

Botox[®]: Aplicação Biotecnológica da Toxina Botulínica

Isabella Di Piazza¹; Letícia Medeiros Marostega²; Thaíssa Giovanna Valverde Campos³

1. Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF-USP) - isbelladipiazza@usp.br
2. Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF-USP) - leticiamarostega@usp.br
3. Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF-USP) - thata_giovanna@usp.br

Resumo

Clostridium botulinum refere-se a um grupo de bactérias positivas, anaeróbias, em formato de bacilo, que produzem esporos. A principal característica delas é a produção da toxina botulínica, uma neurotoxina capaz de causar o botulismo, levando a paralisia descendente e até óbito. Após alguns casos de intoxicação alimentar em 1817, ocorreu o primeiro registro desta toxina, cujo isolamento e purificação levaram à sua aplicação biotecnológica nas áreas de saúde e estética. Botox[®] é o nome registrado pela empresa Allergan, referente à toxina botulínica tipo A, a qual é introduzida no organismo humano. Atualmente, dentre as diversas aplicações do Botox[®], está o tratamento de estrabismo, bruxismo, hiperidrose, distonias e tremores, além de correções estéticas relacionadas a rugas e marcas de expressão. Há efeitos adversos relacionados ao uso da toxina botulínica tipo A, ocorrendo desde mais leves (como hematomas, dores locais, infecções etc.) a raros e mais graves (por exemplo, botulismo, anafilaxia sistêmica e até morte). Além disso, existem contraindicações para o uso do Botox[®], sendo algumas delas: gravidez, amamentação e alergias à toxina.

Palavras-chave: toxina botulínica, *Clostridium botulinum*, neurotoxina, Botox[®], aplicações do Botox[®]

Botox[®]: Aplicação Biotecnológica da Toxina Botulínica

Introdução

A bactéria *Clostridium botulinum* é a principal espécie responsável pela produção da toxina botulínica, causadora do botulismo (doença neuromuscular), sendo esta a toxina de maior efeito potencialmente tóxico conhecida atualmente.^[1] Ela pode causar paralisia descendente (que se inicia no cérebro e encaminha-se para os membros inferiores), disfagia (dificuldade para engolir), fadiga e cansaço, entre outros;^[2] porém, desde a década de 1960, as aplicações da toxina botulínica (mais especificamente, do tipo A) vêm se expandindo para tratar certas disfunções musculares e na área da estética.^[3]

Desta forma, essa revisão tem como objetivo abordar com mais detalhes informações sobre *C. botulinum*, o mecanismo de ação da neurotoxina botulínica e as aplicações e efeitos adversos do Botox[®].

Bactéria produtora da neurotoxina botulínica

Clostridium é um gênero fenotipicamente e filogeneticamente diverso composto por mais de 100 espécies com características em comum, as quais incluem a formação de endósporos resistentes a químicos e ao calor, parede celular gram positiva nas células em fase vegetativa, metabolismo fermentativo e anaeróbico e, ainda, baixo conteúdo G+C (guanina+citosina), de 26 a 33% em espécies toxigênicas.^[4] Pensando na bactéria *Clostridium botulinum*, por sua vez, trata-se da designação dada ao grupo de bactérias gram-positivas,

anaeróbias, em formato de bastão (bacilo, Figura 1) e formadoras de esporos que produz a toxina botulínica, a ser caracterizada a seguir.^[5] Uma característica importante dessa bactéria é a formação dos esporos, os quais são capazes de sobreviver por longos períodos no ar ou podem germinar na presença de oxigênio, enquanto as células vegetativas são sensíveis a esse composto e morrem gradualmente.^[6]

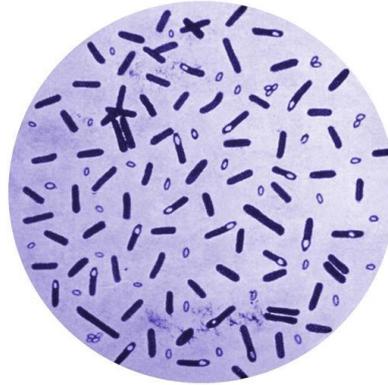


Figura 1: *Clostridium botulinum*

Fonte: Domínio público (PHIL-CDC)^[7]

