

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Orlando Oliveira Silva Júnior

**Avaliação da relação entre a resposta clínica à aplicação da toxina botulínica para fins  
estéticos e a produção de anticorpos antitoxina**

Uberaba – MG

2025

Orlando Oliveira Silva Júnior

**Avaliação da relação entre a resposta clínica à aplicação da toxina botulínica para fins estéticos e a produção de anticorpos antitoxina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior

Uberaba – MG

2025

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro**

S58a	<p>Silva Júnior, Orlando Oliveira Avaliação da relação entre a resposta clínica à aplicação da toxina botulínica para fins estéticos e a produção de anticorpos antitoxina / Orlando Oliveira Silva Júnior. -- 2025. 119 f.: il., fig., graf., tab.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2025 Orientador: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior</p> <p>1. Toxinas botulínicas. 2. Imunologia. 3. Antitoxinas. 4. Estética. 5. Resposta imune. I. Rodrigues Júnior, Virmondes. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.</p>
	CDU 615.372

Orlando Oliveira Silva Júnior

Avaliação da relação entre a resposta clínica à aplicação da toxina botulínica para fins estéticos e a produção de anticorpos antitoxina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior

\_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior – Orientador  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Anna Carolina Miola  
Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho

---

Prof. Dr. Gleison Vieira Duarte  
Instituto Baiano de Imunoterapia

Dedico a mim mesmo, por todo sacrifício e renúncia.  
Dedico também aos meus pais, meu marido e amigos, por  
todo apoio e acolhimento.

## AGRADECIMENTOS

Não foi fácil chegar até aqui e só eu sei os sabores e dissabores dessa jornada acadêmica. Ela foi repleta de desafios incluindo desde a necessidade de viajar toda semana entre Ribeirão Preto e Uberaba (às vezes mais de uma vez na semana), passando pelo fato de enfrentar uma residência e um fellow concomitantemente ao mestrado, até as demandas profissionais e pessoais. Por isso mesmo, agradeço primeiramente a mim, pela resiliência e persistência ao longo dessa trajetória, as quais permitiram que eu enfrentasse cada obstáculo e chegasse até o fim.

Em segundo lugar, agradeço aos meus pais que, mesmo diante de tamanha simplicidade e de diversas limitações sociais, sempre acreditaram na educação como fonte transformadora de vidas e me estimularam a seguir nesse caminho. Sou grato ainda ao meu marido, Marcos, companheiro de vida e parceiro de todas as horas, que sempre me acolheu e me encorajou a nunca desistir desse trabalho, mesmo diante de tantos obstáculos.

Agradeço ainda aos familiares e amigos que facilitaram essa caminhada e me auxiliaram das mais diversas formas, cada um ao seu modo. Não conseguirei citar todos, mas preciso destacar especialmente Lívia e Felipe, por literalmente me acolherem em Uberaba, além de Karol, Liniker e Gisele que não mediram esforços em me ajudar no que eu solicitasse. Agradeço ainda ao meu orientador, Prof. Virmondos, pela forma como guiou nossa pesquisa e dissertação, sempre com muito respeito, sabedoria, calma e compreensão.

Sou grato ainda à toda equipe do ambulatório de dermatologia da UFTM, incluindo os funcionários (como Noêmia, Soraia, Raquel e Sueli), os preceptores e minhas amigas residentes. Não há palavras para agradecer tamanha contribuição e suporte. Estendo esses agradecimentos ainda a cada paciente que contribuiu como participante da pesquisa e permitiu que esse trabalho fosse realizado.

Agradeço ainda a cada professor e professora que aceitou compor a minha banca de qualificação e de defesa. Sou grato também aos mestres que ministraram as disciplinas do mestrado e que tanto contribuíram para a minha formação. Por fim, mas tão importante quanto os demais, agradeço à secretária da Pós Graduação, Tuânia, pela orientação, por todo suporte ofertado e até mesmo por ouvir e acolher os meus desabafos.

## **APOIO FINANCEIRO**

Esse trabalho foi realizado com orçamento dos próprios pesquisadores e sem apoio financeiro de nenhuma instituição. As toxinas botulínicas utilizadas no estudo foram doadas ao Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

"Só é lutador quem sabe lutar consigo mesmo."

Carlos Drummond de Andrade

## RESUMO

**Fundamentos:** A toxina botulínica (BTX) é composta por uma neurotoxina central associada a várias proteínas acessórias não tóxicas (NAPs) e possui diversas finalidades terapêuticas. Na dermatologia tem sido utilizada para o tratamento das ríides faciais e, apesar da eficácia comprovada, alguns indivíduos não respondem (ou perdem resposta) clinicamente. Um dos motivos seria o potencial antigênico das NAPs e excipientes das formulações comercialmente disponíveis, contudo, isso é um dissenso na literatura. Para tanto, o objetivo desse estudo foi demonstrar relação entre a ausência de resposta clínica à aplicação de BTX para fins estéticos e a presença de anticorpos antitoxina (AATx). **Métodos:** Trata-se de um estudo piloto clínico intervencionista, dividido em duas etapas, o qual consistiu na aplicação de *AbobotulinumtoxinA*, reconstituída em 2ml de solução fisiológica 0,9%, em 34 participantes, no D0 (aplicação inicial) e no D1(15-21 dias após o D0). A primeira etapa, para fins estatísticos, analisou 32 indivíduos, sendo 16 de cada sexo e com idade entre 25 a 44 anos (idade média igual a 30 anos). Quatro examinadores independentes avaliaram clinicamente os participantes por meio da escala de Lemperle e a concordância, entre eles, foi medida através do Kappa ponderado. Na segunda etapa, as amostras sanguíneas coletadas no D0, D1 e D2 (120 depois do D0) foram submetidas ao método ELISA para identificação de AATx. Para fins estatísticos, devido perda de seguimento, essa etapa analisou 31 participantes e foi realizada Clusterização Hierárquica seguido de Teste de Fisher para verificar possível relação entre a resposta clínica e os níveis de AATx e o nível de significância foi fixado em  $\alpha = 0,05$ . **Resultados:** O estudo observou que o instrumento de avaliação clínica foi eficaz e houve boa concordância entre os examinadores. Os homens receberam doses maiores de BTX em relação às mulheres, porém não houve evidência suficiente para comprovar diferença entre os sexos. Identificamos uma participante do sexo feminino com resposta clínica ausente, todavia, diferente do esperado, ela não apresentou níveis elevados de AATx. Paralelamente, alguns participantes apresentaram níveis elevados de AATx, mas sem repercussão na resposta clínica. Por fim, o Teste de Fisher foi aplicado e não houve evidência de relação entre a resposta clínica e os níveis de AATx ( $p=0,82$ ). **Conclusões:** Esse estudo não conseguiu demonstrar relação entre a resposta clínica e os níveis de AATx. O tamanho amostral e o método ELISA são limitações desse trabalho e que podem ter influenciado os resultados.

Palavras-chave: toxinas botulínicas tipo A – imunologia; anticorpos; antitoxina; estética; imunogenicidade.

## ABSTRACT

**Background:** Botulinum toxin (BTX) is composed of a central neurotoxin associated with several non-toxic accessory proteins (NAPs) and has a wide range of therapeutic applications. In dermatology, it has been employed for the treatment of facial rhytides, and despite its proven efficacy, some individuals either do not respond or lose clinical response over time. One possible explanation is the antigenic potential of the NAPs and excipients present in commercially available formulations; however, this remains a point of contention in the literature. Therefore, the objective of this study was to investigate the association between the absence of clinical response to BTX for aesthetic purposes and the presence of antitoxin antibodies (AATx). **Methods:** This was a pilot interventional clinical study divided into two phases. It involved the application of AbobotulinumtoxinA, reconstituted in 2 mL of 0.9% saline solution, in 34 participants on Day 0 (initial application) and again on Day 1 (15–21 days after D0). For statistical purposes, the first phase included 32 individuals (16 of each sex), aged 25 to 44 years (mean age: 30 years). Four independent evaluators assessed participants clinically using the Lemperle scale, and inter-rater agreement was measured using the weighted Kappa coefficient. In the second phase, blood samples collected on D0, D1 (15–21 days after D0), and D2 (120 days after D0) were analyzed via ELISA to detect AATx. Due to loss to follow-up, this phase included 31 participants. Hierarchical clustering followed by Fisher's exact test was used to investigate a possible association between clinical response and antibody levels, with a significance level set at  $\alpha = 0.05$ . **Results:** The clinical assessment tool proved effective, and inter-rater agreement was high. Males received higher doses of BTX than females; however, no significant difference between sexes was observed. One female participant showed no clinical response, but, contrary to expectations, no increase in antitoxin antibody levels was detected. Similarly, some participants exhibited elevated antibody levels without any impact on clinical response. Finally, Fisher's exact test revealed no significant association between clinical response and AATx levels ( $p = 0.82$ ). **Conclusions:** This study did not demonstrate an association between clinical response and AATx levels. The sample size and use of the ELISA method are limitations that may have influenced the results.

Keywords: botulinum toxins type A – immunology; antibodies; antitoxin; aesthetics; immunogenicity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura da toxina botulínica tipo A .....	18
Figura 2 – Representação esquemática do mecanismo de ação a nível molecular da BTX na junção neuromuscular .....	22
Figura 3 – Representação esquemática do mecanismo de ação da toxina botulínica nas sinapses .....	22
Figura 4 – Anatomia da musculatura da face .....	33
Figura 5 – Rítmicas faciais e músculos associados .....	34
Figura 6 – Alterações da textura da pele ao longo do tempo .....	34
Figura 7 – Gráfico box plot mostrando variáveis relacionadas ao sexo .....	56
Figura 8 – Gráfico de análise pareada comparando a quantidade de unidades de toxina botulínica utilizadas em cada região entre os períodos D0 e D1 .....	58
Figura 9 – Gráfico de barras apresentando a frequência relativa das respostas do Examinador 1, organizadas por região e distribuídas por períodos avaliados (D0, D1 e D2), de acordo com a escala de pontuação fornecida (0 a 5) .....	59
Figura 10 – Gráfico de barras apresentando a frequência relativa das respostas do Examinador 2, organizadas por região e distribuídas por períodos avaliados (D0, D1 e D2), de acordo com a escala de pontuação fornecida (0 a 5) .....	67
Figura 11 – Gráfico de barras apresentando a frequência relativa das respostas do Examinador 3, organizadas por região e distribuídas por períodos avaliados (D0, D1 e D2), de acordo com a escala de pontuação fornecida (0 a 5) .....	70
Figura 12 – Gráfico de barras apresentando a frequência relativa das respostas do Examinador 4, organizadas por região e distribuídas por períodos avaliados (D0, D1 e D2), de acordo com a escala de pontuação fornecida (0 a 5) .....	72
Figura 13 – Painel com Gráficos 13A e 13B representando a produção de ATTx-IgG nos três tempos .....	79
Figura 14 – Gráfico de probabilidade normal para variável ATTx-IgG nos três tempos .....	80
Figura 15 – Gráfico Box plot mostrando a produção de ATTx-IgG nos três tempos e por sexo .....	83
Figura 16 – Gráfico de dispersão mostrando a produção de ATTx-IgG por idade nos três tempos .....	85
Figura 17 – Gráfico em forma de Dendograma apresentando a clusterização .....	88
Figura 18 – Fotografias da paciente 4 no D0 (à esquerda) e D1 (à direita) evidenciando as rugas glabellares no padrão dinâmico da mímica facial .....	97
Figura 19 – Fotografias da paciente 4 no D0 (à esquerda) e D1 (à direita) evidenciando as rugas frontais no padrão dinâmico da mímica facial. ....	97
Figura 20 – Fotografias da paciente 4 no D0 (à esquerda) e D1 (à direita) evidenciando as rugas periorculares à esquerda no padrão dinâmico da mímica facial. ....	97
Figura 21 – Fotografias da paciente 4 no D0 (à esquerda) e D1 (à direita) evidenciando as rugas periorculares à direita no padrão dinâmico da mímica facial. ....	98

