas a um mesmo fármaco¹¹³.

3. MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

No presente estudo retrospectivo, foram analisados os prontuários de 24 pacientes submetidas a mais de cinco aplicações de toxina botulínica do tipo A para o tratamento da hipercinese muscular do terço superior da face com finalidade estética, no período de julho de 1997 a junho de 2006, no Ambulatório de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) sob protocolo número 510/04 (Anexo 1).

Após análise dos prontuários, os pacientes que preenchiam os critérios adotados foram convocados, receberam as orientações pertinentes e aqueles que concordaram com a realização do mesmo foram solicitados a ler e a assinar o Termo de Consentimento Informado (Anexo 2 - Resolução do Conselho Nacional de Saúde número 196 de 10 / 10 / 96). Somente os pacientes que entenderam o motivo da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Informado passaram a fazer parte do estudo.

Os critérios de inclusão foram sexo feminino, idade entre 35 e 65 anos, e ter sido submetida a no mínimo cinco e no máximo sete aplicações de toxina botulínica tipo A em terço superior da face com finalidade estética.

Os critérios de exclusão foram sexo masculino, portadoras de doenças sistêmicas graves, tratamento prévio com toxina botulínica tipo A, portadoras de doenças neuro-musculares do tipo Miastenia Gravis ou Síndrome de Eaton-Lambert, sensibilidade a algum dos componentes da toxina botulínica utilizada, uso de antibióticos do grupo dos aminoglicosídeos ou espectinomicina, uso de bloqueadores dos canais de cálcio, drogas relaxantes musculares, ácido acetil-salicílico ou vitamina E em altas doses no período de 15 dias antes ou 15 dias após as aplicações, sinais inflamatórios ou infecciosos nos locais de aplicação, gestantes ou em fase de amamentação, cirurgia facial no período avaliado e pacientes com prontuários incompletos que comprometessem a avaliação.

A idade média observada em que os pacientes iniciaram as aplicações foi de 48,0 ($\pm 3,0$) anos, com mediana de 47,5 anos. A idade mínima observada no início das aplicações foi de 31 anos e a máxima de 62 anos. A idade média observada em que os pacientes realizaram a última aplicação foi de 51,6 ($\pm 3,0$) anos, com mediana de 52,2 anos.

O tempo médio de acompanhamento dos pacientes observado, ou seja, o período decorrido entre a primeira e a última sessão de tratamento foi de 42,2 ($\pm 4,0$) meses, mínimo de 19 meses e máximo de 59 meses.

No grupo selecionado (N=24), 6 pacientes (25%) tinham sido submetidos a 5 aplicações de toxina botulínica tipo A, 7 (29,2%) tinham sido submetidos a 6 aplicações e 11 pacientes (45,8%) a 7 aplicações (Gráfico 1).

Gráfico 1: Pacientes distribuídos pelo número de aplicações da toxina botulínica tipo A.

O intervalo médio observado entre as aplicações foi de 8 ($\pm 0,51$) meses, com mediana de 7,95 meses. O intervalo mínimo observado entre as sessões foi de 4 meses e o máximo de 26 meses (Tabela 1).

Tabela 1 – Intervalos entre as aplicações de toxina botulínica tipo A na amostra analisada.

Intervalos (meses)	Intervalo entre as sessões 1 e 2	Intervalo entre as sessões 2 e 3	Intervalo entre as sessões 3 e 4	Intervalo entre as sessões 4 e 5	Intervalo entre as sessões 5 e 6	Intervalo entre as sessões 6 e 7	Intervalo geral entre aplicações
Média	9,00	8,13	8,25	7,75	7,78	7,09	8
Mediana	7	6	6	6,5	7	7	7,95
Desvio Padrão	5,20	4,42	4,08	3,40	3,59	1,97	
Mínimo	4	4	4	4	4	5	
Máximo	26	19	19	17	19	11	
Número de pacientes	24	24	24	24	18	11	
IC	2,08	1,77	1,63	1,36	1,66	1,17	0,51

Pela análise dos prontuários, verificou-se a rotina adotada pelo Grupo de Medicina Estética e Laser do Serviço de Cirurgia Plástica e Queimaduras do Hospital das Clínicas da FMUSP para tratamentos com toxina botulínica.

Antes do primeiro tratamento, as pacientes eram submetidas a questionário padrão (Anexo 3). Este questionário continha informações de identificação, história da moléstia atual, medicamentos em uso, ocorrência de alergia ou hipersensibilidade, presença de doenças sistêmicas, alterações locais nos sítios de aplicação, expectativa da paciente quanto ao procedimento, traumatismos faciais prévios, assimetrias e história de paralisia facial. Qualquer alteração óssea, muscular ou de estruturas anatômicas referenciais da superfície cutânea da face foi devidamente documentada.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 TRATAMENTO

Antes de cada tratamento, era preenchido formulário específico (Anexo 4). Neste, observou-se figura da anatomia facial que corresponde ao “plano de aplicação”, contendo o registro da demarcação utilizada para cada aplicação, como número de pontos aplicados por grupo muscular, doses por ponto de aplicação, dose por grupo muscular, dose total e detalhes técnicos. Antes de cada aplicação, as pacientes eram fotografadas em posições padronizadas e a checagem era registrada no mesmo formulário.

As aplicações foram realizadas sempre pelo mesmo profissional médico, responsável pelos tratamentos com toxina botulínica no Ambulatório, e a técnica padronizada para todos os pacientes consistia na limpeza da face com álcool 70%, anestesia tópica com pomada de lidocaína e prilocaína^o 60 minutos antes de cada aplicação.

Previamente à diluição, a toxina botulínica do tipo A* utilizada era mantida em refrigerador (- 5 °C), seguindo-se a orientação fornecida pelo fabricante.

A diluição padronizada da toxina botulínica do tipo A foi realizada com 2,5 ml de solução salina 0,9%, em temperatura ambiente, tomando-se o cuidado de injetar inicialmente ar no frasco, com o intuito de retirar o vácuo existente no mesmo, necessário para a adequada conservação da toxina botulínica em questão. Evitou-se também a formação de bolhas, devido ao turbilhonamento do jato de soro fisiológico no momento de sua introdução no frasco.

Antes de cada aplicação, realizava-se a limpeza da pomada anestésica aplicada na face com solução salina 0,9% e em seguida, realizava-se a demarcação dos pontos a serem aplicados na região frontal com caneta dermatográfica.

Para esta demarcação, era solicitado às pacientes que realizassem os movimentos de elevar as sobrancelhas e medializar as mesmas, distribuindo-se os pontos demarcados de forma a cobrir toda a superfície da

^o Emla® (Astra, Brasil)

* BOTOX® (Allergan Inc., Irvine, Ca. – USA)

fronte. Respeitou-se a distância mínima de 1 cm do rebordo orbitário para a demarcação dos pontos de aplicação.

A técnica padrão de demarcação dos pontos de aplicação para o tratamento das regiões frontal e glabelar foi realizada com o paciente em posição sentada, face relaxada, de frente para o médico observador.

Solicitou-se realizar o movimento de franzir o nariz, demarcando-se na glabella 1 a 2 pontos aplicação, com distância de 1 cm entre eles, correspondentes à projeção do ventre do músculo próceros. O número de pontos demarcados variou de acordo com a extensão do músculo próceros e a força muscular. A dose de toxina botulínica tipo A utilizada para a aplicação nestes pontos foi de 2 U por ponto (Figura 7).

Figura 7: Demarcação do ponto de aplicação da toxina botulínica na região glabelar, para tratamento do músculo próceros.

NOTA: Os pontos foram demarcados sobre imagem cedida por J. Falcetti Arte e Comunicação Médica Ltda.

Com a paciente na mesma posição, solicitou-se realizar o movimento de medializar as sobrancelhas, demarcando-se na glabella de 1 a 3 pontos de aplicação bilateralmente, distando de 1 cm a 2 cm entre eles, correspondentes à projeção dos ventres musculares dos músculos corrugadores. O número de pontos demarcados variou de acordo com a extensão dos músculos corrugadores e a força muscular. A dose de toxina botulínica tipo A utilizada para a aplicação nestes pontos foi de 2 U por ponto (Figura 8).

Figura 8: Demarcação dos pontos de aplicação da toxina botulínica na região glabellar, para tratamento dos músculos corrugadores.

NOTA: Os pontos foram demarcados sobre imagem cedida por J. Falcetti Arte e Comunicação Médica Ltda.

Com a paciente ainda em posição sentada, solicitou-se realizar o movimento de elevação das sobrancelhas, demarcando-se os pontos de aplicação da região frontal. Para a distribuição dos pontos nesta região, foram observados alguns parâmetros, quais sejam, traçar uma linha média da base do nariz à implantação do cabelo (linha A), posteriormente foram traçadas duas linhas paralelas a esta, da borda superior das sobrancelhas à implantação do cabelo, bilateralmente (linha B), distando 1 cm da linha A. Sobre as linhas B, foram demarcados 2 pontos de cada lado, o primeiro a 2 cm da borda superior da sobrancelha e o outro 2 cm acima deste ponto. A dose de toxina botulínica tipo A utilizada para a aplicação nestes pontos foi de 2 U por ponto (Figura 9).

Figura 9: Demarcação dos pontos de aplicação da toxina botulínica na região frontal para tratamento do músculo frontal, porção medial.

NOTA: Os pontos foram demarcados sobre imagem cedida por J. Falcetti Arte e Comunicação Médica Ltda.