Sabe-se que a espécie *C. botulinum* é heterogênea, dividida em quatro grupos filogenéticos distintos, de acordo com a sua capacidade de produzir a neurotoxina botulínica; desta forma, há distinções entre os Grupos *C. botulinum* I a IV que geram quatro espécies distintas, mesmo que a identificação seja mantida pela importância da habilidade de formação desta toxina. Interessantemente, em todos esses grupos há descrição de organismos não neurotoxigênicos, mas filogeneticamente equivalentes, e linhagens de *C. baratii* e *C. butyricum* também já foram descritas como produtoras da toxina botulínica (sendo indistinguíveis das demais linhagens típicas além desta produção), formando a neurotoxina tipo F e tipo E, respectivamente, sendo ambas bactérias mesófilas.^[1,6] De maneira geral, os Grupos I e II (*C. botulinum* proteolítico e não-proteolítico, respectivamente) geram a maioria dos casos de botulismo em humanos.^[1] Quanto aos Grupos, o quadro abaixo (Quadro 1) apresenta algumas de suas principais características.

Quadro 1: Grupos de *Clostridium botulinum*.

Grupos	Características ^a
Grupo I (<i>C. botulinum</i> proteolítico)	Mesófilo que forma esporos de elevada resistência ao calor e as linhagens produzem uma ou duas neurotoxinas do tipo A, B ou F. Muitos dos casos de botulismo em regiões como EUA, América do Sul e China, estão associados a esse grupo.
Grupo II (<i>C. botulinum</i> não-proteolítico^b)	Psicrotrófico que forma esporos de resistência moderada ao calor e as linhagens deste grupo formam uma única neurotoxina do tipo B, E ou F. <i>C. botulinum</i> não-proteolítico do tipo B e E são frequentes em casos de botulismo alimentar.
Grupo III	Mesófilo que forma neurotoxinas do tipo C e D.

Grupo IV	Mesófilo que forma neurotoxina do tipo G.
-----------------	---

Fonte: Autoria própria.

^a informações em [1,6].

^b diferente dos proteolíticos, não são tão resistentes ao calor e em aproximadamente 80°C ocorrem danos subletais pela inativação de enzimas envolvidas na germinação.

Mecanismo de ação da neurotoxina botulínica

As neurotoxinas botulínicas são consideradas as toxinas mais potentes conhecidas, sendo altamente específicas ao seu alvo, elevando a sua periculosidade.^[8] Existem sete toxinas botulínicas conhecidas (tipos A a G), distintas a princípio pela reação de neutralização toxina-antitoxina, já que o anticorpo neutraliza apenas neurotoxinas do mesmo sorotipo; junto a isso, o conhecimento sobre o mecanismo de ação e a composição dos genes que codificam essas neurotoxinas mostraram-se de acordo com a classificação descrita. Porém, apenas através do uso de anticorpos monoclonais e comparações genéticas é possível distinguir diferentes subtipos de cada neurotoxina botulínica.^[1]

Quanto à descrição molecular, a toxina botulínica é, simplificada, uma proteína com três porções distintas (Hc e Hn - compõem a cadeia pesada e são responsáveis, respectivamente, pela ligação com o motoneurônio e pela internalização e translocação da membrana da célula nervosa; e L - cadeia leve, porção catalítica, proteolítica, com íon zinco na cavidade que forma o sítio ativo).^[9,10] Na Figura 2, observa-se uma representação tridimensional da toxina botulínica tipo A, com diversas aplicações a serem discutidas adiante.

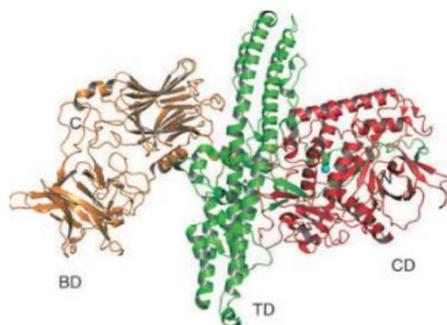


Figura 2: Representação tridimensional da Toxina Botulínica A com seus três domínios: de ligação (BD), de translocação (TD) e catalítico (CD).