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Interações medicamentosas e clínicas.....	24
Tabela 2 – Características das formulações mais convencionais de toxina botulínica .....	28
Tabela 3 – Principais complicações relacionadas à aplicação da toxina botulínica para fins estéticos.....	30
Tabela 4 – Contraindicações absolutas e relativas à aplicação de BTX para fins estéticos.....	31
Tabela 5 – Métodos de detecção de anticorpos neutralizantes.....	42
Tabela 6 – Classificação da resposta clínica .....	52
Tabela 7 – Avaliação da quantidade média de unidades de toxina botulínica, incluindo o total de unidades aplicadas e os períodos D0 e D1, estratificada por sexo .....	57
Tabela 8 – Avaliação Pareada das Unidades de Toxina Botulínica Aplicadas entre D0 e D1	60
Tabela 9 – Frequências absoluta e relativa das classificações por região e padrão, de acordo com os períodos (D0, D1 e D2), segundo a avaliação do Examinador 1.....	62
Tabela 10 – Frequências absoluta e relativa das classificações por região e padrão, de acordo com os períodos (D0, D1 e D2), segundo a avaliação do Examinador 2 .....	65
Tabela 11 – Frequências absoluta e relativa das classificações por região e padrão, de acordo com os períodos (D0, D1 e D2), segundo a avaliação do Examinador 3.....	68
Tabela 12 – Frequências absoluta e relativa das classificações por região e padrão, de acordo com os períodos (D0, D1 e D2), segundo a avaliação do Examinador 4.....	73
Tabela 13 – Avaliação da concordância entre os examinadores no padrão dinâmico através do coeficiente Kappa ponderado .....	77
Tabela 14 – Dados de estatística descritiva, teste de normalidade de Shapiro Wilk e ANOVA .....	78
Tabela 15 – Análise estatística descritiva comparada entre os sexos .....	81
Tabela 16 – Quantificação de ATTx-IgG nos três tempos, estratificação da resposta clínica e o cluster pertencente a cada paciente (ID). .....	86
Tabela 17 – Média de produção de ATTx-IgG nos três tempos (D0, D1 e D2) e por cluster .	87
Tabela 18 – Associação entre resposta clínica e cluster .....	89

## LISTA DE SIGLAS

$\mu\text{g}$	Micrograma
<i>abo</i> BTX	Abobotulinumtoxina A
ACh	Acetilcolina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARP	Ausência de Resposta Primária
ARS	Ausência de Resposta Secundária
AATx	Anticorpos Antitoxina
ATTx-IgG	Anticorpo Antitoxina Imunoglobulina G
BSA	Albumina Bovina
BTX	Toxina botulínica ou Neurotoxina botulínica
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
DC	Distonia Cervical
DL50	Dose Letal Intraperitoneal Média em Camundongos
EDB	Teste do Extensor Digitorum Brevis
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> / Administração de Alimentos e Medicamentos
FTAT	Teste de Anticorpo do Frontal
HC	Cadeira pesada
HC UFTM	Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HSA	Albumina Sérica Humana
Hsp90	Proteína de Choque Térmico 90
<i>inco</i> BTX	Incobotulinumtoxina A
ICBN	Instituto de Ciências Biológicas e Naturais
ID	Indivíduo/Paciente
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IPA	Imunoprecipitação
kDa	Quilodalton
LC	Cadeira leve
LEMS	Síndrome de Lambert-Eaton
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MHDA	Ensaio de Hemidiafragma de Camundongo
mg	Miligrama
MG	Miastenia Gravis
mL	Mililitro
MPA	Ensaio de Proteção do Camundongo
MS-Excel	<i>Microsoft Excel</i>
NABs	Anticorpos Neutralizantes Contra a Toxina Botulínica
NAPs	Proteínas Acessórias Não Tóxicas

NST	Teste do Suor com Ninidrina
<i>ona</i> BTX	Onabotulinumtoxina A
OPD	Dicloridrato de O-fenilenodiamina
P2X3	Receptor Purinérgico P2X de Canal Iônico 3 Controlado por Ligante
PACAP 38	Peptídeo Ativador da Adenilato Ciclase Pituitária 38
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PSG	Polissialogangliosídeo
<i>rima</i> BTX	Rimabotulinumtoxina B
RTP004	Peptídeo Excipiente Estabilizador Patenteado RTP004
SCMT	Teste do Esternocleidomastoideo
SIA	Ensaio de Inibição dos Sinaptosomas
SNAP	Proteínas de Fixação de Fator Sensível a N-etilmaleimida Solúvel
SNAP 25	Proteína 25 quilodaltons associada à Sinaptossoma
SNARE	Receptor de Proteína de Ligação ao Fator Sensível à N-etilmaleimida Solúvel
Sv2	Proteína 2 da vesícula sináptica
Stx	Sintaxina
Syt	Sinaptotagmina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Tris-HCl	Cloridrato de Tris
TRPA1	Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1
TRPV1	Receptor de Potencial Transitório Vanilóide Tipo 1
TrxR-Trx	Sistema de Tiorredoxina Redutase–Tiorredoxina
U	Unidade (ou unidades) de Speywood
UBI	Injeção Unilateral de Sobrancelha
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
VAMP	Proteína de Membrana Associada à Vesícula
VIS	Recursos de Imagem Baseado em Ilusão Visual
WBA	Ensaio de Western Blot

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	17
1.1	ESTRUTURA DA TOXINA BOTULÍNICA E SEUS SOROTIPOS .....	17
1.2	MECANISMO DE AÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA.....	19
1.3	FORMULAÇÕES DISPONÍVEIS DE TOXINA BOTULÍNICA .....	23
1.4	USO DA TOXINA BOTULÍNICA NA PRÁTICA MÉDICA .....	27
<b>1.4.1</b>	<b>Uso da toxina botulínica para fins estéticos .....</b>	<b>31</b>
1.5	MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CLÍNICA NA DERMATOLOGIA.....	35
1.6	AUSÊNCIA DE RESPOSTA CLÍNICA E IMUNOGENICIDADE.....	38
1.7	MÉTODOS DE DETECÇÃO DOS ANTICORPOS NEUTRALIZANTES .....	41
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE .....	45
3	OBJETIVOS .....	47
3.1	OBJETIVO GERAL.....	47
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
4	METODOLOGIA .....	49
4.1	COMITÊ DE ÉTICA.....	49
4.2	LOCAL DE REALIZAÇÃO .....	49
4.3	SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES .....	49
4.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	49
4.5	DESENHO DO ESTUDO .....	50
<b>4.5.1</b>	<b>1ª etapa .....</b>	<b>50</b>
<b>4.5.2</b>	<b>2ª Etapa .....</b>	<b>51</b>
<b>4.5.3</b>	<b>3ª Etapa .....</b>	<b>52</b>
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	53
5	RESULTADOS.....	55
5.1	PRIMEIRA ETAPA - AVALIAÇÃO CLÍNICA .....	55
<b>5.1.1</b>	<b>Caracterização da coorte.....</b>	<b>55</b>

5.1.2	<b>Avaliação das unidades de toxina botulínica aplicadas em homens e mulheres</b>	55
5.1.3	<b>Avaliação das unidades de toxina botulínica aplicadas pareadas entre D0 e D1</b>	55
5.1.4	<b>Avaliações clínicas da resposta à aplicação de toxina pelos examinadores ..</b>	57
5.1.4.1	<i>Examinador 1</i> .....	57
5.1.4.2	<i>Examinador 2</i> .....	64
5.1.4.3	<i>Examinador 3</i> .....	64
5.1.4.4	<i>Examinador 4</i> .....	70
5.1.5	<b>Concordância entre os examinadores por região ..</b>	71
5.1.5.1	<i>Região Frontal</i> .....	75
5.1.5.2	<i>Região Glabellar</i> .....	75
5.1.5.3	<i>Região Periocular Direita</i> .....	75
5.1.5.4	<i>Região Periocular Esquerda</i> .....	76
5.2	<b>SEGUNDA ETAPA – AVALIAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL.....</b>	78
5.2.1	<b>Avaliação da produção de anticorpos antitoxina IgG .....</b>	78
5.2.2	<b>Avaliação da produção de anticorpos antitoxina IgG em homens e mulheres .....</b>	80
5.2.3	<b>Avaliação da correlação entre a produção de anticorpos antitoxina IgG e a idade dos pacientes .....</b>	81
5.2.4	<b>Avaliação da resposta clínica à aplicação de toxina botulínica para fins estéticos .....</b>	81
5.2.5	<b>Análise de clusterização dos pacientes de acordo com a produção de anticorpos antitoxina IgG .....</b>	84
5.2.6	<b>Associação entre a resposta clínica à aplicação de toxina botulínica e o nível de anticorpos antitoxina IgG.....</b>	89
6	<b>DISCUSSÃO.....</b>	91
6.1	<b>SOBRE A COORTE .....</b>	91
6.2	<b>DIFERENÇA DAS UNIDADES DE TOXINA BOTULÍNICA APLICADAS EM HOMENS E MULHERES.....</b>	91
6.3	<b>CONCORDÂNCIA ENTRE OS EXAMINADORES POR REGIÃO .....</b>	92
6.4	<b>AVALIAÇÕES CLÍNICAS DA RESPOSTA À APLICAÇÃO DE TOXINA BOTULÍNICA PELOS EXAMINADORES.....</b>	92
6.5	<b>AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTITOXINA - IgG.....</b>	93

6.6	CORRELAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL.....	94
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	99
8	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	101
9	<b>ANEXOS</b> .....	113
9.1	ANEXO A: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	113
9.2	ANEXO B: FICHA CLÍNICA COM PLANO DE APLICAÇÃO .....	117
9.3	ANEXO C: ESCALA DE LEMPERLE <i>ET AL.</i> , 2001 .....	118

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 ESTRUTURA DA TOXINA BOTULÍNICA E SEUS SOROTIPOS

A toxina botulínica (BTX) é transcrita pelas bactérias como complexos proteicos inativos e consistem em uma neurotoxina central e várias proteínas acessórias não tóxicas (NAPs) associadas (Bellows; Jankovic, 2019; Espinoza *et al.*, 2019; Göschel *et al.*, 1997; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Naumann *et al.*, 2013; Rosales; Bigalke; Dressler, 2006; Tomic *et al.*, 2021).