Seguindo-se a marcação da região frontal, foi marcada a linha C, paralela à linha B, a uma distância de 2 cm da mesma. A linha C iniciava-se na borda superior das sobrancelhas e terminava na linha de implantação do cabelo. Sobre a linha C foram demarcados dois pontos bilateralmente, o primeiro a 1,5 cm da borda superior das sobrancelhas e o segundo 2 cm acima deste ponto. A dose de toxina botulínica tipo A utilizada para a aplicação nestes pontos foi de 2 U por ponto (Figura 10).

Figura 10: Demarcação dos pontos de aplicação da toxina botulínica na região frontal, para tratamento do músculo frontal, porção média.

NOTA: Os pontos foram demarcados sobre imagem cedida por J. Falcetti Arte e Comunicação Médica Ltda.

Ainda na região frontal, quando a paciente apresentava movimento na região frontal lateral à linha C, foi realizada a demarcação da linha D, paralela à linha C, a uma distância de 1,5 cm da mesma. A linha D iniciava-se na borda superior das sobrancelhas e terminava na linha de implantação do cabelo. Sobre a linha D, foi demarcado um único ponto bilateralmente, a 2 cm da borda superior das sobrancelhas. A dose de toxina botulínica tipo A utilizada para a aplicação nestes pontos foi de 1 U por ponto (Figura 11).

Figura 11: Demarcação dos pontos de aplicação da toxina botulínica na região frontal, para tratamento do músculo frontal, porção lateral.

NOTA: Os pontos foram demarcados sobre imagem cedida por J. Falcetti Arte e Comunicação Médica Ltda.

A depender da extensão do músculo frontal, da cinese e da força muscular deste músculo, adicionaram-se dois pontos de aplicação na linha média (linha A). O primeiro ponto sobre esta linha era demarcado 3 cm acima dos pontos de demarcação do ventre do músculo prócero e o segundo 2 cm acima deste. A dose de toxina botulínica tipo A utilizada para a aplicação nestes pontos foi de 2 U por ponto (Figura 12).

Figura 12: Demarcação dos pontos de aplicação da toxina botulínica na região frontal, para tratamento do músculo frontal, pontos na linha média.

NOTA: Os pontos foram demarcados sobre imagem cedida por J. Falcetti Arte e Comunicação Médica Ltda.

Na região frontal, foram realizados de 8 a 12 pontos de aplicação, e na região glabellar foram realizados de 3 a 8 pontos de aplicação conforme descrito (Figura 13).

Figura 13: Demarcação dos pontos de aplicação da toxina botulínica nas regiões frontal e glabellar.

NOTA: Os pontos foram demarcados sobre imagem cedida por J. Falcetti Arte e Comunicação Médica Ltda.

Após a diluição, a toxina botulínica era mantida em refrigerador (2 a 8 °C) e durante as aplicações a toxina diluída era mantida em frasco com gelo. O tempo máximo decorrido entre a diluição da toxina a aplicação foi de doze horas.

As aplicações eram realizadas com a paciente em posição semi-sentada.

A antisepsia da face foi realizada com álcool 70%. As aplicações da toxina botulínica eram realizadas com seringa de 0,5 ml e agulha fixa de

30G $\frac{1}{2}$ * e em plano intra-muscular. O plano intra-muscular era atingido com penetração da agulha na pele a 90°, transfixando-se epiderme, derme, subcutâneo e musculatura, até tocar o periósteo, retraía-se a agulha 2 mm, quando se injetava a solução com toxina botulínica.

A seringa utilizada possui cinco divisões, cada uma de 0,1 ml, que por sua vez subdividem-se a cada 0,05 ml. Levando-se em conta a diluição padrão da toxina botulínica utilizada, cada 0,1 ml da solução na seringa continha 4 U da toxina, portanto, cada 0,05 ml continha 2 U.

Logo após o término da aplicação, as demarcações cutâneas eram limpas com solução salina tomando-se o cuidado de não massagear a face, e a seguir solicitava-se ao paciente se levantar.

Todas as pacientes foram orientadas a tomar alguns cuidados no período pós-aplicação imediato. As recomendações eram de, nas primeiras quatro horas, evitar mímica facial, não manipular a face, não se deitar e evitar abaixar a cabeça, bem como não realizar atividades físicas no dia da aplicação.

Após cada aplicação, as pacientes eram orientadas a retornar mensalmente para reavaliações clínicas, que consistiam na quantificação da presença de rugas para se determinar o momento correto da nova aplicação.

Dentre as 159 sessões de aplicação de toxina botulínica tipo A em face consideradas neste estudo, foram verificados 38 casos de equimose (25,5%), 3 casos de dor no local da aplicação (2,01%), com duração de 48 a 72 horas, e 2 casos de cefaléia (1,3%), com duração de 3 a 5 dias após a aplicação.

* BD (Becton Dickinson Ind. Cirurg. Ltda.)

Os critérios observados para a indicação de novas aplicações eram intervalo mínimo de 4 meses entre as aplicações, queixa espontânea por parte das pacientes e presença de rugas nas regiões previamente tratadas.

3.2.2 AVALIAÇÃO

Os métodos de avaliação adotados foram a análise da documentação fotográfica e a análise comparativa dos dados dos prontuários.

Na análise da documentação fotográfica, foram avaliadas as rugas estáticas e dinâmicas da face nas regiões frontal e glabelar.

Antes de cada aplicação, as pacientes tiveram a face fotografada em posições e expressões padronizadas de frente em repouso, com sobancelhas elevadas, medializando as sobancelhas e franzindo o nariz.

Toda a documentação fotográfica da casuística obedeceu às normas padronizadas pelo Grupo de Medicina Estética e Laser do Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da FMUSP, utilizando máquina Canon modelo EOS Rebel G, utilizando fundo de coloração azul, paciente em posição ortostática, mesmas condições de iluminação e distância, bem como abertura do diafragma padronizados.

A documentação fotográfica foi avaliada por três médicos avaliadores independentes, em dias diferentes, estes não tendo acesso às informações constantes das avaliações um do outro.

Para esta análise, foram comparados pares de imagens, sendo a da esquerda a fotografia de antes da primeira aplicação da toxina botulínica tipo A e a da direita anterior à última aplicação, nas posições padronizadas citadas anteriormente (Figura 14).

Figura 14: Cronograma das aplicações (barras em amarelo, com o número das aplicações) e das avaliações (setas em vermelho).

As rugas estáticas e dinâmicas das regiões frontal e glabellar da face foram avaliadas segundo a seguinte escala:

- Muita amenização
- Pouca amenização
- Inalterado
- Pouca acentuação
- Muita acentuação

Através da análise do par de fotografias da face em repouso, posição de frente, foram avaliadas as rugas estáticas das regiões frontal e glabellar.

Através da análise do par de fotografias da face em posição de frente, no movimento de elevação das sobrancelhas, foram avaliadas as rugas dinâmicas da região frontal.

Através da análise do par de fotografias da face, posição de frente, no movimento de medializar as sobrancelhas, foram avaliadas as rugas dinâmicas da região glabellar, causadas pela contração dos músculos corrugadores.

Pela análise do par de fotografias da face, posição de frente, no movimento de franzir o nariz, foram avaliadas as rugas dinâmicas da região glabellar, causadas pela contração do músculo prócerus.

Os dados das avaliações médicas foram coletados em folha específica, individualizada a cada médico avaliador e a cada paciente avaliado (Anexo 5).

Por meio dos prontuários foram obtidos os seguintes dados, quais sejam, data das aplicações, idade das pacientes ao início das aplicações, idade das pacientes na ocasião da última aplicação, doses de toxina botulínica tipo A utilizadas por grupo muscular a cada aplicação, doses totais por aplicação, doses totais cumulativas, intervalos entre as aplicações e complicações.

3.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise, foram utilizados os testes não paramétricos de Igualdade de Duas Proporções, de Friedman e Wilcoxon e Análise De Concordância de Kappa. Para complementação da análise descritiva, foi realizado intervalo de confiança para a média.

Foi definido nível de significância de 0,05, e 95% de confiabilidade estatística para os intervalos de confiança.

4. RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DAS RUGAS DA FACE

Segundo a Análise de Concordância de Kappa, a concordância entre os médicos avaliadores neste estudo foi considerada de mínima a regular (Kappa entre 21% e 60%).

RUGAS ESTÁTICAS DA REGIÃO FRONTAL

Segundo a análise realizada pelos avaliadores médicos, houve, segundo a classificação sugerida nos métodos, muita amenização das rugas estáticas da região frontal da face em 13,9% (N = 10) dos pacientes avaliados, pouca amenização em 48,6% (N = 35), mantiveram-se inalteradas em 37,5% (N = 27), não sendo observados casos de pouca acentuação ou muita acentuação das rugas. Aplicando-se o Teste de Igualdade de Duas Proporções, verificou-se que a resposta de pouca amenização (48,6%) não foi considerada estatisticamente diferente do percentual verificado de inalterado (37,5%). As demais comparações entre categorias de respostas foram consideradas estatisticamente significativas ($0,001 \leq p \leq 0,007$). (Tabela 2 e Anexo 6).