Fonte: [10]

O mecanismo de ação da toxina baseia-se na inibição da liberação exocitótica da acetilcolina nos terminais nervosos motores, promovendo a diminuição da contração muscular.^[8] Essa atuação é seletiva no terminal nervoso periférico colinérgico, sem ultrapassar a barreira cerebral e não inibe a liberação de acetilcolina ou demais neurotransmissores neste local. Todo este processo depende das seguintes etapas: difusão, neurotropismo, ligação, internalização e toxicidade intracelular a partir de elevada afinidade com receptores da parede intracelular do terminal pré-sináptico.^[11] De forma geral, o efeito é dado da seguinte forma, considerando como exemplo a neurotoxina botulínica tipo A:

- A neurotoxina liga-se ao terminal da placa motora a partir da cadeia pesada, como mostrado anteriormente, junto a receptores característicos;^[11]
- Há endocitose, promovendo a internalização da neurotoxina, seguida da liberação da cadeia leve (domínio catalítico), o que ocorre em pH baixo;^[11]

- Ocorre a denervação química funcional, diminuindo seletivamente a contração muscular, já que a cadeia leve promove a quebra das proteínas que atuam na fusão das vesículas de acetilcolina com a membrana celular do terminal nervoso, ou seja, inibe a exocitose do neurotransmissor.^[9,12] Essa ação ocorre pela atividade metaloproteásica zinco dependente da cadeia leve.^[8]

Além disso, esse processo gera um influxo de íons cálcio quando a fusão é interrompida, o que reverte parcialmente o efeito da toxina; ainda, há evidências de que, com o tempo (cerca de dois meses) a denervação química gerada estimula a expansão de brotamentos axonais laterais, os quais restauram parcialmente o tônus muscular quando esses brotamentos estabelecem uma conexão sináptica física com a junção neuromuscular.^[9,12] Com o tempo, as proteínas de fusão se restabelecem e ocorre a involução dos brotamentos gerando a recuperação da junção neuromuscular.^[11]

O bloqueio induzido pela toxina botulínica do tipo A varia de semanas a meses, a depender também da condição patológica para a qual foi aplicada, e, ao ser injetada no músculo esquelético, a paresia ocorre entre o segundo e o quinto dia e persiste por dois a três meses, quando ocorre uma recuperação. Ainda, a via metabólica da toxina não está muito bem documentada, podendo ser explicada pela presença de proteases que degradam as cadeias polipeptídicas da toxina e o efeito em si gerado é dado de forma irreversível, mas como as células musculares se renovam ao longo da vida, há uma reversão com o tempo e necessidade de reaplicação; a questão da reversibilidade também depende da dose e da frequência com a qual é realizada.^[11,8]

Sozinhas, as bactérias *C. botulinum* não são danosas, mas podem produzir elevadas quantidades de toxina botulínica quando privadas de oxigênio, como em latas fechadas ou garrafas, solo estagnado ou lama, ou, ocasionalmente, no corpo humano;^[12] assim, além das importantes aplicações biotecnológicas que a neurotoxina pode apresentar, cabe destacar que há possibilidade de intoxicação pelas neurotoxinas botulínicas, principalmente através do consumo de alimentos contaminados (botulismo de origem alimentar - *foodborne botulism*, geralmente pelas toxinas tipo A, B e E), mas também por infecção de uma ferida por esporos da bactéria, os quais germinam e produzem a toxina localmente (botulismo de feridas - *wound botulism*), e em crianças entre 3 semanas a 8 meses de idade que ingerem esporos viáveis da bactéria que germinam e geram a toxina em qualquer local do corpo (botulismo infantil - *infant botulism*, afeta apenas crianças pequenas por não terem resistência imunológica preparada para defendê-las).^[13,14]

Histórico

A história do Botox[®] (nome comercial) está interligada com o descobrimento da toxina botulínica e a mudança de paradigma entre uma substância letal e uma substância com possíveis fins terapêuticos. O primeiro relato da existência da toxina botulínica ocorreu em 1817, com a associação de casos de intoxicação alimentar grave pelo consumo de alimentos mal preservados. Após a análise de alguns casos, o médico alemão Justinus Kerner correlacionou o consumo dessa substância em alimentos infectados com o bloqueio da condução elétrica nos nervos responsáveis pelos movimentos musculares, sendo essa uma condição bem característica. Além disso, Kerner hipotetizou que algumas doenças relacionadas ao sistema nervoso poderiam, talvez, ser tratadas com baixas doses dessa toxina.^[14]