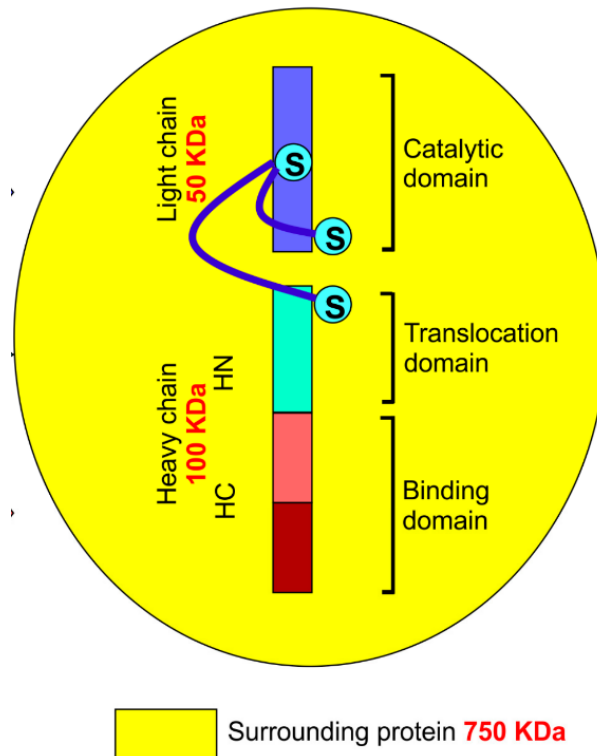
A neurotoxina botulínica (BTX) central é uma proteína de 150kDa (*kiloDalton*) que consiste em uma cadeia pesada de 100 kDa e uma cadeia leve de 50 kDa, que estão ligadas por uma ligação dissulfeto. A BTX é ativada quando a cadeia polipeptídica é clivada proteoliticamente na cadeia pesada de 100 kDa e na cadeia leve de 50 kDa (Dolly; Aoki, 2006; Espinoza *et al.*, 2019; Naumann *et al.*, 2013; Rosales; Bigalke; Dressler, 2006).

A proteína inteira é constituída por três domínios, sendo dois na cadeia pesada e um na cadeia leve, e cada domínio exerce uma função específica a nível molecular. O terminal-C da cadeia pesada atua na ligação da toxina ao sítio receptor, enquanto o terminal-N é responsável por uma função conhecida como “translocação” (Choudhury *et al.*, 2021; Lacy *et al.*, 1998).

Já a cadeia leve contém a unidade catalítica. Além das duas cadeias peptídicas, a molécula de toxina é tipicamente cercada pelos NAPs ( $\approx$ Peso molecular de 750 kDa) que ajudam a estabilizar e proteger a neurotoxina central de mudanças de temperatura, pH baixo e degradação enzimática. A Figura 1 representa de forma esquemática a estrutura da BTX (Espinoza *et al.*, 2019; Lacy *et al.*, 1998; Naumann *et al.*, 2013; Rosales; Bigalke; Dressler, 2006).

A BTX é uma potente neurotoxina com sete sorotipos conhecidos (BTX-A, B, C, D, E, F e G) e todos eles são produzidos pelas bactérias anaeróbicas, gram-positivas e formadoras de esporos *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyrricum*, *Clostridium barati*, e *Clostridium argentinensis*, e algumas outras espécies relacionadas. Elas produzem os sete sorotipos distintos de BTX que são classificados com base na tipagem sorológica das toxinas, ou seja, a nomenclatura é definida pelo soro neutralizante específico (Espinoza *et al.*, 2019; Hanna; Pon, 2019; Naumann *et al.*, 2013; Segura-Aguilar; Tizabi, 2018; Sethi *et al.*, 2020).

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura da toxina botulínica tipo A



Fonte: Imagem adaptada de Choudhury *et al.*, 2021.

Nota: O esquema representa a estrutura da toxina botulínica tipo A que é formada por duas cadeias peptídicas conectadas por uma ponte dissulfeto. A cadeia leve propicia a quebra catalítica da proteína alvo. Já a cadeia pesada possui dois domínios que são nomeados de acordo com sua função específica (ligação e translocação).

KDa = Quilodalton: S-S = ponte dissulfeto, HN = terminal N da cadeia pesada, HC = terminal C da cadeia pesada.

Posteriormente, dentro de sorotipos específicos de BTX, outros subtipos – baseando-se em variações específicas na sequência de aminoácidos – foram identificados e rotulados por meio de sufixo alfanumérico após o sorotipo da toxina. Assim sendo, os sorotipos e subtipos diferem-se entre si, e não somente na estrutura, mas também quanto às propriedades tóxicas e farmacológicas (Choudhury *et al.*, 2021; Peck *et al.*, 2017).

Desse modo, embora todos os sorotipos de BTX inibam a liberação de acetilcolina (ACh) dos terminais nervosos, suas proteínas-alvo intracelulares, suas características de ação e suas potências variam substancialmente. O BTX-A é o mais extensamente estudado para fins terapêuticos, porém, mais recentemente, o BTX-B também se tornou comercialmente disponível (Dressler; Johnson, 2022; Hanna; Pon, 2019; Park; Ahn, 2021).

O sistema nervoso humano é suscetível a cinco sorotipos (BTX-A, B, E, F e G) e não é afetado por apenas dois (BTX-C e D) (Espinoza *et al.*, 2019; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Naumann *et al.*, 2013; Nestor *et al.*, 2021; Rosales; Bigalke; Dressler, 2006; Sethi *et al.*, 2020). Em camundongos, a duração da ação é mais longa em BTX-A e progressivamente mais

curta em BTX-B, BTX-F e BTX-E. Em humanos, essa relação parece ser a mesma. A atuação dessas neurotoxinas causa o botulismo humano, o qual possui 3 formas diferentes segundo sua origem: clássico, intestinal e por feridas (Espinoza *et al.*, 2019; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Naumann *et al.*, 2013; Rosales; Bigalke; Dressler, 2006; Tomic *et al.*, 2021).

O botulismo clássico resulta da ingestão de alimentos contendo neurotoxinas pré-formadas tipos A, B ou E. Apresenta-se como uma paralisia flácida descendente simétrica dos nervos motores e autônomos, geralmente começando pelos nervos cranianos. O botulismo intestinal é oriundo da ingestão de esporos e produção de neurotoxinas pelo intestino (Espinoza *et al.*, 2019; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Tomic *et al.*, 2021).

Já o botulismo por fermento surge em decorrência da contaminação de feridas pela bactéria *Clostridium botulinum*, a qual produz toxinas dentro do fermento que são absorvidas pelo organismo e assim causam a doença. Em adendo, os organismos produtores de BTX-G foram isolados do solo, mas nunca foram relatados como causadores do botulismo. As BTX-C e D causam doenças apenas em animais domésticos (Aoki; Guyer, 2001; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Schiavo *et al.*, 1994).

## 1.2 MECANISMO DE AÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA

As BTXs atuam na placa motora terminal, a qual constitui-se como a unidade funcional de contração do músculo esquelético e compreende a junção entre o neurônio motor e a fibra muscular. A contração muscular ocorre por despolarização da membrana pós-sináptica, a qual ocorre pela ligação da ACh a um receptor ionotrópico específico (o receptor colinérgico nicotínico) abrindo-o na fibra muscular (Espinoza *et al.*, 2019; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Rosales; Bigalke; Dressler, 2006).

A ACh é liberada do citosol dos terminais dos axônios motores para a fenda sináptica quando o potencial de ação, gerado no segmento inicial do neurônio motor dentro do sistema nervoso central, chega ao axônio terminal e o despolariza. Essa liberação de ACh é realizada por uma proteína de transporte conhecida como complexo SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein receptors*). A BTX bloqueia essencialmente a liberação de ACh dos terminais motores e, portanto, os músculos esqueléticos não conseguem se contrair, embora os potenciais de ação continuem a atingir a placa motora (Dolly; Aoki, 2006; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Park; Ahn, 2021).

Esse bloqueio se inicia quando a BTX é injetada no tecido alvo e o domínio de ligação do receptor da cadeia pesada da BTX se liga aos *Polysialoganglioside* (PSG) (estruturas de

glicoproteínas encontradas especificamente em terminais nervosos colinérgicos). Esse encaixe específico é a razão da alta seletividade da BTX para sinapses colinérgicas. Após isso, a toxina é internalizada através da ligação com outro receptor de superfície, o qual varia a depender do subtipo e/ou sorotipo da BTX. A BTX-B, BTX-DC e BTX-G se ligam especificamente com a sinaptotagmina (Syt), já a BTX-A1 e BTX-E1 ligam-se à proteína 2 da vesícula sináptica (Sv2) (Binz; Rummel, 2009; Choudhury *et al.*, 2021; Yao *et al.*, 2016).

Após a fase de internalização, a toxina permanece dentro das vesículas sinápticas até o momento em que elas são acidificadas através do influxo de íon H<sup>+</sup> por meio das bombas de prótons vesiculares. Por conseguinte, as proteínas transportadoras de ACh, presentes na membrana da vesícula, importam e concentram a ACh citosólica dentro da vesícula. Nesta fase, as vesículas estão prontas para se fundir com a membrana pré-sináptica e liberar ACh na fenda sináptica. Todavia, na presença de BTX, essa etapa é bloqueada (Choudhury *et al.*, 2021; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Park; Ahn, 2021).

O bloqueio pela BTX se inicia na “translocação” da cadeia leve para o citoplasma de dentro das vesículas, viabilizado pelo domínio de translocação da cadeia pesada que é o terminal-N. Esse processo é importante, pois libera a cadeia leve, haja vista que ela seguirá inativa enquanto permanecer ligada ao resto da toxina (Choudhury *et al.*, 2021; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Park; Ahn, 2021).

Após a translocação, a cadeia leve é liberada por meio ação de enzimas de clivagem, como a proteína de choque térmico 90 (HSP90) e o sistema tiorredoxina redutase-tiorredoxina (TrxR-Trx). Após ser liberada do restante da toxina, a cadeia leve é então ativada, clivando e desativando de várias proteínas, como a VAMP, SNAP25, syntaxina e outras do complexo SNARE. As proteínas alvo clivadas são específicas para cada subtipo de BTX. A BTX-B, BTX-D, BTX-F e BTX-G clivam VAMP, enquanto a BTX-A e BTX-E clivam SNAP-25, e BTX-C cliva tanto SNAP-25 quanto syntaxina (Stx) (Choudhury *et al.*, 2021; Dolly; Aoki, 2006; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Park; Ahn, 2021).

O fenômeno descrito acima impede o encaixe da vesícula de ACh na superfície interna da membrana celular, logo, não ocorre a fusão e, por conseguinte, bloqueia-se a liberação de ACh na fenda sináptica. Desse modo, se o tecido alvo for o músculo, ocorre bloqueio da contração muscular por denervação química transitória, enquanto, se o alvo for uma glândula exócrina, a secreção glandular é bloqueada transitoriamente (Choudhury *et al.*, 2021; Park; Ahn, 2021).

O efeito de inibição da exocitose da ACh pela BTX diminui progressivamente à medida que o SNAP-25 se regenera e se encerra pela restauração do *turnover* do complexo proteico

SNARE. A duração do efeito depende da meia-vida da cadeia leve e do tempo de renovação das proteínas SNARE (Choudhury *et al.*, 2021; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000).

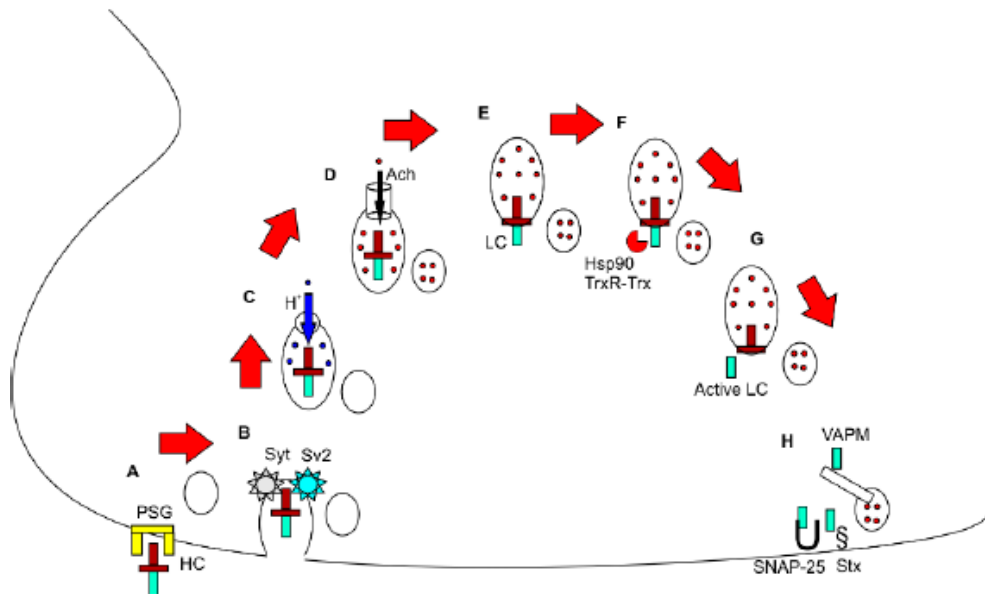
O brotamento axonal e o alongamento da placa terminal também ocorrem, porém acredita-se que não impactam no término do efeito da BTX, pois provavelmente são transitórios. Assim sendo, é importante compreender que, independentemente do modo de restauração da fisiologia normal, a ação da BTX é temporária e não permanente, o que é fundamental para fins de aplicação médica (Choudhury *et al.*, 2021).