Tabela 2: Resultado da avaliação dos médicos relativo às rugas faciais

Resposta		Rugas Estáticas		Rugas Dinâmicas		
		Região frontal	Região Glabellar	Região Frontal	Região Glabellar (Corrugadores)	Região Glabellar (Prócero)
Muita Amenização	Pacientes	10	13	36	13	12
	%	13,9%	18%	50%	18%	16,6%
Pouca Amenização	Pacientes	35	21	25	33	29
	%	48,6%	29,2%	34,7%	45,8%	40,4%
Inalterado	Pacientes	27	36	11	19	23
	%	37,5%	50%	15,3%	27%	32%
Pouca Acentuação	Pacientes	0	2	0	7	8
	%	0,0%	2,8%	0,0%	9,7%	11%
Muita Acentuação	Pacientes	0	0	0	0	0

RUGAS ESTÁTICAS DA REGIÃO GLABELAR

Segundo a análise realizada pelos avaliadores médicos, houve, segundo a classificação sugerida nos métodos, muita amenização das rugas estáticas da região glabellar da face em 18% (N = 13) dos pacientes avaliados, pouca amenização em 29,2% (N = 21), mantiveram-se inalteradas em 50% (N = 36). Observou-se pouca acentuação em 2,8% (N = 2) dos pacientes e não se observaram casos de muita acentuação das rugas. Aplicando-se o Teste de Igualdade de Duas Proporções, verificou-se que as diferenças entre as respostas muita amenização (18%) e pouca amenização (29,2%) não foram consideradas estatisticamente significativas, sendo as demais respostas consideradas estatisticamente significativas ($0,001 \leq p \leq 0,041$), (Tabela 2 e Anexo 6).

RUGAS DINÂMICAS DA REGIÃO FRONTAL DA FACE

Segundo a análise realizada pelos avaliadores médicos, houve, segundo a classificação sugerida nos métodos, muita amenização das rugas dinâmicas da região frontal da face em 50% (N = 36) dos pacientes avaliados, pouca amenização em 34,7% (N = 25), mantiveram-se inalteradas em 15,3% (N = 11), não sendo observados casos de pouca acentuação ou muita acentuação das rugas. Aplicando-se o Teste de Igualdade de Duas Proporções, verificou-se que a resposta de muita amenização (50%) não foi estatisticamente diferente do percentual de pouca amenização (34,7%). As comparações entre as demais categorias de respostas apresentaram diferença estatística ($0,001 \leq p \leq 0,004$), (Tabela 2 e Anexo 6).

RUGAS DINÂMICAS DA REGIÃO GLABELAR DA FACE

A. Com o movimento de medializar as sobrancelhas, contração dos músculos corrugadores

Segundo a análise realizada pelos avaliadores médicos, houve, segundo a classificação sugerida nos métodos, muita amenização das rugas estáticas da região glabelar da face em 18% (N = 13) dos pacientes avaliados, pouca amenização em 45,9% (N = 33), mantiveram-se inalteradas em 26,4% (N = 19), observou-se pouca acentuação em 9,7% (N = 7), não sendo observados casos de muita acentuação das rugas. Aplicando-se o

Teste de Igualdade de Duas Proporções, verificou-se que a resposta de muita amenização (18%) não foi estatisticamente diferente do percentual de inalterado (26,4%) e de pouca acentuação (9,7%). As demais comparações entre categorias de resposta foram diferentes estatisticamente ($0,001 \leq p \leq 0,042$), (Tabela 2 e Anexo 6).

B. Com o movimento de franzir o nariz, contração do músculo prócero

Segundo a análise realizada pelos avaliadores médicos, houve, segundo a classificação sugerida nos métodos, muita amenização das rugas estáticas da região glabellar da face em 16,6% (N = 12) dos pacientes avaliados, pouca amenização em 40,4% (N = 29), mantiveram-se inalteradas em 32% (N = 23), observou-se pouca acentuação em 11% (N = 8), não sendo observados casos de muita acentuação das rugas. Aplicando-se o Teste de Igualdade de Duas Proporções, verificou-se que a frequência de resposta inalterado (32%) e pouca amenização (40,4%) foram semelhantes. As diferenças entre as respostas muita amenização (16,6%) e pouca acentuação (11%) também não foram consideradas estatisticamente diferentes. As demais categorias de respostas foram significativamente diferentes entre si ($0,001 \leq p \leq 0,009$), (Tabela 2 e Anexo 6).

Gráfico 2: Representação em barras das médias das doses de toxina botulínica tipo A utilizadas nas aplicações sucessivas na região frontal

Gráfico 3: Médias das doses de toxina botulínica tipo A utilizadas para o tratamento da região frontal nas aplicações sucessivas e os intervalos de confiança

Gráfico 4: Representação em barras das médias das doses de toxina botulínica tipo A utilizadas nas aplicações sucessivas na região glabellar para o tratamento dos músculos corrugadores

Gráfico 5: Médias das doses de toxina botulínica tipo A utilizadas para o tratamento dos músculos corrugadores nas aplicações sucessivas e os intervalos de confiança

Gráfico 6: Representação em barras das médias das doses de toxina botulínica tipo A utilizadas nas aplicações sucessivas na região glabellar para o tratamento do músculo prócero

Gráfico 7: Médias das doses de toxina botulínica tipo A utilizadas para o tratamento do músculo prócero nas aplicações sucessivas e os intervalos de confiança

DOSES TOTAIS DE TOXINA BOTULÍNICA TIPO A POR SESSÃO

A média da dose total de toxina botulínica tipo A utilizada por sessão observada neste estudo foi de $43,83 \pm 1,25$ U. A média mínima da dose observada por sessão foi de $37,08 \pm 3,22$ U (Sessão 1), e a máxima foi de $46,82 \pm 3,87$ U (Sessão 7). Através do Teste de Friedman, verificou-se que existe diferença estatisticamente significativa entre as médias da dose total entre as sessões 1 e 2 ($p = 0,010$), 2 e 3 ($p = 0,020$), sendo que nas demais não se verificou diferença estatisticamente significativa (Gráficos 8 e 9).

Gráfico 8: Média das doses de toxina botulínica tipo A utilizadas em cada sessão de aplicação

Gráfico 9: Médias das doses de totais de toxina botulínica tipo A utilizadas nas aplicações sucessivas e os intervalos de confiança

Para o cálculo das doses totais foram também consideradas as doses de toxina botulínica tipo A utilizadas para o tratamento dos músculos orbiculares dos olhos, que não são alvo deste estudo.

DOSES TOTAIS CUMULATIVAS

No presente estudo, verificou-se dose total cumulativa de toxina botulínica tipo A de $272,08 \pm 20,42$ U. Esta dose total cumulativa pode ser dividida entre os diferentes grupos de pacientes do estudo. Dentre os pacientes que foram submetidos a cinco sessões, a dose total cumulativa verificada foi de $205,83 \pm 12,7$ U, dentre os que foram submetidos a seis sessões, a dose total cumulativa foi de $272,86 \pm 33,92$ U, e dentre os pacientes que foram submetidos a sete sessões, foi de $307,73 \pm 14,22$ U.

Para o cálculo das doses totais cumulativas, foram também consideradas as doses de toxina botulínica tipo A utilizadas para o tratamento dos músculos orbiculares dos olhos, que não são alvo deste estudo.

4.4 DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

Figura 15: Avaliação das rugas estáticas das regiões frontal e glabelar antes da primeira aplicação de toxina botulínica tipo A.

Figura 16: Avaliação das rugas estáticas das regiões frontal e glabelar antes da sétima aplicação de toxina botulínica tipo A. Pode-se notar amenização das rugas frontais e glabellares.

Figura 17: Avaliação das rugas estáticas da região glabellar antes da primeira aplicação de toxina botulínica tipo A.

Figura 18: Avaliação das rugas estáticas da região glabellar antes da sexta aplicação de toxina botulínica tipo A. Pode-se notar amenização das rugas glabellares.

Figura 19: Avaliação das rugas dinâmicas da região frontal antes da primeira aplicação de toxina botulínica tipo A.

Figura 20: Avaliação das rugas dinâmicas da região frontal antes da quinta aplicação de toxina botulínica tipo A. Pode-se notar amenização das rugas dinâmicas frontais.

Figura 21: Avaliação das rugas dinâmicas da região glabelar antes da primeira aplicação de toxina botulínica tipo A.

Figura 22: Avaliação das rugas dinâmicas da região glabelar antes da sexta aplicação de toxina botulínica tipo A. Pode-se notar amenização das rugas dinâmicas glabellares.

5. DISCUSSÃO

De acordo com os dados fornecidos por alguns autores, mais de 2,2 milhões de procedimentos envolvendo a aplicação de toxina botulínica foram realizados nos Estados Unidos no ano de 2003, representando aumento de 37% em relação a 2002^{7,114}.

O tratamento das rugas de expressão facial com toxina botulínica do tipo A está se tornando cada vez mais freqüente em nosso meio. A evolução da qualidade das toxinas, a segurança do tratamento, com baixos índices de complicação, e a motivação financeira são alguns dos fatores que tornam o uso desta droga cada vez mais freqüente⁶. Como consequência deste fato, existe a necessidade de se avaliar o que ocorre com a face, tanto estática como dinamicamente, após aplicações seriadas de toxina botulínica, assim como avaliar alguns dados, como a idade no início das aplicações, intervalos entre as mesmas e a evolução das doses utilizadas.

Poucos estudos foram conduzidos para determinar a eficácia e a segurança no longo prazo das aplicações seriadas de toxina botulínica na face.

No tratamento das rugas de expressão das regiões frontal e glabellar, não existe consenso de qual seria a menor dose de toxina empregada que seria efetiva e necessária para a obtenção do efeito desejado, sem ocorrer indução à formação de anticorpos. Outras dúvidas que ainda não foram esclarecidas, referem-se ao fato de se questionar a necessidade da

alteração das doses em aplicações repetidas para a obtenção do mesmo efeito, se ocorre atrofia muscular ou outras alterações clínicas, ou se os intervalos entre as aplicações devem ser mantidos ou alterados.