A ocorrência de um surto de casos relacionados com a intoxicação por toxina botulínica em 1897 auxiliou o Professor van Emengern a descobrir o organismo produtor dessa substância, de modo que, nos anos posteriores, foi possível o isolamento da toxina da bactéria. Entretanto, a purificação e cristalização da proteína apenas foram realizadas décadas depois.^[14]

No início dos anos 1960, o médico americano Alan Scott realizou o teste da substância botulínica sob a forma diluída em humanos com o quadro de estrabismo, a fim de reduzir o

desalinhamento involuntário nos olhos. O tratamento foi um sucesso e possibilitou a abrangência da sua aplicação, como no tratamento de espasmos faciais. A tecnologia inicialmente chamada de Oculinum foi renomeada para Botox[®] após a compra pela empresa farmacêutica Allergan. Posteriormente ao tratamento de condições, observou-se o “rejuvenescimento dos pacientes” com a suavização das linhas de expressões presentes na face. A nova descoberta foi publicada no *The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology* e emergiu como um dos grandes tratamentos dermatológicos, visto que não surtia efeitos colaterais (a princípio), apenas apresentava uma aplicação dolorosa (que já está sendo contornada pelo desenvolvimento da toxina sob a forma de gel, pelo laboratório farmacêutico Revance). Desde então, a popularidade do tratamento com a toxina só aumentou: nos Estados Unidos, o número de usuários submetidos a esse tipo de procedimento entre 2000 a 2015 aumentou 748%, demonstrando o uso alternativo da toxina botulínica.^[3,14]

Aplicações do Botox[®]

A toxina botulínica tipo A possui uma vasta área de aplicações, que usufruem da capacidade desta de impedir a contração muscular, levando ao seu relaxamento. Popularmente, seu uso é conhecido em procedimentos estéticos, com redução e até desaparecimento de rugas e marcas de expressão, principalmente na face. A aplicação de Botox[®] para definir a estética corpórea se acentuou ao longo dos anos, com o grande desejo popular de atingir os padrões estéticos e o rejuvenescimento.^[15] Inicialmente, porém, o Botox[®] foi utilizado para a correção do estrabismo:^[9] devido ao comprometimento de algum dos músculos que regem a movimentação ocular, ocorre um desvio da angulação de um dos olhos do indivíduo.^[16] O relaxamento do músculo causado pela substância leva o olho a se deslocar para a região inversa ao desvio, normalizando-o.^[17] Quanto à dosagem do Botox[®], cada unidade (U) corresponde à DL50, a qual caracteriza a dose intraperitoneal letal média do Botox[®] calculada em camundongos.^[18]

O Botox[®] também pode ser aplicado em pessoas com distonias (síndrome neurológica que causa a contração muscular involuntária), tremores, entre outros. A aplicação da substância inibe as contrações pelo relaxamento da musculatura atingida, podendo ainda ser utilizada em casos de bruxismo (contração excessiva dos músculos mastigatórios ao dormir, por diversos motivos, como ansiedade e estresse).^[19] Além disso, como impede a liberação de acetilcolina, a toxina botulínica A é capaz de impedir o estímulo à secreção de suor se aplicada a regiões como as axilas,^[20] sendo utilizada em casos de hiperidrose (suor excessivo em certas partes do corpo, em geral, axilas, pés e mãos).^[21]

Efeito adversos e contraindicações do Botox[®]

É importante frisar que o uso do Botox[®] possui efeitos adversos; os mais relatados estão relacionados à prática de cosmética, sendo eles de menor extensão e moderados em gravidade. A alta dosagem aplicada pelo ramo estético pode resultar em pequenas complicações, como hematomas, edema, dor no local de aplicação, dor de cabeça, infecção, xeroftalmia, entre outros. Entretanto, alguns outros efeitos menos comuns podem ser identificados - por exemplo, ptose da sobrancelha e blefaroptose, decorrente da dispersão não-intencional da toxina pelo músculo elevador orbicular, após aplicação nos músculos glabella, prócer e corrugador, levando a fraqueza muscular. Entre os eventos raros, destacam-se as reações alérgicas, desde erupções cutâneas a eventos de anafilaxia sistêmica, e disfagia, botulismo e morte, por disseminação sistêmica da toxina.^[22,23]