De uma forma geral, acredita-se que os efeitos da BTX não são exclusivos dos terminais colinérgicos da junção neuromuscular. Esses efeitos parecem ocorrer também nas sinapses químicas tanto no sistema nervoso periférico quanto central. Desse modo, outros neurotransmissores são afetados pelas ações da BTX incluindo desde moléculas em pequenas vesículas sinápticas (por exemplo, acetilcolina e glutamato) até neuropeptídeos em grandes vesículas centrais densas (por exemplo, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), peptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária 38 (PACAP 38) e substância P (Burstein *et al.*, 2020; Choudhury *et al.*, 2021; Park; Ahn, 2021).

Essas grandes vesículas também transportam várias proteínas e receptores (como por exemplo, TRPV1, TRPA1, P2X3), e se inserem na bicamada lipídica da membrana sináptica, o que é essencial para a nocicepção. Isso mostra que os efeitos da BTX são amplos e para além do bloqueio da contração muscular. Assim sendo, as Figuras 2 e 3 representam, respectivamente, o mecanismo de ação da BTX na junção neuromuscular e nas sinapses intraneuronais (Burstein *et al.*, 2020; Choudhury *et al.*, 2021).

Para além, vale ressaltar que vários medicamentos agem na junção neuromuscular e, dessa forma, interferem no efeito da BTX. Os aminoglicosídeos, como estreptomicina e gentamicina, podem bloquear a liberação de ACh e, assim, podem provocar uma síndrome botulismo-like através do bloqueio dos canais de cálcio. As aminoquinolinas (cloroquina e hidroxicloroquina) podem antagonizar o efeito da BTX, pois agem tanto na membrana celular inibindo a ligação (ou internalização) da toxina, como no interior da célula, impedindo o processamento lisossomal da toxina (Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Wang *et al.*, 1984; Yamada; Kuno; Iwanaga, 1986).

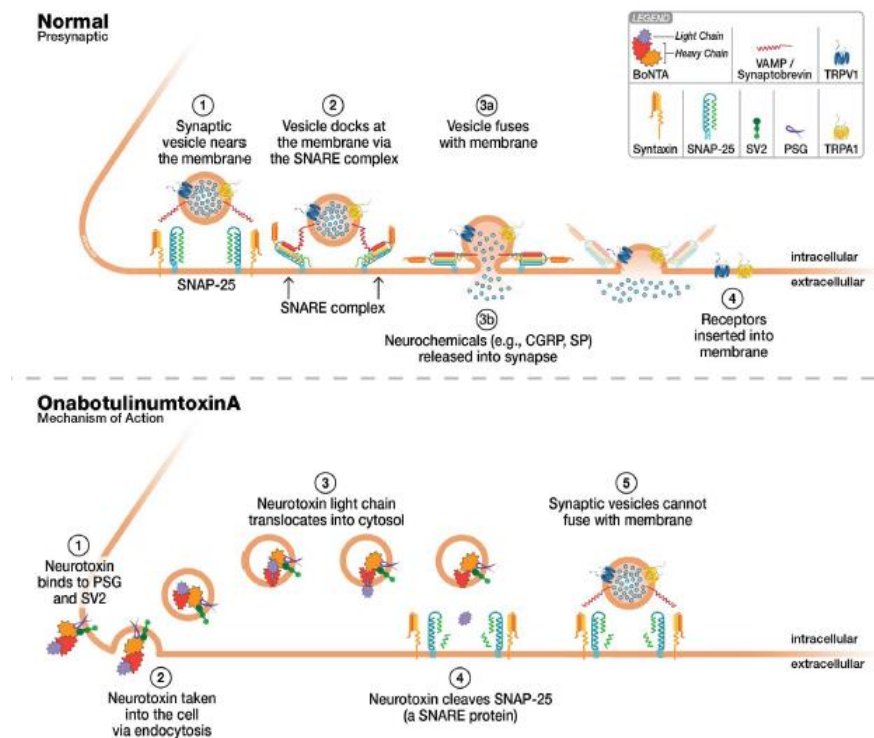
Figura 2 – Representação esquemática do mecanismo de ação da BTX na junção neuromuscular



Fonte: Imagem adaptada de Choudhury *et al.*, 2021.

Nota: **A–H:** representam as sequências de eventos dentro de um terminal sináptico na junção neuromuscular. **A:** Ligação da cadeia pesada da BTX com o receptor de superfície. **B:** A BTX é internalizada por meio de sua interação com Sv2 ou Syt; **C:** Entrada dos prótons na vesícula sináptica por meio de um transportador ativo. **D:** O baixo pH dentro da vesícula auxilia na importação da ACh para dentro do citoplasma; **E:** O domínio de translocação propulso a expulsão da BTX de dentro da vesícula. **F:** As enzimas catalíticas agem sobre a BTX. **G:** A cadeia leve é liberada do restante da toxina; **H:** A cadeia leve, uma vez livre, torna-se ativa e cliva várias proteínas do complexo SNARE (SNAP 25, Stx, VAMP).

Figura 3 – Representação esquemática do mecanismo de ação da toxina botulínica nas sinapses



Fonte: Imagem adaptada de Burstein *et al.*, 2020.

Nota: A figura mostra vesículas sinápticas de núcleo denso se fundindo com a membrana do terminal nervoso na ausência da BTX. Na etapa 4, as vesículas sinápticas liberam os neurotransmissores na sinapse e os canais iônicos (ou receptores) se inserem na membrana do terminal nervoso. O diagrama inferior evidencia as etapas da ação da BTX nos terminais nervosos. Ao final do processo, as vesículas sinápticas não se fundem com a membrana do terminal nervoso, impedindo a liberação de neurotransmissores na sinapse e, por conseguinte, não permitindo a inserção de receptores/canais iônicos na membrana do terminal nervoso.

Ainda há relatos de interação da ciclosporina, a qual pode causar bloqueio neuromuscular e insuficiência ventilatória provavelmente pelo efeito anti-inflamatório ou imunossupressor bloqueando os canais de cálcio musculares ou pré-sinápticos. A D-penicilamina também pode interferir na ação da BTX, pois pode induzir a formação de anticorpos contra o receptor de ACh em indivíduos com predisposição imunológica (Fassi *et al.*, 1999; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Morel *et al.*, 1991).

Outros medicamentos podem agir como bloqueadores antagonistas (tubocarina, pancurônio e galamina) ou agonistas (succinilcolina), os primeiros competem com ACh pelos locais de ligação ao receptor, enquanto os últimos possuem ação despolarizante semelhante à ACh, porém a repolarização muscular da succinilcolina é bem mais lenta do que a ACh (Huang; Foster; Rogachefsky, 2000).

Por fim, o uso de BTX também é contraindicado em algumas condições clínicas como distúrbios de transmissão neuromuscular, tais como Síndrome de Lambert Eaton (LEMS) e Miastenia Gravis (MG). Na LEMS, os anticorpos direcionados contra os antígenos tumorais reagem de forma cruzada com os canais de cálcio envolvidos na liberação de ACh, o que acarreta alteração na transmissão neuromuscular. Já no caso da MG, o quadro é ocasionado por uma degradação e internalização de receptores. A Tabela 1 resume as principais interações medicamentosas e clínicas que contraindicam o uso da BTX (Hoedemaekers; Vriesman; De Baets, 1997; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Small, 2014; Vincent; Lang; Newsom-Davis, 1989; Vincent *et al.*, 1998).

### 1.3 FORMULAÇÕES DISPONÍVEIS DE TOXINA BOTULÍNICA

A BTX possui sete sorotipos, mas apenas a BTX-A e a BTX-B são usadas para formular produtos biológicos comercialmente disponíveis para uso clínico. Os produtos mais conhecidos da BTX-A são a *onabotulinumtoxinA* (BOTOX®; Allergan, Inc., Irvine, CA, EUA), *abobotulinumtoxinA* (Dysport™; Ipsen Biopharm Ltd., Wrexham, UK) e *incobotulinumtoxinA* (Xeomin®; Merz Pharmaceuticals, Frankfurt am Main, Alemanha), enquanto da BTX-B é a *rimabotulinumtoxinB* (Myobloc®; Solstice Neurosciences, LLC, South San Francisco, CA,

EUA, uma subsidiária integral da US WorldMeds, LLC, Louisville, KY, EUA) 1-2,4-7,9-10 (Bellows; Jankovic, 2019; Espinoza *et al.*, 2019; Göschel *et al.*, 1997; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Naumann *et al.*, 2013; Nestor *et al.*, 2021; Sethi *et al.*, 2020; Tomic *et al.*, 2021).

Tabela 1 – Interações medicamentosas e clínicas

<b>Drogas/Doenças</b>	<b>Mecanismos</b>
Terminal nervoso pré-sináptico	
a) Aminoglicosídeos (canamicina, estreptomicina, gentamicina)	a) Bloqueio do canal de cálcio
b) Aminoquinolinas (cloroquina, hidroxicloroquina)	b) Inibir a ligação da toxina botulínica à sinaptotagmina ou processamento lisossomal da toxina
Ciclosporina	Bloqueio do canal de cálcio
Síndrome de Lambert-Eaton	Reação cruzada entre os anticorpos destinados aos antígenos tumorais contra os canais de cálcio
Terminal Nervoso pós-sináptico	
a) Miastenia grave	a) Autoanticorpos direcionados ao receptor nicotínico de Acetilcolina
b) D-penicilamina	b) Desencadeia a formação de anticorpos contra o receptor nicotínico de acetilcolina
Tubocurarina, pancurônio, galamina	Bloqueadores antagonistas pós-sinápticos da acetilcolina
Succinilcolina	Bloqueador agonista pós-sináptico da acetilcolina

Fonte: Elaboração própria, 2025, adaptada de Huang; Foster; Rogachefsky, 2000.

Porém, ainda há outras formulações disponíveis, sendo que algumas são aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), mas não são pela *Food and Drug Administration* (FDA), como a *Prosigne*<sup>®</sup> e *Meditoxina*<sup>®</sup>; mas também ocorre o oposto, como a *Daxxify*<sup>®</sup> (Daxibotulinumtoxina A), aprovada em setembro de 2022 pela FDA, mas ainda sem previsão de aprovação da ANIVSA e, portanto, de comercialização no Brasil (Hanna; Pon, 2019; Solish *et al.*, 2021).