No que se refere a tratamentos com aplicação de toxina botulínica tipo A, pacientes do sexo feminino representam 86%, segundo levantamento realizado no ano de 2003¹¹⁴. No presente estudo, optou-se em selecionar pacientes do sexo feminino por representarem a maior porcentagem de pacientes que solicitam este tipo de tratamento. Existem diferenças técnicas na aplicação de toxina botulínica entre homens e mulheres³². Em geral, pacientes do sexo masculino necessitam de maior dose de toxina botulínica para o tratamento das rugas hipercinéticas da face, assim como são descritas diferenças no modo de aplicação da toxina botulínica nos homens e nas mulheres¹².

O número de aplicações da toxina botulínica a que tinham sido submetidos os pacientes selecionados neste estudo foi de 5 a 7, totalizando 159 aplicações analisadas. A casuística foi assim delineada com a finalidade de eliminar variáveis que apareceriam com a inclusão de pacientes com maior ou menor número de aplicações. A escolha dos pacientes com este número de aplicações se deve também ao fato de que o período viável em que se iniciou este tipo de tratamento no Grupo de Medicina Estética e Laser do Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da FMUSP, até o momento do agrupamento de dados para a realização deste estudo, selecionou pacientes com este tipo de perfil.

A idade média observada em que os pacientes iniciaram as aplicações de toxina botulínica foi de 48,0 ($\pm$ 3,0) anos, com mediana de 47,5 anos. A idade mínima observada no início das aplicações foi de 31 anos e a máxima de 62 anos. A idade média observada em que os pacientes realizaram a última aplicação foi de 51,6 ($\pm$ 3,0) anos, com mediana de 52,2 anos. Em relação à distribuição por idade, em levantamento realizado recentemente¹¹⁴, verificou-se que 54,5% dos pacientes submetidos a tratamentos com toxina botulínica tipo A, apresentavam idade entre 35 e 50 anos, 26,5% entre 51 e 64 anos e 14,1% entre 19 a 34 anos. Pode-se observar no presente estudo que as médias das idades tanto no início das aplicações como por ocasião da última aplicação, são similares às aquelas observadas em estudos anteriores. Entretanto, segundo Carruthers e Carruthers⁷, em análise retrospectiva de 50 pacientes submetidos a aplicações de toxina botulínica tipo A, observaram idade média de 42,8 ($\pm$ 8,9) anos em seus pacientes, com mediana de 42 anos. A casuística neste estudo, demonstrou que os pacientes tratados são mais jovens se comparados com a casuística do presente estudo, o que vem corroborar as indicações mais precisas das aplicação da toxina no Grupo de Medicina Estética, no qual se aguarda a formação de rugas hipercinéticas, estáticas e dinâmicas para que as aplicações sejam indicadas. Pode-se verificar também diferença no padrão de beleza em diferentes países¹¹⁵. Quanto à obtenção de bons resultados após a aplicação de toxina botulínica na face, as pacientes em nosso meio, de modo geral, não anseiam por paralisia completa da fronte e glabella. Estas desejam apenas amenização das rugas

com manutenção parcial dos movimentos. Este fato também tem influência nas doses utilizadas.

No presente estudo, o intervalo médio observado entre as aplicações foi de 8 ($\pm 0,51$) meses, com mediana de 7,95 meses. O intervalo mínimo observado entre as sessões foi de 4 meses e o máximo de 26 meses. Carruthers e Carruthers⁷ referem intervalo entre as aplicações de 19,3 ($\pm 13,3$) semanas em recente estudo, com mediana de 17 semanas.

Mesmo com a solicitação de que os pacientes retornassem mensalmente para reavaliação, quando eram avaliados os critérios para possível indicação de nova aplicação, muitas vezes estes não compareciam. Através do levantamento dos prontuários, observou-se que os retornos muitas vezes não foram realizados por vários motivos, como financeiro ou desejo pessoal da paciente em adiar as aplicações, o que reflete a realidade da prática clínica, na qual os intervalos entre as aplicações apresentam-se com grande variabilidade.

Em nosso Serviço, indicamos novas aplicações de toxina botulínica com intervalo mínimo de 4 meses entre as aplicações. A toxina botulínica, devido ao seu mecanismo de ação, possui duração do efeito clínico entre 3 e 6 meses^{32,116}. Verifica-se que, após a aplicação da toxina botulínica do tipo A, a placa motora encontra-se totalmente reestruturada após 91 dias, podendo ocorrer a contração muscular de forma efetiva, o que realmente se observa na prática clínica⁶¹. Quando completado período mínimo de quatro meses da última aplicação, com a paciente queixando-se de forma espontânea da presença de rugas nas regiões frontal e glabellar, ou quando

ao exame da musculatura facial verificavam-se rugas hipercinéticas nestas regiões, indica-se nova aplicação.

A diluição padronizada da toxina botulínica do tipo A foi realizada com 2,5 ml de solução salina 0,9%. Diversos autores utilizam a diluição com volumes de solução salina variável, oscilando entre 1 ml a 20 ml (100 U / ml a 5 U / ml)^{116,117}. Optou-se pela diluição com 2,5 ml de solução salina por esta ser a orientação do fabricante, e associado a isto, verifica-se na literatura, que a melhor solução preparada da toxina é aquela cuja concentração promove a difusão controlada na toxina^{118,119}. Associado a isto, verifica-se maior facilidade técnica com a utilização desta diluição para a utilização de seringas de 0,5 ml nas as aplicações. Ao realizar-se a diluição, deve-se tomar o cuidado de injetar inicialmente ar no frasco, com o intuito de retirar o vácuo existente no mesmo, necessário para a adequada conservação da toxina botulínica em questão. Algumas vezes, por motivos variados, como conservação inadequada do produto, verifica-se a falta de vácuo no frasco. Nestes casos devolve-se o produto ao fabricante, sem no entanto, introduzir soro fisiológico no seu interior. Evitou-se também a formação de bolhas, devido ao turbilhonamento do jato de soro fisiológico no momento da introdução da solução salina no frasco, o que pode provocar a quebra da toxina com posterior diminuição de seu efeito clínico¹¹⁶.

Em relação à técnica de aplicação, por motivos de segurança, respeitou-se a distância mínima de 1 cm do rebordo orbitário para a demarcação dos pontos de aplicação. Deve-se entender que a toxina botulínica difunde-se facilmente¹², o que nas áreas próximas aos olhos pode

ocasionar maior frequência de complicações como diplopia ou até oftalmoplegia⁹³. Os pontos de aplicação foram demarcados com distância mínima de 1,5 a 2 cm entre si, devido ao fato de a toxina apresentar difusão com efeito clínico estabelecido até 1 ou 2 cm, podendo chegar até 3 cm^{12,71}.

Na região glabellar, para o tratamento dos músculos corrugadores, verificou-se que, em determinados pacientes, os pontos de aplicação foram demarcados com a distância de 1 cm uns dos outros. Isto se deve, nestes casos, à maior força muscular observada neste grupo muscular.

Deve-se observar que a musculatura da mímica facial se apresenta de forma a desempenhar um harmonioso equilíbrio das estruturas da face, o que nos leva a indicar, na maior parte das vezes, a aplicação da toxina botulínica em todo o terço superior da face, e não em grupos musculares individualizados.

A dose de toxina botulínica utilizada varia de acordo com a extensão e a força do músculo a ser tratado. Quanto maior a força muscular ou mais extenso o músculo, maior a dose a ser utilizada^{12,90}.

As doses de toxina botulínica não puderam ser estabelecidas e fixas nos diferentes pacientes e mesmo em aplicações sucessivas no mesmo paciente neste estudo. Isto ocorreu pelo fato de que os pacientes eram diferentes entre si, sendo examinados de forma individualizada, com diferentes estruturas e padrões de força muscular. O mesmo paciente pode apresentar mudanças no padrão de contração muscular após a aplicação de toxina botulínica. Desta forma, em um mesmo paciente, as doses foram alteradas entre uma aplicação e outra. Deve-se lembrar também que, sendo

este um estudo retrospectivo, não foram fixadas doses por ausência de protocolo de estudo previamente estabelecido.

A dose de toxina botulínica utilizada por ponto de aplicação foi de 2 U, aumentando-se o número de pontos conforme a necessidade, como descrito anteriormente. Na porção lateral do músculo frontal, foi demarcado um ponto bilateralmente (linha D descrita no método), em que se utilizou a dose de 1 U. Esta dose foi menor do que a observada nos demais pontos de aplicação porque, como foram estudadas apenas pacientes do sexo feminino, estas solicitavam a elevação do terço lateral das sobrancelhas. Com a utilização de menores doses nesta região, obtém-se efeito menos intenso da toxina com conseqüente menor paralisia e contração parcial do músculo frontal, com leve elevação do terço lateral das sobrancelhas^{71,118,120}. As doses descritas para o tratamento das regiões frontal e glabellar são variadas. Benedetto¹² descreveu a utilização de 2 U de toxina botulínica por ponto de aplicação para o tratamento da região frontal, 4 a 6 U como dose total para o tratamento dos corrugadores, e 4 a 6 U para o tratamento do músculo prócer, as doses variando de acordo com a força muscular. Hankins¹¹⁶ descreveu a utilização de doses que variavam de 2,5 U a 4 U por ponto de aplicação como dose efetiva para o tratamento da região glabellar. Fagien¹¹⁸, por sua vez, aplicava 4 a 5 pontos para o tratamento dos músculos corrugadores, com 2,5 U a 5 U por ponto de aplicação e 9 pontos de aplicação com 2,5 U por ponto para o tratamento de toda a região frontal.

No presente estudo, a média da dose total de toxina botulínica tipo A utilizada por sessão para o tratamento da região frontal foi de $16,13 \pm 0,7$ U.