As contraindicações para o uso da toxina botulínica abrangem: gravidez, amamentação, distúrbio dismórfico corporal, alergias à própria toxina, distúrbios neuromusculares, cicatrizes, queloides e miopatias de esclerose lateral amiotrófica.^[23]

Discussão e Conclusões

A especificidade com que a toxina botulínica age sobre seu alvo a torna extremamente perigosa, ainda que este seja um ponto positivo em sua aplicação biotecnológica na área da saúde. O Botox[®], marca registrada pela empresa Allergan que se refere à toxina botulínica tipo A, atualmente possui diversas aplicações, sendo utilizado para síndromes como o estrabismo, a distonia e o bruxismo, além de aplicabilidade no rejuvenescimento da aparência (principalmente na região facial).

Em suma, a toxina botulínica pode ser muito prejudicial para o corpo humano já que, ao se disseminar pelo organismo, tem caráter neurotóxico e gera o botulismo, podendo levar à morte. Porém, com o avanço da tecnologia, através de processos de isolamento e purificação, foi possível reverter o papel da toxina botulínica do tipo A: ainda que possua efeitos adversos, sua incorporação como forma de tratamento para distúrbios foi de grande importância para a área da medicina, além de ter se tornado um recurso muito popular para procedimentos estéticos.

Referências Bibliográficas

- [1] PECK, M. W. *Biology and Genomic Analysis of Clostridium botulinum*. Editado por Robert K. Poole. Advances in Microbial Physiology, Academic Press, Volume 55, p. 183-320, 2009 [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(09\)05503-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(09)05503-9).
- [2] RAO, Agam K. et al. Clinical characteristics and ancillary test results among patients with botulism—United States, 2002–2015. *Clinical Infectious Diseases*, v. 66, n. suppl_1, p. S4-S10, 2018.
- [3] Redação SUPER, 2016. O curioso caso do botox. Saúde. Superinteressante. Disponível em <<https://super.abril.com.br/saude/o-curioso-caso-do-botox/>> Acesso em 16/06/2022.
- [4] JOHNSON, E. A. & BRADSHAW, M. *Clostridium botulinum and its neurotoxins: a metabolic and cellular perspective*. *Toxicon*, Volume 39, Issue 11, p. 1703-1722, 2001, [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00157-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00157-X).
- [5] HAUSCHILD, A. H. W. *Clostridium botulinum*. In: *Foodborne Bacterial Pathogens*, editado por Michael Doyle. Nova York: Marcel Dekker, INC, 1989. p.111-189.
- [6] LUND, B. M. & PECK, M. W. *Clostridium botulinum*. In: *Guide to Foodborne Pathogens*, editado por Ronald G. Labbé e Santos Garcí. Norwich: John Wiley & Sons, Ltd., 2013. p.91-111. <https://doi.org/10.1002/9781118684856.ch6>.
- [7] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Public Health Image Library (PHIL)*. ID# 2107. Disponível em: <<https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=2107>>. Acesso em 16/06/2022.
- [8] SPOSITO, M. M. M. Toxina Botulínica do Tipo A: mecanismo de ação. *Acta Fisiátr*, São Paulo, 16(1):25-37, março, 2009. Disponível em: <<https://www.revistas.usp.br/actafisiatrica/article/view/103037>>. Acesso em 16/06/2022.
- [9] FUJITA, Rita Lilian Rodrigues; HURTADO, Carola Catalina Navarro. Aspectos relevantes do uso da toxina botulínica no tratamento estético e seus diversos mecanismos de ação. *Saber Científico (1982-792X)*, v. 8, n. 1, p. 120-133, 2021.
- [10] DE ASSUNÇÃO, D. P. S. F. Desenvolvimento, caracterização e avaliação de nanocarreadores contendo acetil hexapeptídeo-3 e toxina botulínica tipo A. Orientador: Prof.^a Dr.^a Josiane de Fátima Padilha de Paula. 2013. 64. Dissertação de Mestrado – Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2013. Disponível em: <<https://tede2.uepg.br/jspui/bitstream/prefix/113/1/Daniele%20Priscila.pdf>>. Acesso em 16/06/2022.
- [11] SPOSITO, M. M. M. Toxina Botulínica do Tipo A - propriedades farmacológicas e uso clínico. *Acta Fisiátr*, São Paulo, 11(Supl.1):S7-S44, dezembro, 2004. Disponível em: <<https://www.revistas.usp.br/actafisiatrica/article/view/102495>>. Acesso em 16/06/2022.
- [12] *Botulism*. NHS, Reino Unido, 26 de nov. de 2018. Disponível em: <<https://www.nhs.uk/conditions/botulism/#:~:text=food%2Dborne%20botulism%20%E2%80%93%20when%20so,meone,muscle%20rather%20than%20a%20vein>>. Acesso em 16/06/2022.