Para além disso, é essencial que os profissionais prescritores e injetores compreendam que, apesar das indicações semelhantes, as formulações possuem diferenças nas suas

propriedades tóxicas e farmacológicas e, portanto, preferencialmente, não devem ser utilizadas de forma intercambiável. A Tabela 2 resume as principais características das formulações mais convencionais e é possível observar que a maioria das formulações necessita ser reconstituída com solução salina normal, pois é liofilizada ou seca a vácuo, exceto a *rima*BTX, a qual encontra-se disponível como solução injetável (Choudhury *et al.*, 2021; Hanna; Pon, 2019; Solish *et al.*, 2021; Sundaram *et al.*, 2016).

Como a quantidade de toxina varia entre as formulações, a unidade de injeção também é variável. Por exemplo, a *ona*BTX (*Botox*<sup>®</sup>) está disponível em frascos de 50/100/200 U, enquanto *abo*BTX (*Dysport*<sup>®</sup>) está disponível em frascos de 300/500 U. Logo, não existe equivalência direta de potência entre as toxinas, porém, para uso clínico, acredita que uma unidade de *Botox*<sup>®</sup> corresponde a 1 unidade 2,5 a 3 unidades de Speywood de *Dysport*<sup>®</sup> e a 1 unidade de *Prosigne*<sup>®</sup>, *Xeomin*<sup>®</sup> e *Botulift*<sup>®</sup> (Gart; Gutowski, 2016; Scaglione, 2016).

Outra diferença refere-se ao tamanho do complexo da toxina que também varia entre as formulações. Anteriormente, acreditava-se que o tamanho molecular do complexo de toxina determinava sua difusividade no tecido. Nessa perspectiva, o *Botox*<sup>®</sup>, que possui o maior complexo, 900kDa, teria a menor capacidade de se difundir. Todavia, os estudos experimentais mostraram que a capacidade de difusão não está relacionada ao tamanho do complexo da toxina (Choudhury *et al.*, 2021; Hanna; Pon, 2019; Naumann *et al.*, 2013; Scaglione, 2016).

A quantidade de excipientes, em especial da albumina sérica humana (HSA), também varia entre as formulações, haja vista que foi aventado a possibilidade de que a HSA pudesse induzir a produção de anticorpos neutralizantes (NABs) do hospedeiro contra a toxina, levando à perda de eficácia. Nesse ínterim, os laboratórios buscaram reduzir a quantidade de HSA nas formulações de toxinas e a *inco*BTX é a que possui a menor concentração entre os produtos aprovados pela FDA dos EUA. Apesar disso, o benefício clínico dessa redução ainda não é totalmente estabelecido (Bellows; Jankovic, 2019; Field *et al.*, 2018; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Naumann *et al.*, 2013; Scaglione, 2016).

Ainda sobre a *inco*BTX, além de possuir menos HSA (carga de proteína de 0,44 ng/100 unidades), como dito acima, ela possui outras especificidades como não necessitar de refrigeração e não reduzir a potência ao longo de 52 semanas de tratamento após a reconstituição. *Botox*<sup>®</sup> também demonstrou estabilidade considerável após a reconstituição enquanto a *Myobloc/Neurobloc*<sup>®</sup> não necessita de reconstituição. A boa estabilidade das toxinas após a reconstituição é importante, pois isso permite a utilização de um único frasco reconstituído em mais de uma pessoa, reduzindo assim, os custos, tanto para o paciente quanto

para o profissional (Choudhury *et al.*, 2021; Frevert; Dressler, 2010; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Naumann *et al.*, 2013; Scaglione, 2016).

Há ainda outras diferenças entre as formulações e o volume de injeção, a concentração da toxina e a dose podem desempenhar papéis significativos nos efeitos terapêuticos e não terapêuticos de formulações individuais (Choudhury *et al.*, 2021; Field *et al.*, 2018). Nessa perspectiva, por exemplo, a *Dysport*<sup>®</sup> apresentou maior duração de ação, porém mais efeitos adversos fora do local alvo em comparação com *Botox*<sup>®</sup>, o que se explica provavelmente pelas maiores quantidades de neurotoxina presente na *aboBTX* (Field *et al.*, 2018; Frevert; Dressler, 2010).

Existem dois outros produtos que são amplamente usados e aprovados na China e na Coreia, são elas, respectivamente: *Prosigne*<sup>®</sup> e *Meditoxin*<sup>®</sup>. A potência da *Prosigne*<sup>®</sup> é próxima ao da *Botox*<sup>®</sup> e possui uma carga proteica mínima de 4–5 ng/100 unidades. Os seus principais excipientes, por frasco, são gelatina 5 mg, dextrano 25 mg e sacarose 25 mg. Já a *Meditoxin*<sup>®</sup> tem uma estrutura bastante similar à *Xeomin*<sup>®</sup> com baixa carga proteica e não requer reconstituição, além disso, pode ser mantida em temperatura ambiente (Choudhury *et al.*, 2021; Frevert; Dressler, 2010; Hanna; Pon, 2019).

Além dessas formulações já conhecidas, há outras recentemente aprovadas ou em estágios finais de desenvolvimento. Uma delas foi aprovada pela FDA em setembro de 2022 e se chama *Daxxify*<sup>®</sup> (*daxibotulinumtoxinA*). Essa formulação é a primeira contendo um peptídeo excipiente estabilizador patenteado (RTP004) ao invés de HSA e uma neurotoxina central altamente purificada de 150kDa (Hanna; Pon, 2019; Solish *et al.*, 2021).

Os estudos demonstraram que o RTP004 carregado positivamente aumentou a ligação da neurotoxina às superfícies neuronais, o que parece aumentar a probabilidade de internalização da neurotoxina e parece explicar maior tempo de duração média dessa formulação, a qual foi de 6 meses, porém, com alguns pacientes chegando a 9 meses (Solish *et al.*, 2021).

Outras mais recentes incluem a *PrabotulinumtoxinA*, *LetibotulinumtoxinA* e a *BotulinumtoxinE*. A primeira é aprovada para uso cosmético desde 2019 pela FDA enquanto a segunda desde 29 de fevereiro de 2024, porém a última ainda não foi aprovada. Uma característica peculiar sobre a BTX-E é que os estudos demonstraram um início de ação rápido, porém um efeito de curta duração (2-4 semanas), tal característica pode ser útil em alguns casos como o controle algico em condições como osteoartrite (Choudhury *et al.*, 2021; Hanna; Pon, 2019).

#### 1.4 USO DA TOXINA BOTULÍNICA NA PRÁTICA MÉDICA

As aplicações injetáveis de BTX são atualmente os procedimentos cosméticos não cirúrgicos mais populares no mercado, de acordo com a Sociedade Americana de Cirurgia Plástica. Paradoxalmente, antes de 1945, pouco se sabia sobre a natureza química da BTX, a qual era chamada de “veneno mais venenoso”. Em 1973, a BTX foi usada na tentativa de paralisar os músculos extraoculares de macacos (Hanna; Pon, 2019; Dhaked *et al.*, 2010; Sundaram *et al.*, 2016).

As primeiras aplicações na prática médica foram realizadas por Scott no início da década de 1980, utilizando-se injeções doses diminutas de BTX para inativar seletivamente a espasticidade muscular no estrabismo. Porém, o valor terapêutico da BTX-A foi reconhecido pela primeira vez em 1989, quando a FDA aprovou a *Oculinum*<sup>®</sup> para o tratamento de estrabismo e blefaroespasma (Colhado; Boeing; Ortega, 2009; Hanna; Pon, 2019; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Naumann *et al.*, 2013).

Posteriormente, no início da década de 90, a BTX começou a ser utilizada para fins estéticos após estudos de tratamento de blefaroplasmo terem percebido amenização das ríides glabellares nos pacientes tratados (Bellows; Jankovic, 2019; Borba; Matayoshi; Rodrigues, 2022; Gimenez *et al.*, 2010; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Nestor *et al.*, 2021; Sethi *et al.*, 2020). Essa observação fez-se presente em outros estudos, os quais demonstraram a diminuição das rugas faciais unilaterais também em pacientes tratados para espasmo hemifacial com BTX-A (Borodic; Cozzolino, 1989; Gimenez *et al.*, 2010; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000).

Tabela 2 – Características das formulações mais convencionais de toxina botulínica

<b>Nome Proprietário</b>	<b>Sorotipo</b>	<b>Tamanho do Complexo</b>	<b>Excipiente</b>	<b>Estabilização e Solubilização</b>	<b>Unidade/Frasco</b>	<b>Concentração de Neurotoxina (ng/frasco)</b>
Botox <sup>®</sup> (onabotulinumtoxinA)	A	900 kDa	HSA (500µg) Cloreto de Sódio	Secagem a vácuo e Solução Salina normal	50, 100, 200	5
Xeomin <sup>®</sup> (IncobotulinumtoxinA)	A	150 kDa	HSA (1 µg) Sacarose	Liofilização e Solução Salina normal	100, 200	0,6
Dysport <sup>®</sup> (AbobotulinumtoxinA)	A	500 kDa	HSA (125 µg) Lactose	Liofilização e Solução Salina normal	300, 500	4,35
Myobloc <sup>®</sup> /Neurobloc <sup>®</sup> (RimabotulinumtoxinB)	B	700 kDa	HSA (500 µg/mL) Succinato de sódio Solução de Cloreto de Sódio	Solução	2000, 5000, 10.000	~25, 50, 100

Fonte: Elaboração própria, 2025, adaptada de Choudhury *et al.*, 2021.

Entretanto, foi somente em abril de 2002 que o uso de BTX-A, através da *onaBTX*, foi aprovado para o tratamento das rírides glabellares pela FDA. Em setembro de 2013 e outubro de 2017, a FDA finalmente aprovou a BTX-A para o tratamento de rugas perioculares e frontais cantais, respectivamente. Portanto, é de longa data que o uso da BTX-A consagrou-se como método eficaz e seguro na terapêutica de rírides secundárias à hiperinesia da musculatura facial (Bellows; Jankovic, 2019; Gimenez *et al.*, 2010; Hanna; Pon, 2019; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Sethi *et al.*, 2020).

Desde então, várias formulações de BTX foram introduzidas no mercado e a BTX consagrou-se como uma modalidade terapêutica segura com poucos efeitos colaterais locais e sistêmicos importantes (Bellows; Jankovic, 2019; Borba; Matayoshi; Rodrigues, 2022; Hanna; Pon, 2019; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000).

Nessa perspectiva, a BTX é utilizada de forma diversificada e ampla nas mais variadas condições clínicas. Dentre elas, encontram-se os diversos distúrbios de espasticidade muscular, o estrabismo, a atenuação das rugas faciais, a hiperidrose, a bexiga hiperativa, enxaqueca crônica, fissura anal, além de outras 150 indicações diferentes (Choudhury *et al.*, 2021; Gart; Gutowski, 2016; Rahman; Alhitmi; Mosahebi, 2022).

Quanto às complicações, descrevem-se efeitos adversos leves como edema e dor local, assimetrias, cefaleia de pequena intensidade, enjoos após aplicação, ptose palpebral discreta, ptose das sobrancelhas, acentuação das bolsas gordurosas em pálpebras inferiores e leve queda da pálpebra inferior. Mais raramente, foram relatadas complicações graves, tais como diplopia, paralisia do músculo reto lateral do olho, ptose palpebral grave, lagofalmo, incompetência do músculo orbicular da boca, disfagia, disfonia, síndrome do olho seco, oftalmoplegia e cefaléia intensa, muitas vezes relacionadas à técnica inadequada de aplicação (Borba; Matayoshi; Rodrigues, 2022; Gimenez *et al.*, 2010; Nestor *et al.*, 2021; Sethi *et al.*, 2020). Na Tabela 3 é possível observar as principais complicações relacionadas à aplicação cosmética da BTX (Sundaram *et al.*, 2016).