Fagien¹¹⁸ descreveu a utilização de 22,5 U para o tratamento da região frontal e Rohrich⁷¹, 10 U a 20 U de toxina para o tratamento da mesma região, com possibilidade de utilizar doses adicionais de 10 U a 15 U, dependendo da força muscular.

Para o tratamento dos músculos corrugadores, a média da dose total de toxina botulínica tipo A utilizada por sessão foi de $9,82 \pm 0,55$ U. Benedetto¹² descreveu a utilização de 4 U a 6 U como dose total para o tratamento dos corrugadores, e Hankins¹¹⁶, 12,5 U a 20 U de toxina com a mesma indicação. Fagien¹¹⁸ utilizou 10 U a 20 U de toxina botulínica para o tratamento dos músculos corrugadores.

Observou-se que a média da dose total de toxina botulínica utilizada por sessão para o tratamento do músculo prócero foi de $2,77 \pm 0,19$ U, o que corresponde à mesma dose descrita por outros autores^{71,116,118}.

A média da dose total de toxina botulínica tipo A utilizada por sessão foi de $43,83 \pm 1,25$ U. A sessão com menor dose média observada foi a sessão de número 1 ($37,08 \pm 3,22$ U), e a maior foi a de número 7 ($46,82 \pm 3,87$ U). Observou-se pela literatura, que as doses totais apresentam valores variáveis. Pode-se observar aumento significativo da média da dose total utilizada por sessão da primeira até a terceira, mantendo-se estável nas sessões seguintes. Este achado está relacionado à adequação da dose a cada paciente, sabendo-se que se deve utilizar mínimas doses que sejam efetivas, evitando-se assim a formação de anticorpos^{121,122}. Carruthers e Carruthers⁷ utilizaram como dose média total por sessão, 40 U de toxina botulínica tipo A.

No presente estudo, verificou-se que a dose total cumulativa de toxina botulínica tipo A foi de $272,08 \pm 20,42$ U. Esta dose total cumulativa pode ser dividida entre os diferentes grupos de pacientes do estudo. Dentre os pacientes que foram submetidos a cinco sessões, a dose total cumulativa verificada foi de $205,83 \pm 12,7$ U, dentre os que foram submetidos a seis sessões, a dose total cumulativa foi de $272,86 \pm 33,92$ U, e dentre os pacientes que foram submetidos a sete sessões, esta foi de $307,73 \pm 14,22$ U. Para o cálculo das doses totais cumulativas, foram também consideradas as doses de toxina utilizadas para o tratamento dos músculos orbiculares dos olhos, que não são alvo do presente estudo, para considerar as doses totais as quais os pacientes eram submetidos. Carruthers e Carruthers⁷, em estudo retrospectivo com 50 pacientes submetidos entre 10 e 30 aplicações, descreveram que a dose total cumulativa era de 690 U (mínima de 244 U e máxima de 1603 U). Sabe-se que a dose total cumulativa tem importância sob o ponto de vista imunológico, e, a partir de 1709 U, a probabilidade de formação de anticorpos é estatisticamente significativa¹⁰⁰. A realização de aplicações de reforço nos pacientes submetidos a tratamentos com toxina botulínica deve ser evitada, pois este procedimento gera maior probabilidade de formação de anticorpos contra a toxina botulínica³².

As rugas das regiões peri-orbitárias, originadas pela contração dos músculos orbiculares dos olhos, não foram avaliadas neste estudo. Isto ocorreu por esta região estar sujeita a inúmeras variáveis, como excesso de pele e herniação das bolsas gordurosas das pálpebras inferiores devido ao envelhecimento. Estas nuances poderiam tornar os resultados da avaliação

não confiáveis. Esta região faz parte de outro estudo em desenvolvimento, prospectivo e com a inclusão de grupo controle.

Como método de avaliação, optou-se pela análise da documentação fotográfica antes da primeira e antes da última aplicação, porque o objetivo do estudo era analisar as alterações da dinâmica facial após aplicações repetidas de toxina botulínica, e não demonstrar o efeito da toxina na musculatura, como já foi estabelecido anteriormente. Com a análise realizada através da documentação fotográfica antes da aplicação, os pacientes correspondentes não estavam sob efeito da toxina, proporcionando achados como consequência tardia das aplicações da toxina, e não de seu efeito clínico imediato. Portanto, foram avaliadas rugas frontais e glabellares em dois momentos livres do efeito da toxina, sendo avaliadas as consequências da utilização da mesma a longo prazo.

De acordo com a orientação do fabricante, nas primeiras quatro horas após as aplicações de toxina botulínica na face, os pacientes devem ser orientados a evitar a mímica facial, não manipular a face, não se deitar e evitar abaixar a cabeça, bem como não realizar atividades físicas no dia da aplicação. Estes cuidados foram tomados porque são descritos casos em que a toxina difundiu para os músculos que não deveriam ser motivo de tratamento, levando a resultados desarmônicos, assimetrias e outras complicações⁹³. Benedetto¹² referiu cuidados similares, porém orientava os pacientes a realizar exercícios na musculatura facial nas primeiras 3 a 4 horas após as aplicações, porque, segundo o mesmo, a toxina se ligaria seletivamente a terminações nervosas de músculos em atividade. Fagien¹¹⁸,

ao contrário do observado na literatura, não orientava os pacientes a se manterem em posição vertical, bem como não realizar exercícios físicos no dia da aplicação, evidenciando não haver consenso quanto aos cuidados imediatos após as aplicações.

Na avaliação das rugas estáticas da região frontal, verificou-se, segundo escala utilizada, que houve amenização das rugas em 62,5% (N = 45) dos pacientes, e em 37,5% (N = 27) estas se mantiveram inalteradas após as aplicações seriadas. Não foram observados casos de acentuação das rugas estáticas da região frontal.

Na avaliação das rugas estáticas da região glabellar, verificou-se que houve amenização das rugas em 47,2% (N = 34) dos pacientes, e em 50% (N = 36) estas se mantiveram inalteradas após as aplicações seriadas. Observou-se pouca acentuação em 2,8% (N = 2) dos pacientes. Não foram observados casos de muita acentuação das rugas estáticas da região glabellar.

Na avaliação das rugas dinâmicas da região frontal, verificou-se que houve amenização das rugas em 84,7% (N = 61) dos pacientes, e em 15,3% (N = 11) estas se mantiveram inalteradas após as aplicações seriadas. Não foram observados casos de acentuação das rugas dinâmicas da região frontal.

Na avaliação das rugas dinâmicas da região glabellar, decorrentes da contração dos músculos corrugadores, verificou-se que houve amenização das rugas em 63,9% (N = 46) dos pacientes, e em 26,4% (N = 19) estas se mantiveram inalteradas após as aplicações seriadas. Observou-se pouca acentuação em 9,7% (N = 7) dos pacientes. Não foram observados casos de muita acentuação das rugas dinâmicas da região glabellar.

Na avaliação das rugas dinâmicas da região glabelar, decorrentes da contração do músculo prócero, verificou-se que houve amenização das rugas em 57% (N = 41) dos pacientes, e em 32% (N = 23) estas se mantiveram inalteradas após as aplicações seriadas. Observou-se pouca acentuação em 11% (N = 8) dos pacientes. Não foram observados casos de muita acentuação das rugas dinâmicas da região glabelar.

A Análise de Concordância de Kappa demonstrou que a concordância entre os médicos avaliadores foi considerada de “mínima” a “regular”, porém isto não foi considerado importante pelo estatístico, nem obstáculo à análise dos resultados do presente estudo. Isto ocorre por alguns fatores, como o fato de que os médicos avaliadores não foram previamente treinados para a execução deste tipo de avaliação, o número de variáveis ser grande e qualquer alteração refletir na concordância. Por outro lado, a avaliação das rugas foi considerada subjetiva, o que justificava a realização da avaliação por três médicos que não faziam parte do estudo, na tentativa de minimizar a subjetividade e diminuir a possibilidade de erro.

Estudos com realização de biópsia muscular em pacientes submetidos a múltiplas aplicações de toxina botulínica para o tratamento de blefaroespasmos⁶¹ demonstraram que o padrão de recuperação da transmissão neuromuscular após múltiplas aplicações é complexo e, até o presente momento desconhecido.

Não foram também realizados estudos que demonstrem as alterações da dinâmica da musculatura facial após aplicações seriadas de toxina botulínica tipo A com finalidade estética. Desta forma, este

estudo é fundamental para os profissionais cirurgiões plásticos que atuam nesta área.

Estudos prospectivos de acompanhamento mais tardio, e avaliação dinâmica através de filmes, bem como a realização de biópsias nos músculos envolvidos, estão sendo objeto de pesquisa em nosso Serviço.

6. CONCLUSÕES

A análise retrospectiva das pacientes submetidas a múltiplas aplicações de toxina botulínica tipo A com finalidade estética demonstrou que:

1. No longo prazo, existe maior porcentagem de pacientes com amenização ou aspecto inalterado das rugas estáticas e dinâmicas das regiões frontal e glabellar da face em relação a pacientes com acentuação das mesmas.
2. Não houve variação estatisticamente significativa das médias dos intervalos entre as aplicações.
3. A dose total de toxina botulínica aumentou de forma estatisticamente significativa até a terceira aplicação, mantendo-se sem variação significativa a partir de então.

7. ANEXOS

ANEXO 1 – Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa **DIRETORIA CLÍNICA****Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa****APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 14.07.04, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **510/04**, intitulado: "Avaliação crítica de múltiplas aplicações de toxina botulínica tipo A no terço superior da face com finalidade estética" apresentado pelo Departamento de **CIRURGIA**.