- [13] SAKAGUCHI, G. *Clostridium botulinum* toxins. *Pharmacology & Therapeutics*, Grã Bretanha, Vol. 19, Issue 2, p.165-194, 1982. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0163725882900614>>. Acesso em 16/06/2022.
- [14] Lang, A. (2004). *History and Uses of BOTOX® (Botulinum Toxin Type A)*. *Lippincott's Case Management*, 9(2), 109–112. doi:10.1097/00129234-200403000-00011 10.1097/00129234-200403000
- [15] GIMENEZ, R.P. Análise retrospectiva das alterações da dinâmica facial após aplicações seriadas de toxina botulínica A. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de São Paulo. São Paulo, 2006. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5158/tde1042007113400/ptbr.php>
- [16] Dráuzio Varella, 3 de setembro de 2012, Estrabismo. (<https://drauziovarella.uol.com.br/doencas-e-sintomas/estrabismo/#:~:text=abril%20de%202021-.Estrabismo%20%C3%A9%20um%20dist%C3%BArbio%20que%20afeta%20o%20paralelismo%20entre%20os,que%20apontam%20para%20dire%C3%A7%C3%B5es%20diferentes>). Acesso em 14/06/2022.
- [17] SANTOS, Ely Almeida. Toxina botulínica. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v. 60, p. 547-548, 1997.
- [18] Botox®: bula para o profissional da saúde. Allergan, CCDS V 20.0, dezembro de 2019. Disponível em: <https://allergan-web-cdn-prod.azureedge.net/allerganbrazil/allerganbrazil/media/allergan-brazil/botox_bula_profissional.pdf>. Acesso em: 12/07/2022.
- [19] SILVEIRA, M. E. A. .; RAMOS, R. R. . USO DA TOXINA BOTULÍNICA EM CASOS DE BRUXISMO: UMA REVISÃO ATUALIZADA. *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação, [S. l.]*, v. 8, n. 5, p. 1097–1107, 2022. DOI: 10.51891/rease.v8i5.5389. Disponível em: <https://periodicorease.pro.br/rease/article/view/5389>. Acesso em 14/06/2022.
- [20] Heckmann M, Ceballos-Baumann A, Plewig G. Botulinum toxin A for axillary hyperhidrosis (excessive sweating). *New Eng J Med*, 344(7):488-93, 2001
- [21] LESSA, Larissa da Rocha; FONTENELLE, Leonardo F. Toxina botulínica como tratamento para fobia social generalizada com hiperidrose. *Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)*, v. 38, p. 84-86, 2011.
- [22] Padda IS, Tadi P. Toxina Botulínica. [Atualizado em 25 de novembro de 2021]. In: *StatPearls [Internet]*. Ilha do Tesouro (FL): Publicação StatPearls; 2022 janeiro-. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557387/>>
- [23] Ahsanuddin, S., Roy, S., Nasser, W. *et ai*. Eventos adversos associados ao Botox conforme relatado em um banco de dados da Food and Drug Administration. *Aesth Plast Surg* 45, 1201-1209 (2021). <<https://doi.org/10.1007/s00266-020-02027-z>>