Devido ao baixo índice dessas complicações, o uso da BTX tornou-se indiscriminado, mas, mesmo assim, há poucos estudos que abordem os intervalos entre as aplicações, idade de início, evolução das doses utilizadas, imunogenicidade e resistência clínica (Borba; Matayoshi; Rodrigues, 2022; Gimenez *et al.*, 2010; Nestor *et al.*, 2021; Sethi *et al.*, 2020).

Não há consenso no tratamento das rugas faciais com BTX acerca da necessidade de alteração das doses em aplicações consecutivas para a obtenção do mesmo efeito, assim como, a ocorrência de atrofia muscular ou outras alterações clínicas durante o processo, ou se os intervalos entre as aplicações devem ser mantidos ou alterados, e ainda se há relação da resposta

clínica com a imunogenicidade (Borba; Matayoshi; Rodrigues, 2022; Choudhury *et al.*, 2021; Espinoza *et al.*, 2019; Kassir *et al.*, 2019; Naumann *et al.*, 2013; Rahman; Alhitmi; Mosahebi, 2022; Sethi *et al.*, 2020; Small, 2014; Sundaram *et al.*, 2016).

Tabela 3 – Principais complicações relacionadas à aplicação da toxina botulínica para fins estéticos

Localização	Eventos adversos
Terço superior e médio da face	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Assimetria.</li> <li>• Ptose de sobrancelha ou pálpebra.</li> <li>• Revelação da ptose palpebral compensada pré-existente (enfraquecimento do frontal).</li> <li>• Comprometimento da função palpebral/fisiologia ocular (enfraquecimento do músculo orbicular do olho).</li> <li>• Retração da pálpebra inferior/exposição escleral (enfraquecimento do orbicular do olho)</li> <li>• Ptose labial (enfraquecimento dos elevadores labiais ao abordar indicações nasais)</li> </ul>
Terço inferior da face	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Assimetria</li> <li>• Insuficiência motora oral, por exemplo, capacidade prejudicada de levantar ou abaixar o lábio.</li> <li>• Comprometimento da exibição odontológica na animação (sorriso).</li> <li>• Suporte muscular prejudicado da parte inferior da face.</li> <li>• Disfagia (ao atingir o platisma).</li> <li>• Fraqueza no pescoço (ao atingir o platisma).</li> <li>• Boca seca (ao atingir o platisma).</li> </ul>
Qualquer região da face	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Equimose temporária</li> <li>• Hematoma</li> <li>• Edema</li> </ul>

Fonte: Elaboração própria, 2025, adaptada de Sundaram *et al.*, 2016.

As contraindicações absolutas e relativas à injeção de BTX para fins estéticos incluem: cicatrizes queloides, distúrbios neuromusculares (por exemplo, MG e LEMS), alergia aos constituintes do produto de BTX, expectativas irrealistas e transtorno dismórfico corporal, dentre outras. Na Tabela 4 é possível visualizar as contraindicações de forma resumida (Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Small, 2014).

Tabela 4 – Contraindicações absolutas e relativas à aplicação de BTX para fins estéticos

<b>Absolutas</b>	<b>Relativas</b>
1. Distúrbios neuromusculares (por exemplo, Esclerose Lateral Amiotrófica, Miastenia Gravis, Síndrome de Lambert-Eaton, miopatias).	1. Transtorno dismórfico corporal
2. Sensibilidade ou alergia aos constituintes do produto da toxina botulínica (por exemplo, alergia à proteína do leite de vaca com abobotulinumtoxinA - Dysport®)	2. Dependência da expressão facial para subsistência (por exemplo, atores, cantores).
3. Gravidez ou amamentação.	3. Dermatoses na área de tratamento (por exemplo, psoríase, eczema).
4. Infecção na área de tratamento.	4. Imunocomprometido.
5. Fraqueza motora grossa na área de tratamento (por exemplo, Paralisia de Bell).	5. Cicatriz queloidiana.
	6. Expectativas irrealistas

Fonte: Elaboração própria, 2025, adaptada de Small, 2014.

#### **1.4.1 Uso da toxina botulínica para fins estéticos**

Em 2014, a Sociedade Americana de Cirurgia Plástica Estética relatou mais de 3,5 milhões de procedimentos utilizando a BTX. Enquanto isso, a pesquisa da Sociedade

Internacional de Cirurgia Plástica Estética evidenciou mais de 4,8 milhões de procedimentos em todo mundo. Além disso, a pesquisa da Sociedade Americana de Cirurgia Dermatológica de 2013 descobriu um aumento de 20% em comparação com 2012 e essa tendência tem sido observada também na Europa e na Ásia (Sundaram *et al.*, 2016).

A BTX foi aprovada pela primeira vez pela FDA para uso cosmético em 2002 através da formulação *Botox*<sup>®</sup> para tratar as rugas do complexo glabellar formadas em decorrência da atividade dos músculos corrugadores e prócero. Em 2013, foi aprovado o uso para tratar as rugas conhecidas como “pés de galinha”, as quais são formadas devido à contração dos músculos orbiculares laterais perioculares (Small, 2014).

Nessa perspectiva, a BTX tornou-se o tratamento de escolha para ríides tanto do terço superior quanto dos dois terços inferiores do rosto. Além disso, é usado *off-label* para todas as outras indicações faciais cosméticas, como, por exemplo, melhora do contorno facial (Carruthers *et al.*, 2008; Gimenez *et al.*, 2010; Small, 2014; Sundaram *et al.*, 2016).

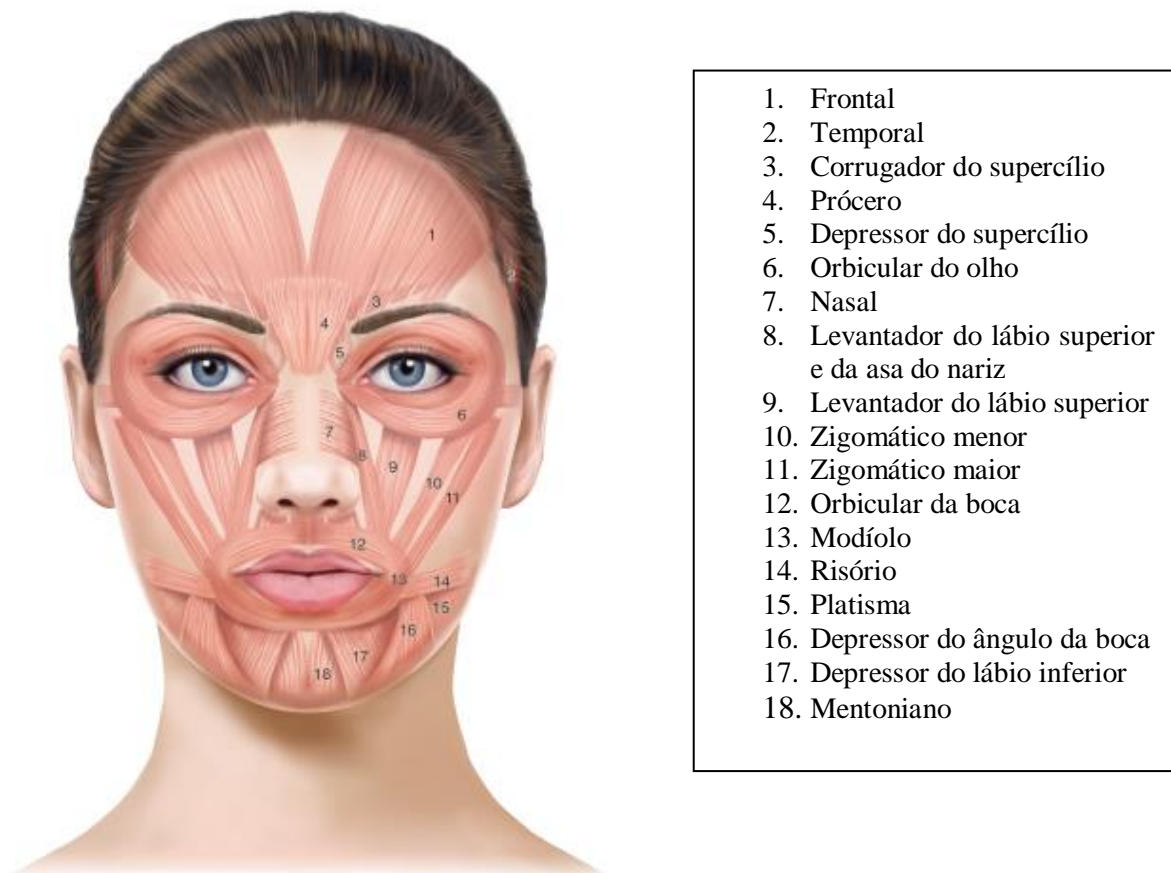
Acerca da reconstituição, alguns estudos sugerem menos dor durante o procedimento após reconstituição com solução salina a 0,9% preservada com ácido benzoico (função bacteriostática) (Sundaram *et al.*, 2016). Além disso, sabe-se que a BTX pode ser reconstituída e manter-se refrigerada por pelo menos 4 semanas antes da injeção, sem risco significativo de contaminação ou diminuição da eficácia, e usada para tratar vários pacientes, desde que haja um manuseio adequado (Gart; Gutowski, 2016; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Sundaram *et al.*, 2016).

Há um dissenso sobre o volume ideal de reconstituição, pois, alguns especialistas, quando desejam maior dispersão da toxina, realizam a reconstituição em maiores volumes e, por conseguinte, volumes maiores de injeção por dose unitária. Enquanto outros preferem volumes menores sob a justificativa de menos dor durante a aplicação e melhor visibilidade pós-procedimento temporária dos locais de injeção (Gart; Gutowski, 2016; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Naumann *et al.*, 2013; Park; Ahn, 2021; Sundaram *et al.*, 2016).

Uma vez definida a reconstituição, o próximo passo é a aplicação e, para tanto, faz-se necessário compreender a anatomia facial e a origem das ríides. Acerca da anatomia muscular facial, vale destacar que os músculos da expressão facial são únicos porque se inserem no tecido mole da pele através do sistema aponeurótico muscular superficial, ao contrário da maioria dos músculos que possuem inserções mais profundas (ósseas). A anatomia está resumidamente representada nas Figura 4 (Gart; Gutowski, 2016; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Small, 2014).

Quanto à origem das rugas, as dinâmicas – aquelas que ocorrem durante a mímica facial – são formadas perpendiculares à direção da contração muscular, haja vista que, quando os músculos faciais se contraem, a pele sobrejacente também se move (Small, 2014). Enquanto isso, as estáticas – aquelas visíveis mesmo em repouso – são formadas justamente pela contração muscular localizada associada à perda gradual e à desorganização das fibras de colágeno e elastina que levam a uma atrofia dérmica local. A Figura 5 mostra as principais rítes da face e sua relação com a atividade muscular local (Carruthers *et al.*, 2008; Small, 2014).