Pesquisador(a) Responsável: **Prof. Dr. Marcus Castro Ferreira**

Pesquisador(a) Executante: **Dr. Rodrigo Pinto Gimenez**

CAPPesq, 14 de Julho de 2004.

ciência

P. DR. MARCUS CASTRO FERREIRA
Professor Titular de Disciplina
de Cirurgia Plástica - R-1058

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

ASS.
RECEBIDO SPG
20/07/04

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")

ANEXO 2 – Termo de consentimento informado

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA
AMBULATÓRIO DE MEDICINA ESTÉTICA E LASER

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

(Resolução número 01 de 13 / 06 / 88 – CNS)

Através do presente termo, eu _____ , RG _____ , autorizo o tratamento de rugas da face com toxina botulínica (Botox®), proposto pela equipe da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade de São Paulo.

Fui informado(a) quanto às limitações dos resultados que o tratamento pode oferecer, inclusive que os processos biológicos tais como duração do efeito da droga, cicatrização, inflamação, reparação tecidual, absorção, não podem ser totalmente controlados pela Medicina atual. Estou ciente da possível ocorrência de complicações inerentes aos procedimentos como inchaço ou hematoma no local da aplicação, que independem da habilidade, perícia, prudência e diligência da equipe médica.

Autorizo a realização de investigações clínicas, procedimentos cirúrgicos e anestésicos que se fizerem necessários no processo de diagnóstico e tratamento, consciente de que a equipe médica atuará dentro de limites instituídos no Código de Ética Médica.

Autorizo também, o uso de minha imagem (vídeo, fotografias) para divulgação em eventos científicos, publicações e informes (inclusive internet) nas áreas médica e paramédica, em data oportuna.

Atesto que li ou leram para mim o conteúdo deste termo. Entendo que há riscos envolvidos neste procedimento. Tive oportunidade de esclarecer dúvidas eventuais existentes e obtive as respostas necessárias.

Paciente ou responsável legal:

Nome: _____

Assinatura: _____

Testemunhas:

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

Data : ____ / ____ / ____ .

ANEXO 3 – Anamnese

Paciente número: _____ Nome: _____

HMA: _____

Utiliza medicamentos: () Não () Sim (Aminoglicosídeos, Espectinomicina, Bloqueadores de canal de cálcio, D-Penicilamida, Quinina, Outros _____)

Alergias: () Não () Sim _____

Hipersensibilidade à albumina humana: () Não () Sim

Gestante ou em fase de amamentação: () Não () Sim _____

Portador de patologias neuro-musculares (Miastenia gravis, Síndrome de Eaton-Lambert): () Não () Sim _____

Sinais inflamatórios e/ou infecciosos no local de aplicação: () Não () Sim

Expectativa realista quanto ao procedimento: () Não () Sim

Aplicações prévias de toxina botulínica: () Não () Sim _____

Paralisia facial prévia ou em vigência: () Não () Sim _____

Assimetrias faciais: () Não () Sim (Muscular; Óssea; Outros _____)

Trauma facial prévio com lesão neurológica: () Não () Sim _____

OBSERVAÇÕES:

ANEXO 4 – Folha de Aplicação

Nº: ____ Nome: _____

Data: ____ / ____ / ____

Aplicação número: _____

Documentação fotográfica pré aplicação:

POSIÇÃO	CHECAGEM
Frente em repouso	
Frente elevando sobrancelhas	
Frente franzindo as sobrancelhas	
Frente franzindo o nariz / sorrindo	

Plano de Aplicação:

Dose por grupos musculares tratados e número de pontos:

GRUPO MÚSCULAR	NÚMERO DE PONTOS (Bilat)	DOSE / PONTO	DOSE TOTAL (Bilateral)
Frontal			
Corrugadores			
Prócerus			
Orbiculares dos olhos			
Outros			

Dose total utilizada: _____ u

Intercorrências durante a aplicação: () Não () Sim _____

ANEXO 5 - Avaliação Médica

Médico avaliador: _____ .

Nº: _____ Paciente: _____ Data: ____ / ____ / ____ .

Visualizando-se o par de imagens correspondente, assinalar com um “X” a opção que melhor define sua análise quanto à presença de rugas comparando a imagem da direita em relação à da esquerda.

A – Face, posição de frente, em repouso:

	Muita Amenização	Pouca Amenização	Inalterado	Pouca acentuação	Muita acentuação
Rugas frontais					
Rugas glabellares					

B – Face, posição de frente, solicitando o movimento de elevação das sobrancelhas:

Visualizando-se o par de imagens correspondente, assinalar com um “X” a opção que melhor define sua análise quanto à presença de rugas comparando a imagem da direita em relação à da esquerda.

	Muita Amenização	Pouca Amenização	Inalterado	Pouca acentuação	Muita acentuação
Rugas frontais					

C - Face, posição de frente, solicitando o movimento de franzir as sobrancelhas:

Visualizando-se o par de imagens correspondente, assinalar com um “X” a opção que melhor define sua análise quanto à presença de rugas comparando a imagem da direita em relação à da esquerda.

	Muita Amenização	Pouca Amenização	Inalterado	Pouca acentuação	Muita acentuação
Rugas glabellares					

D - Face, posição de frente, solicitando o movimento de franzir o nariz:

Visualizando-se o par de imagens correspondente, assinalar com um “X” a opção que melhor define sua análise quanto à presença de rugas comparando a imagem da direita em relação à da esquerda.

	Muita Amenização	Pouca Amenização	Inalterado	Pouca acentuação	Muita acentuação
Rugas glabellares					

ANEXO 6 - Tabela

Tabela de p-valores referentes ao resultado da avaliação das rugas faciais realizada pelos médicos avaliadores.

Resposta		Muita amenização	Pouca amenização	inalterado	Pouca acentuação
Rugas estáticas da região frontal	Pouca amenização	<0,001	---	---	---
	Inalterado	<0,001	0,171	---	---
	Pouca acentuação	0,007	<0,001	<0,001	---
	Muita acentuação	---	---	---	---
Rugas estáticas da região glabellar	Pouca amenização	0,101	---	---	---
	Inalterado	<0,001	0,041	---	---
	Pouca acentuação	0,003	<0,001	<0,001	---
	Muita acentuação	---	---	---	---
Rugas dinâmicas da região frontal	Pouca amenização	0,113	----	---	---
	Inalterado	<0,001	<0,001	---	---
	Pouca acentuação	<0,001	<0,001	0,004	---
	Muita acentuação	---	---	---	---
Rugas dinâmicas da região glabellar (corrugadores)	Pouca amenização	0,002	---	---	---
	Inalterado	0,271	0,042	---	---
	Pouca acentuação	0,289	<0,001	0,034	---
	Muita acentuação	---	---	---	---
Rugas dinâmicas da região glabellar (prócero)	Pouca amenização	0,006	---	---	---
	Inalterado	0,042	0,363	---	---
	Pouca acentuação	0,438	<0,001	0,009	---
	Muita acentuação	---	---	---	---

Nota1: Valores na cor vermelha são significantes.

Nota2: Não houve casos de muita acentuação de rugas.

8. REFERÊNCIAS

1. Maio MD. *Aplicação do laser de CO2 ou Er-YAG em rugas faciais, estudo comparativo* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1999.
2. Ekman P. Facial expression of emotions: new findings, new questions. *Psychol Sci.* 1992;3:34-8.
3. Khan JA. Aesthetic surgery: diagnosis and healing the miscues of human facial expression. *Ophthal Plast Reconst Surg* 2001;17:4-6.
4. Finn JC, Cox SE, Earl ML. Social implications of hyperfunctional facial lines. *Dermatol Surg.* 2003;29:450-5.
5. Wheeler AH. Botulinum toxin injection techniques for treatment of headaches. *Aesthetic Surg J.* 2002;22:65-8.
6. American Society for Aesthetic Plastic Surgery 2000 statistics on cosmetic surgery. [on line] p4. Available from: <http://www.surgery.org/home.asp>
7. 13th Congress of European Academy of Dermatology and Venereology; 2004; Florence, Italy.
8. Danrose JF, Goldman SN, Groessl EJ, Orloff LA. The impact of long-term botulinum toxin injections on symptom severity in patients with spasmodic dysphonia. *J Voice.* 2004;18:415-22.
9. Boni R, Kreiden OP, Burg G. Revival of the use of botulinum toxin: application in Dermatology. *Dermatology.* 2000;200:287-91.

10. Cecchini E, Ayala SEG, Coscina AL, Neto GSC, Ferrareto AMC. Botulismo. In: Veronesi R, Focaccia R, editores. *Tratado de infectologia*. São Paulo: Atheneu; 1996. p. 565-74.
11. Kempner W. Further contributions to the knowledge of meat poisoning: the antitoxin to botulism. *Z Hyg Infekt Krankh*. 1897;26:481-500.
12. Benedetto AV. The cosmetic use of Botulinum toxin type A. *Int J Dermatol*. 1999;38:641-55.
13. Schantz EJ, Johnson EA. Botulinum toxin: the story of its development for the treatment of human disease. *Perspect Biol Med*. 1997;40:317-27.
14. Burgen ASV, Dickens F, Zatman LJ. The action of botulinum toxin on the neuro-muscular junction. *Physiol*. 1949;109:10-24.
15. Schantz EJ, Johnson EA. Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. *Microbiol Rev*. 1992;56:80-99.
16. Sakaguchi G, Ohishi I, Kosaki S. Purification and oral toxicities of Clostridium botulinum progenitor toxins. In: Lewis GE, editor. *Biomedical aspects of botulism*. New York, Academic Press; 1981, p. 21-34.
17. Scott AB, Rosenbaum A, Collins CC. Pharmacologic weakening of extraocular muscles. *Invest Ophthalmol*. 1973;12:924-7.
18. Scott AB. Botulinum toxin injection into extraocular muscles as alternative to strabismus surgery. *Ophthalmol*. 1980;87:1044-9.
19. Carruthers A, Carruthers J. The treatment of glabellar furrows with botulinum A toxin. *J Dermatol Surg Oncol*. 1990;16:83.
20. Carruthers A, Carruthers J. Treatment of glabellar frown lines with C. botulinum: a exotoxin. *J Dermatol Surg Oncol*. 1992;18:17-21.

21. Borodic GE, Cheney M, McKenna, M. Contralateral injections of botulinum A toxin for the treatment of hemifacial spasm to achieve increase facial symmetry. *Plast Reconstr Surg*. 1992;90:972-9.
22. Carruthers A, Carruthers J. The use of botulinum toxin to treat glabella frown lines and other acial wrinkles. *Cosmet Dermatol*. 1994;7:11-5.
23. Carruthers A, Carruthers J. Botulinum toxin A: history and current use in the upper face. *Semin Cutan Med Surg*. 2001;20:71-84.
24. Borodic GE, Johnson E, Goodnough M, Schantz E. Botulinum toxin therapy, immunologic resistance and problems with available materials. *Neurology*. 1996;46:26-9.
25. Glenn DE, Buroyne RD. Botulinum neurotoxin light chains inhibit both Ca^{2+} -induced and CTP analogue-induced catecholamine release from permeabilised adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett*. 1996;386:137-40.
26. Dolly JO. Biochemistry of acetylcholine receptors from skeletal muscle. In: Tripton KF, editor. *Int Rev Biochem. (Physiol. Pharmacol. Biochem.)*. Baltimore, University Park Press; 1979. Cap. 26, p. 257-309.
27. Bloij LH. Neuromuscular transmission and its pharmacological blockade. Part 1: neuromuscular transmission and general aspects of its blockade. *Pharm World Sci*. 1997;19:1-12.
28. Martin AR. Principles of neuromuscular transmission. *Hosp Pract*. 1992;27:147-58.
29. Sudhof TC. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*. 1995;375:645-53.

30. Shone CC. Clostridium botulinum neurotoxins, their structures and modes of action. In: Watson ED, editor. *Natural toxicants in foods*. Chichester: Ellis Harwood; 1986. p. 11-57.
31. Coffield JA, Bakry N, Zhang RD, Carlson J, Gomella LG, Simpson LL. In: Vitro characterization of botulinum toxin types A, C and D action on human tissues: combined eletrophysiologic, pharmacologic and molecular biologic approaches. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;280:1489-98.
32. Huang W, Foster JA, Rogachefsky AS. Pharmacology of botulinum toxin. *J Am Acad Dermatol*. 2000;43:249-59.
33. Shone CC, Tranter HS. Growth of clostridia and preparation of their neurotoxins. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1995;195:143-60.
34. Sharma SK, Singh BR. Hemagglutinin binding mediated protection of botulinum neurotoxin from proteolysis. *J Nat Toxins*. 1998;7:239-53.
35. Tsui JK. Botulinum toxin as a therapeutic agent. *Pharmacol Ther*. 1996;72:13-24.
36. Hanson MA, Stevens RC. Structural view of botulinum neurotoxin in functional states. In: Brin MF, Jankovic J, Halett M, editors. *Scientific and therapeutic aspects of botulinum toxin*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. Cap. 11, p. 11-27.
37. Rossetto O, Seveso M, Caccin P, Schiavo G, Montecucco C. Tetanus and botulinum neurotoxins: turning bad guys into goog by research. *Toxicon*. 2001;39:27-41.

38. Dolly JO, Black JD, Williams RS, Melling J. Acceptors for botulinum neurotoxin reside on motor nerve terminals and mediate its internalization. *Nature*. 1984;307:457-60.
39. Hatheway CL, Ferreira JL. Detection and identification of *Clostridium botulinum* neurotoxins. *Adv Exp Med Biol*. 1996;391:481-98.
40. Wictome M, Shone CC. Botulinum neurotoxins: mode of action and detection. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*. 1998;27:87S-97S.
41. Cornille F, Goudreau N, Ficheux D, Niemann H, Roques BP. Solid-phase synthesis, conformational analysis and in vitro cleavage of synthetic human synaptobrevin II 1-93 by tetanus toxin L chain. *Eur J Biochem*. 1994;222:173-81.
42. Schantz EJ, Scott AB. Use of crystalline type A botulinum toxin in medical research. In: Lewis GE, editor. *Biomedical aspects of botulinum*. New York: Academic Press; 1981. p.143-50.
43. Schantz EJ, Kautter DA. Standardized assay for *Clostridium Botulinum* toxins. *J Assoc Anal Chem*. 1978;61:96-9.
44. Hatheway CL. Toxigenic clostridia. *Clin Microbiol Rev*. 1990;3:66-98.
45. Montecucco C, Schiavo G. Structure and function of botulinum neurotoxins. *Quart Rev Biophys*. 1995;28: 423-72.
46. Meunier FA, Lisk G, Sesardic D, Dolly JO. Dynamics of nerve terminal remodeling unveiled using SNARE-cleaving botulinum toxins: the extend and duration are dictated by the sites of SNAP-25 truncation. *Mol Cell Neurosci*. 2003; 22:454-66.

47. McMahon HT, Foran P, Dolly JO, Verhage M, Wiegant VM, Nicholls DG. Tetanus and botulinum toxin type a and b inhibit glutamate, GABA, aspartate and met-enkephalin release from synaptosomes: clues to the locus of action. *J Biol Chem*. 1992;267:21338-343.
48. Niemann H. Molecular biology of clostridial neurotoxins. In: Alouf JH, Freer JH, editors. *A Sourcebook of bacterial protein toxins*. London: Academic Press; 1991.p.303-48.
49. Simpson II. Molecular pharmacology of botulinum toxin and tetanus toxin. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1986;26:427-53.
50. Black JD, Dolly JO. Interaction of ¹²⁵i-labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. I: ultrastructural autoradiographic localization and quantitation of distinct membrane acceptors for types A and B on motor nerves. *J Cell Biol*. 1986;103:521-34.
51. Li L, Singh BR. Isolation of synaptotagmin as a receptor for types A and E botulinum neurotoxins and analysis of their comparative binding using a new microtiter plate assay. *J Nat Toxins*. 1998;7:215-26.
52. Brin MF. The pharmacology of botulinum toxin. *Muscle Nerve Suppl*. 1997;6:S146-S68.
53. Hughes R, Whaler BC. Influence of nerve-ending activity and of drugs on the rate of paralysis of rat diaphragm preparations by *Cl. botulinum* type A toxin. *J Physiol* .1962;160:221-3.
54. Nathan P, Dimitrijevic MR, Sherwood AM. Reflex path length and clonus frequency [letter]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1985;48:725.

55. Montecucco C, Schiavo G, Tugnoli V, De Grandis D. Botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic applications. *Mol Med Today*. 1996;2:418-24.
56. Dolly JO. Therapeutic and research exploitation of botulinum neurotoxins. *Eur J Neurol*. 1997;4(suppl.2):S5-S10.
57. Eleopra R, Tugnoli V, Rosseto O, De Grandis D, Montecucco C. Different time courses of recovery after poisoning with botulinum neurotoxin serotypes A and E in humans. *Neurosci. Lett*. 1998;256:135-38.
58. Dolly JO. Synaptic transmission: Inhibition of neurotransmitter release by botulinum toxins. *Headache*. 2003;43(suppl.1):S16-S24.
59. Jurasinski CV, Lieth E, An DD, Schengrund CL. Correlation of cleavage of SNAP-25 with muscle function in a rat model of botulinum neurotoxin type A induced paralysis. *Toxicon*. 2001;39:1309-15.
60. Sanders DB, Massey W, Buckley EG. Botulinum toxin for blepharospasm: Single-fiber EMG studies. *Neurology*. 1986;36:545.
61. De Paiva A, Meunier FA, Molgo J, Naoki R, Dolly JO. Functional repair of motor endplates after botulinum toxin-A poisoning: bi-phasic switch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 1999;96:3200-5.
62. Foran PG, Mohammed N, Lawrence, GW. Evaluation of the therapeutic usefulness of botulinumneurotoxin B, C1, E & F compared to the long-lasting type A: basis for distinct durations of inhibition of exocytosis in central neurons. *J Biol Chem*. 2003;278:1363-71.
63. Brown MC, Holland RL, Hopkins WG. Motor nerve sprouting. *Annu Rev Neurosci*. 1981;4:17-42.

64. Humeau Y, Doussau F, Grant NJ, Poulain B. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. *Biochimie*. 2000;39:2399.
65. Wang YC, Burr DC, Korthals GJ, Sugiyama H. Acute toxicity of aminoglycoside antibiotics as an aid in detecting botulism. *J Appl Environ Microbiol*. 1984;48:951-5.
66. Yamada S, Kuno Y, Iwanaga H. Effects of aminoglycoside antibiotics on the neuromuscular junction: Part. I. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*. 1986;24:130-8.
67. Simpson LL. The interaction between aminoquinolines and presynaptically acting neurotoxins. *J Pharmacol Exp Ther*. 1982;222:43-8.
68. Fassi A, Sangalli F, Colombi F, Perico N, Remuzzi A. Beneficial effects of calcium channel blockade on acute glomerular hemodynamic changes induced by cyclosporine. *Am J Kidney Dis*. 1999;33:267-75.
69. Tzartos SJ, Morel E, Efthimiadis A, Bustarret AT, D'Anglejan J, Drossos AA. Fine antigenic specificities of antibodies in sera from patients with D-penicillamide-induced myasthenia gravis. *Clin Exp Immunol*. 1988;74:80-6.
70. Walts LF. Neuromuscular blocking drugs. *Otolaringol Clin North Am*. 1981;14:501-13.
71. Rohrich RJ, Janis JE, Fagien S, Stuzin JM. The cosmetic use of botulinum toxin. *Plast Reconstr Surg*. 2003;112:177S-87S.
72. Borodic GE, Cozzolino D, Fay L, Joseph M, Ferrante R. Botulinum A toxin for treatment of spasmodic torticollis: dysphagia and regional toxin spread. *Head Neck*. 1990;12:392-8.