Figura 4 – Anatomia da musculatura da face

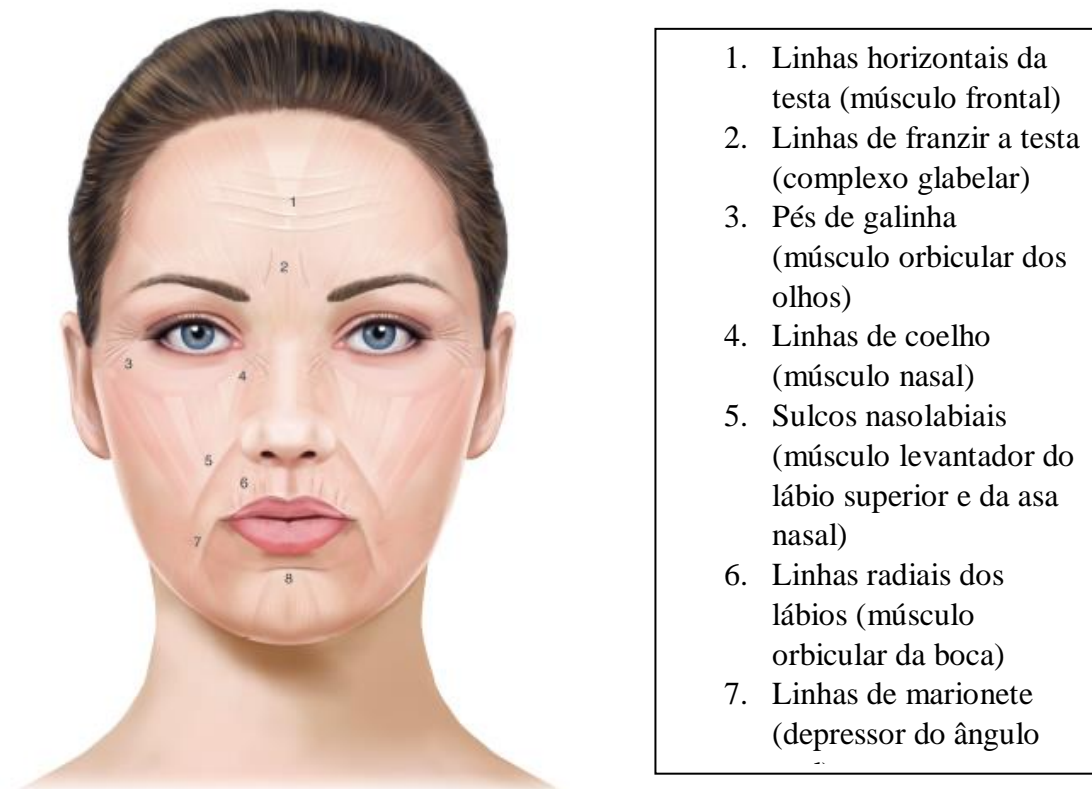


Fonte: Imagem adaptada de Small, 2014.

Vale ressaltar que diferenças genéticas e toxinas ambientais, principalmente a exposição à luz ultravioleta e o tabagismo, podem acelerar o processo de envelhecimento da pele. Na Figura 6 pode se observar esse processo de envelhecimento cutâneo com a formação de rítes e sulcos (Carruthers *et al.*, 2008; Fisher, 2005; Freiman *et al.*, 2004; Lemperle *et al.*, 2001; Small, 2014).

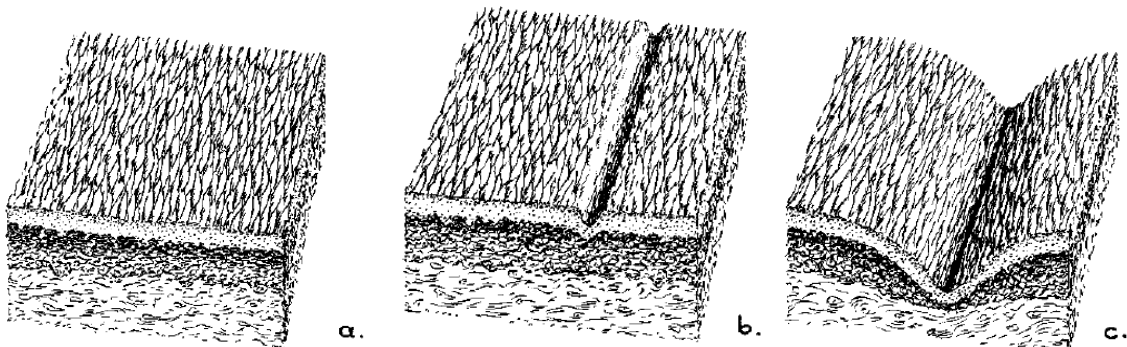
Esse entendimento auxilia na compreensão da origem da nomenclatura das rírides. Por exemplo, as frontais são formadas pela contração do músculo frontal, enquanto as rugas denominadas “pés-de-galinha” são oriundas da atividade do músculo orbicular na sua porção lateral e as glabellares são decorrentes da contração dos músculos depressores do complexo glabellar que incluem o corrugador do supercílio, o prócero e depressor do supercílio (Lemperle *et al.*, 2001; Small, 2014).

Figura 5 – Rírides faciais e músculos associados



Fonte: Imagem adaptada de Small, 2014.

Figura 6 – Alterações da textura da pele ao longo do tempo.



Fonte: Imagem adaptada de Lemperle *et al.*, 2001.

Nota: a) enrugando. b) rugas estáticas c) sulcos/dobras

As Figuras 4 e 5 mostram justamente essa relação entre as rugas de cada região do rosto e o respectivo músculo ou grupo muscular associado (Small, 2014). Nesse contexto, a aplicação de pequenas quantidades de BTX em músculos hiperativos específicos causa relaxamento muscular localizado que suaviza a pele sobrejacente e, por conseguinte, reduz as rugas (Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Small, 2014).

Os resultados mais satisfatórios ocorrem nas rugas dinâmicas, porém há efeito sobre as ríides estáticas, porém é mais lento e pode necessitar de doses maiores além de tratamentos combinado com preenchedores dérmicos ou outros procedimentos cosméticos (Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Small, 2014).

Ainda é válido ressaltar que a duração da ação da BTX pode ser modificada pela quantidade aplicada e a tendência atual é realizar doses menores com intervalos maiores entre as sessões (Espinoza *et al.*, 2019; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Naumann *et al.*, 2013; Rosales; Bigalke; Dressler, 2006; Sundaram *et al.*, 2016). Não obstante o objetivo original do tratamento com BTX era paralisar os músculos alvo, todavia o entendimento atual é que o resultado mais desejável é a modulação da atividade muscular (Small, 2014; Sundaram *et al.*, 2016).

Nesse ínterim, para que se alcance os melhores resultados, é fundamental uma avaliação panfacial e de forma integrada, a qual inclui análise anatômica e funcional da musculatura no contexto da morfologia facial e do status qualitativo e quantitativo dos tecidos. Os testes de estiramento da pele auxiliam bastante nessa definição, pois revelam a qualidade do tecido mole e a etiologia das ríides (Gart; Gutowski, 2016; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Small, 2014; Sundaram *et al.*, 2016).

Feito essa avaliação, define-se em quais locais há indicação de modulação da atividade muscular, isto é, de aplicação da BTX; e em quais locais há indicação de reposição de volume, ou seja, do uso de preenchedores (Gart; Gutowski, 2016; Small, 2014; Sundaram *et al.*, 2016).

Nesse processo é essencial estabelecer um bom relacionamento médico-paciente, avaliar os objetivos dos pacientes no contexto do que é visto no exame, e fornecer educação ao paciente. A educação verbal ainda pode ser complementada por folhetos escritos, recursos visuais, mídia audiovisual e conteúdo de sites da Internet (Carruthers *et al.*, 2004; Klein, 2004; Nguyen; Hong; Prose, 2013; Sundaram *et al.*, 2016).

## 1.5 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CLÍNICA NA DERMATOLOGIA

Os resultados à aplicação da BTX para fins estéticos podem ser comunicados aos pacientes através de escalas validadas de classificação de rugas e por meio de programas de software que retratam mudanças relacionadas à idade. A avaliação facial deve ser abrangente e incluir a observação estática e dinâmica. Além disso, a imagem dinâmica espontânea de um paciente é melhor do que a observação dinâmica sob comando, a primeira torna a avaliação pré-tratamento mais precisa (Goodman *et al.*, 2012; Small, 2014; Sundaram *et al.*, 2016).

Portanto, a avaliação se inicia antes mesmo da anamnese e do exame físico formal. Na perspectiva de avaliação integrada e panfacial, a massa muscular individual, a anatomia e o padrão de contração geralmente orientam a dosagem e a técnica de aplicação da BTX. Nesse ínterim, é útil usar escalas de classificação validadas para massa muscular e palpar os músculos enquanto os visualiza (Almeida *et al.*, 2012; Gart; Gutowski, 2016; Monheit *et al.*, 2012; Sundaram *et al.*, 2016).

Por outro lado, não há consenso sobre a melhor escala de avaliação das rugas e nem há uma padronização sobre a metodologia que seria mais adequada para avaliar a resposta clínica à aplicação da BTX para fins estéticos. Nesse contexto, há uma ampla variedade de escalas, com distintas metodologias, mas, em sua maioria, avaliando apenas as ríides estáticas e através da comparação de fotografias por meio da opinião de especialistas (Almeida *et al.*, 2015; Carruthers *et al.*, 2016; Fujino; Iwanaga, 2022; Lemperle *et al.*, 2001; Sundaram *et al.*, 2016).

Porém, há outras formas de avaliação, utilizando-se de diferentes de métodos, os quais incluem desde a análise tridimensional da superfície da pele até o uso do sistema de aprimoramento de recursos de imagem baseado em ilusão visual (VIS), o qual geralmente é aplicado para avaliar rachaduras em concreto, mas já foi estudado para criar uma forma de avaliar as ríides finas e dinâmicas (Carruthers *et al.*, 2008; Fujino; Iwanaga, 2022; Heckmann; Schön-Hupka, 2001; Jacobi *et al.*, 2004).

O dissenso existente sobre a melhor forma de avaliar as rugas dificulta uma padronização nos estudos que buscam avaliar a resposta clínica à aplicação de BTX para fins estéticos (Alexiades-Armenakas, 2006; Carruthers *et al.*, 2008; Kane, 2003). Alguns estudos, inclusive, utilizam-se apenas de uma análise subjetiva do próprio participante sobre o quanto ele rejuvenesceu em anos (Carruthers *et al.*, 2015; Sundaram *et al.*, 2016).

Partindo desse pressuposto, buscando uma padronização, alguns grupos e sociedades estabeleceram alguns métodos para a avaliação clínica das ríides como, por exemplo, o Grupo Europeu para Medições de Eficácia em Cosméticos e Outros Produtos Tópicos e o Comitê da Força-Tarefa do Japão para Avaliação da Função Antienvhecimento (Carruthers *et al.*, 2008; Hatzis, 2004; Heckmann; Schön-Hupka, 2001; Jacobi *et al.*, 2004; Sundaram *et al.*, 2016).

Os métodos preconizados pelas diretrizes japonesas incluem avaliação visual ou fotográfica, que necessita da opinião de especialistas comparando fotografias; métodos *in vivo*, que incluem análise tridimensional da superfície facial e das rugas, mas sem uso de réplicas; e, por fim, dos métodos de réplica, que podem conter análise bi ou tridimensional (Fujino; Iwanaga, 2022; Seck *et al.*, 2020).

Por outro lado, todos esses métodos possuem vantagens e desvantagens próprias, mas convergem para uma mesma limitação que é o fato de só avaliarem as rugas em faces neutras com operadores qualificados ou uso de aparato tecnológico muito específico (Batool; Chellappa, 2015; Fujino; Iwanaga, 2022; Seck *et al.*, 2020).

Além disso, sabe-se que as estruturas das rugas variam conforme a expressão facial e o ambiente circundante, e estes são fatores determinantes para o reconhecimento das ríides em nosso cotidiano. Nessa perspectiva, os estudos têm buscado desenvolver métodos que permitem a avaliação em tempo real (Carruthers *et al.*, 2008; Fujino; Iwanaga, 2022; Hatzis, 2004; Heckmann; Schön-Hupka, 2001). Para exemplificar, Fujino e Iwanaga (2022) buscaram desenvolver um método de avaliação quantitativo e qualitativo das rugas em apenas uma imagem e, para o qual, utilizaram-se de um sistema de aprimoramento de VIS.