73. Tamura BM, Odo MY, Chang B, Cucé LC, Flynn TC. Treatment of nasal wrinkles with botulinum toxin. *Dermatol Surg.* 2005;31:271-5.
74. Sommer B, Sattler G. *Botulinum Toxin in Aesthetic Medicine*. Vienna: Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin; 2001. p. 30-55: Cosmetic indications according to anatomic region.
75. Brandt FS, Bellman B. Cosmetic use of botulinum A exotoxin for the aging neck. *Dermatol Surg.* 1998;24:1232-4.
76. Maio MD. *Uso da toxina botulínica em doentes com hipercinesia muscular facial cantralateral à paralisia facial [tese]*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.
77. Salles AG. *Avaliação do efeito da toxina botulínica no lado são em pacientes com paralisia facial de longa duração [tese]*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.
78. Becker-Wegerich P, Rauch L, Ruzicka T. Botulinum toxin A in the therapy of mimic facial lines. *Clin Exp Dermatol.* 2001;26(7):619-30.
79. Gimenez R, Isaac C, Ruiz R. Breast wrinkles. In: Hexsel D, Almeida AT, editors. *Cosmetic Use of Botulinum Toxin*. Porto Alegre: AGE; 2002. p.178-81.
80. Goldman A. Treatment of axillary and Palmar Hyperhidrosis with Botulinum Toxin. *Aesth Plast Surg.* 2000;24:280-2.
81. Fugita M, Mann T, Mann O, Berg D. Surgical pearl: use of nerve blocks for botulinum toxin treatment of palmar-plantar hyperhidrosis. *J Am Acad Dermatol.* 2001;45(4):587-9.

82. Almeida AT. Treatment of masseteric hypertrophy. In: Hexsel D, Almeida AT, editors. *Cosmetic Use of Botulinum Toxin*. Porto Alegre: AGE; 2002. p.185-6.
83. Vincent A, Lang B, Newsom-Davis J. Autoimmunity to the voltage-gated calcium channel underlies the Lambert-Eaton syndrome, a paraneoplastic disorder. *Trends Neurosci*. 1989;12:496-502.
84. Sommer B, Sattler G. *Botulinum Toxin in Aesthetic Medicine*. Vienna: Blackwell Wissenschafts-Verlag; 2001. p.8-29: Fundamental principles.
85. Goss CM. *Gray Anatomia*. 29^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1988. Cap. 6, p.311-5: Músculos e fáscias.
86. Wieder JM, Moy RL. Understanding botulinum toxin: surgical anatomy of the frown, forehead, and periocular region. *Dermatol Surg*. 1998;24:1172-4.
87. Knize DM. Muscles that act on glabellar skin: a closer look. *Plast Reconstr Surg*. 2000;105(1):350-61.
88. Kautter DA, Solomon HM. Collaborative study of a method for the detection of *Clostridium botulinum* and its toxins in foods. *J Assoc Anal Chem*. 1976;60:541-5.
89. Scott AB, Suzuki D. Systemic toxicity of botulinum toxin by intramuscular injection in the monkey. *Mov Disord*. 1988;3:333-5.
90. Carruthers A, Carruthers J. Clinical indications and injection technique for the cosmetic use of botulinum exotoxin. *Dermatol Surg*. 1998;24:1189-94.

91. Keen M, Blitzler A, Aviv J. Botulinum toxin A fo hypercinetic facial lines: results of a duple-blind, placebo-controlled study. *Plast Reconstr Surg.* 1994;94:94-9.
92. Garcia A, Fulton E. Cosmetic denervation of the muscles of facial expression with botulinum toxin. *Dermatol Surg.* 1996;22:39-43.
93. Ferreira MC, Salles AG, Gimenez RP, Soares MFD. Complications with the use of botulinum toxin type A in facial rejuvenation: report of 8 cases. *Aesth Plast Surg.* 2004;28:441-4.
94. Lange DJ, Brin MF, Fahn S. Distant effects of locally injected botulinum toxin: incidence and course. In: Fahn S, et al, editors. *Adv Neurol.* 1988;50:609-13.
95. Aoki KR. Pharmacology and immunology of botulinum toxin serotypes. *J Neurol.* 2001;248:1-10.
96. Goschel H, Wohlfarth K, Frevert J. Botulinum A toxin therapy. Neutralizing and nonneutralizing antibodies: therapeutic consequences. *Exp Neurol.* 1997;147: 96.
97. Sposito MMM. immunogenicity. In: Hexsel D, Almeida AT, editors. *Cosmetic use of botulinum toxin.* Porto Alegre: AGE; 2002. p.75-6.
98. Biglan AW, Gonnering R, Lockhart LB, Rabin B, Fuerste FH. Absence of antibody production in patients treated with botulinum A toxin. *Am J Ophthalmol.* 1986;101:232-5.
99. Borodic GE, Pearre LB, Smith KL, Phelau AT, FerranteR. Botulinum B toxin as an alternative to botulinum A toxin: histological study. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 1995;9:182-90.

100. Jankovic J, Schwartz K. Response and immunoresistance to botulinum toxin injections. *Neurology*. 1995;45(9):1743-6.
101. Matarasso SL. Complications of botulinum A exotoxin for hyperfunctional lines. *Dermatol Surg*. 1998; 24:1249.
102. Sankhla C, Jankovic J, Duane D. Variability of the immunologic and clinical response in dystonic patients immunoresistant to botulinum toxin injections. *Mov Disord*. 1998;13(1):150-4.
103. Schantz EJ, Johnson EA. *Botulinum and Tetanus Neurotoxins: neurotransmission and biomedical aspects*. New York: Olenum Press; 1993. p.657-9: Quality of botulinum toxin for human treatment.
104. Osako M, Keltner JL. Botulinum A toxin (oculinum) in ophthalmology. *Survey Ophthalmol*. 1991;36:28.
105. Bardosi A, Goebel HH, Stennert E. The ultrastructure of normal and denervated human facial muscle. *Plast Reconstr Surg*. 1987;79:171-6.
106. Borodic GE, Ferrante RJ, Pearce LB. Pharmacology and histology of the therapeutic application of botulinum toxin. In: Jankovic, J, Hallet, M. *Therapy with botulinum toxin*. New York: Marcel Dekker; 1994. p.119-57.
107. Harris CP, Alderson K, Nebeker J, Holds JB, ARL. Histologic features of human orbicularis oculi treated with botulinum A toxin. *Arch Ophthalmol*. 1991;109:393-5.
108. Holds, JB, Alderson K, Fogg SG, Anderson RL. Motor nerve sprouting in human orbicularis muscle after botulinum A injection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1990;31:964-7.

109. Hassan SM, Jennekens FG, Wieneke G, Veldman H. Elimination of superfluous neuromuscular junctions in rat calf muscles recovering from botulinum toxin-induced paralysis. *Muscle Nerve*. 1994;17:623-31.
110. Klein AW. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*. 2001;20:69-70.
111. Hexsel D, Zechmeister D, Hexsel CL. Perspectives. In: Hexsel D, Almeida AT, editors. *Cosmetic use of botulinum toxin*. Porto Alegre: AGE; 2002. p.32-4.
112. Huang W, Huang-Shaio L. Detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin type A using imunno-PCR. *Letters Appl Microbiol*. 2001;32:321.
113. Katz SI. Dermatological research in the new millennium. *Clin Dermatol*. 2001;19:51-3.
114. Carruthers J, Fagien S, Matarasso SL, Botox Consensus Group. Introduction to the Consensus Recommendations. *Plast Reconstr Surg*. 2004;114(6):i-iii.
115. Ahn KY, Park MY, Park DH, Han DG. Botulinum toxin A treatment of facial hyperkinetic wrinkle lines in koreans. *Plast Reconstr Surg*. 2000;105(2):778-84.
116. Hankins CL, Strimling R, Rogers GS. Botulinum A toxin for glabellar wrinkles. *Dermatol Surg*. 1998;24:1181-3.
117. Fulton JE. Botulinum toxin: the Newport Beach experience. *Dermatol Surg*. 1998;24:1219-24.
118. Fagien S. Botox for the treatment of dynamic and hyperkinetic facial lines and furrows: adjunctive use in facial aesthetic surgery. *Plast Reconstr Surg*. 1998;103:701-13.

119. Guyer BM. Some unresolved issues with botulinum toxin. *J Neurol.* 2001;248 [Suppl 1]:I/11-I/13.
120. Mclellan K, Gaines Das RE, Ekong TAN, Sesardic D. Therapeutic botulinum type A toxin: factors affecting potency. *Toxicon.* 1996;34(9):975-85.
121. Frankel AS, Kamer FM. Chemical browlift. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998;124(3):321-3.
122. Critchfield J. Considering the immune response to botulinum toxin. *Clin J Pain.* 2002;18(6):S133-41.