Como se pode observar, ao longo dos anos, muitos sistemas foram criados buscando avaliar a gravidade das rugas e, vários desses métodos de avaliação, provaram sua utilidade tanto nas opções de tratamento das ríides bem como na avaliação dos diversos processos de envelhecimento cutâneo, como o fotoenvelhecimento e nas rugas faciais associadas ao tabagismo em jovens. Alguns desses sistemas baseiam-se na avaliação da espessura cutânea, a qual consegue ser mensurada através da ultrassonografia, ou técnica xerorradiográfica. (Alexiades-Armenakas, 2006; Batool; Chellappa, 2015; Carruthers *et al.*, 2008; Fujino; Iwanaga, 2022; Hatzis, 2004; Heckmann; Schön-Hupka, 2001; Jacobi *et al.*, 2004; Kane, 2003; Lemperle *et al.*, 2001; Seck *et al.*, 2020; Shoshani *et al.*, 2008).

Um adendo válido é que a espessura da derme aumenta linearmente até a idade de 20 anos e depois diminui linearmente ao longo dos anos. Além disso, varia a depender da etnia, dos fatores genéticos e do local de medição (Lemperle *et al.*, 2001).

Por exemplo, a espessura dérmica no antebraço medial varia de 0,6 a 1,0 mm em mulheres e de 0,8 a 1,2 mm em homens. Nos braços ou pernas, a espessura dérmica média é de 1,32 mm, no tórax de 1,62 mm e no dorso de 2,50 mm. No rosto, a espessura varia de cerca de 0,2mm nas pálpebras, passando por aproximadamente 0,4mm nos cantos da boca, cerca de 0,6mm nos sulcos nasolabiais, até aproximadamente 0,8mm na derme glabellar (Lemperle *et al.*, 2001).

Esses sistemas conseguem mensurar de forma objetiva, quantitativa e até qualitativa, no entanto, necessitam de aparato tecnológico sofisticado como fotoimagem, ultrassonografia de alta frequência, fluorescência multifotônica e microscopia de segunda geração harmônica (Lemperle *et al.*, 2001; Shoshani *et al.*, 2008).

Diante desse contexto, os sistemas de classificação mais simples, baseados na comparação de fotografias, são mais populares no contexto clínico e há vários destes que já são validados, com complexidade variável e com distintos graus de reprodutibilidade e confiabilidade, tais como a escala de Fitzpatrick, de Lemperle, de Glogau e a de Hamilton. (Lemperle *et al.*, 2001; Shoshani *et al.*, 2008).

## 1.6 AUSÊNCIA DE RESPOSTA CLÍNICA E IMUNOGENICIDADE

Não há um consenso quanto à terminologia usada para descrever os resultados clínicos da aplicação da BTX. Na maioria das vezes os termos “imunogenicidade”, “não resposta primária” e “não resposta secundária” não são empregados corretamente, o que causa confusão e dificulta a padronização nos estudos e na busca científica. Assim sendo, é mister definir cada termo. (Bellows; Jankovic, 2019; Dressler, 2004; Naumann *et al.*, 2013).

A imunogenicidade é a capacidade de um complexo proteico de induzir a formação de anticorpos e uma das causas da ausência de resposta clínica tanto primária, quanto, principalmente, secundária. Dois tipos distintos de anticorpos podem se formar após a exposição aos produtos da BTX: neutralizantes e não neutralizantes (Bellows; Jankovic, 2019; Gart; Gutowski, 2016; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Naumann *et al.*, 2013; Rahman; Alhitmi; Mosahebi, 2022).

Os NABs são direcionados à neurotoxina central, particularmente ao sítio de ligação na cadeia pesada, e os anticorpos não neutralizantes, são tipicamente direcionados a NAPs ou locais clinicamente irrelevantes na neurotoxina central e que não afetam a eficácia clínica (Espinoza *et al.*, 2019; Gonnering, 1988; Naumann *et al.*, 2013; Rosales; Bigalke; Dressler, 2006; Stephan; Habre; Tomb, 2014; Tomic *et al.*, 2021).

Todavia, a simples presença desses anticorpos não prediz a ausência de resposta clínica, haja vista que, alguns pacientes, mesmo com NABs, preservam a sensibilidade normal às BTX e seguem respondendo ao tratamento (Brin *et al.*, 2008; Carruthers *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2009; Naumann *et al.*, 2013).

Já o termo “não resposta primária” (ou ausência de resposta primária – ARP) refere-se à situação em que os pacientes não respondem à BTX desde a sua primeira aplicação. Enquanto,

a não resposta secundária (ou ausência de resposta secundária - ARS) ocorre quando há resposta clínica pelo menos na primeira injeção de BTX e depois há perda (parcial ou completa) desse efeito nas aplicações posteriores (Bellows; Jankovic, 2019; Dressler, 2004).

Ainda sobre a ARP, ou “resistência primária” segundo alguns autores, há vários estudos evidenciando que alguns pacientes nunca responderam à aplicação de BTX, logo, são “não respondedores primários”. A ARP é entendida como uma resposta < 25% desde a primeira injeção, mesmo após duas a três aplicações consecutivas de dosagens crescentes (Bellows; Jankovic, 2019; Hsiung *et al.*, 2002).

A etiologia é pouco discutida ou compreendida, pois é um evento raro em populações clínicas. Algumas causas aventadas incluem a presença de contraturas, músculos injetados erroneamente, imunização prévia contra BTX e baixa dosagem (Bellows; Jankovic, 2019; Ramirez-Castaneda; Jankovic, 2013).

Além disso, devido à heterogeneidade na resposta à BTX, alguns estudiosos propuseram a possibilidade de predisposição genética à não responsividade primária. Nessa perspectiva, um estudo avaliou um banco de dados de genoma buscando mutações nos genes que codificam os sítios de ligação das proteínas BTX-A e BTX-B e nos sítios de clivagem. Isso poderia explicar a existência da resistência primária. No entanto, tais mutações eram inexistentes ou extremamente raras, sugerindo consistentemente que os pacientes geralmente não carregam mutações genéticas que afetam a atividade de ligação ou clivagem de BTX (Bellows; Jankovic, 2019; Pirazzini *et al.*, 2018).

Outra hipótese para essa heterogeneidade na resposta clínica à BTX seria uma predisposição genética variada para a formação de NABs devido a diferentes complexos principais de histocompatibilidade (MHC) (Atassi *et al.*, 2011; Bellows; Jankovic, 2019). Ainda há outros estudos evidenciando que uma minoria de pacientes apresenta uma resposta imune variável ao desenvolver sintomas semelhantes aos da gripe e elevação de níveis séricos de citocinas após aplicação da BTX. Em um estudo prospectivo, 19 de 117 pacientes (16,3%) desenvolveram esses sintomas e apresentaram níveis significativamente mais altos de quimiocina IP10 (Bellows; Jankovic, 2019).

Vale ressaltar que o diagnóstico de ARP ainda pode estar incorreto, haja vista que algumas condições clínicas podem ser confundidas com resistência primária à BTX. Para exemplificar, a apraxia de abertura palpebral pode ser confundida com blefaroespasmos ou pseudodistonia com distonia, além da existência de anterocollis na distonia cervical (DC). (Albanese *et al.*, 2013; Dressler, 2004).

Todas essas condições podem levar a uma interpretação errônea de resposta inexistente à BTX quando, na verdade, são apenas condições clínicas difíceis de serem tratadas. Esses distúrbios "pseudo-não-responsivos" são mais prevalentes do que a verdadeira não responsividade primária imunomediada (Bellows; Jankovic, 2019).

Muitos fatores podem influenciar a imunogenicidade de terapêuticas biológicas, como as BTXs. Eles podem estar relacionados ao próprio produto ou ao tratamento. Dentre os aspectos relacionados ao produto, estão inclusos os processos de fabricação, fonte da toxina, toxina inativa, carga de proteína antigênica e presença de proteínas acessórias e excipientes. Já relacionado ao tratamento destaca-se a dose utilizada, intervalos de tratamento e exposição prévia ou vacinas (Brin *et al.*, 2008; Dressler, 2004; Gart; Gutowski, 2016; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Müller *et al.*, 2009; Naumann *et al.*, 2013).

Paradoxalmente, diferentemente dos pacientes que não respondem já na primeira aplicação de BTX, há outros que respondem consistentemente às primeiras injeções e depois perdem resposta nas aplicações posteriores. Esse é o conceito de resistência secundária à aplicação de BTX (ou ARS). Uma das causas associadas é a formação de NABs induzida pelas proteínas acessórias presentes (mesmo que em baixas doses) nas formulações atuais de BTX (Brin *et al.*, 2008; Dressler, 2004; Gart; Gutowski, 2016; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Naumann *et al.*, 2013; Rahman; Alhitmi; Mosahebi, 2022).

Porém, a imunogenicidade relacionada à BTX não é a principal causa de resistência secundária. Dose insuficiente, seleção muscular inadequada ou técnica inadequada são causas mais frequentes. Outras causas são progressão natural da doença, condições clínicas difíceis de serem tratadas (tal qual foi citada anteriormente relacionada à ARP como anterocolis prévio na DC) e discordância entre a percepção de benefício do paciente e do médico injetor (Brin *et al.*, 2008; Dressler, 2004; Gart; Gutowski, 2016; Naumann *et al.*, 2013).

Uma parcela dos pacientes com ARS realmente apresenta formação de NABs. Nesse contexto, evidenciou-se que a grande maioria dos pacientes (cerca de 81%) tende a iniciar com uma perda de resposta parcial antes de progredir para uma perda de resposta total após uma média de 2,5 aplicações de BTX (Dressler, 2004). Todavia, há distintos ensaios para NABs, o que explica a alta variabilidade na frequência desses anticorpos entre os mais diferentes estudos e, por conseguinte, a baixa correlação entre a presença deles e a resposta clínica (Bellows; Jankovic, 2019).

No geral, o surgimento de NABs tem sido classicamente atribuído a intervalos de dosagem mais curtos (injeções de reforço), doses de injeção mais altas (por exemplo, condições neurológicas) e a presença de proteínas antigênicas em fórmulas de BTX (como *rimaBTX*).

Como doses mais altas são indicadas para condições neurológicas, agrupar esses estudos com pesquisas sobre indicações estéticas pode levar a viés, principalmente quando esses dados são usados para comparar tipos de BTX-A (Espinoza *et al.*, 2019; Gonnering, 1988; Göschel *et al.*, 1997; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Naumann *et al.*, 2013; Stephan; Habre; Tomb, 2014; Tomic *et al.*, 2021).

Na contramão dessa perspectiva, tem se observado que intervalos curtos de injeção e doses maiores são cada vez mais frequentes, apesar de uma consistente relação inversa entre o intervalo e entre as doses com a presença dos NABs. Esse contexto pode ser explicado pelo fato de que os pacientes frequentemente observam duração dos benefícios inferior a 3 meses e apresentam um pico de insatisfação pouco antes da próxima injeção, quando os efeitos benéficos da BTX aplicada começam a desaparecer (Bellows; Jankovic, 2019; Gart; Gutowski, 2016; Naumann *et al.*, 2013; Sundaram *et al.*, 2016).

Partindo desse princípio, dado o risco de a ARS tornar-se cada vez mais prevalente, há uma demanda crescente pelo desenvolvimento de formulações de BTX com menor risco de imunogenicidade e maior tempo de duração dos efeitos benéficos (Dressler *et al.*, 2014a; Naumann *et al.*, 2013; Rahman; Alhitmi; Mosahebi, 2022).

## 1.7 MÉTODOS DE DETECÇÃO DOS ANTICORPOS NEUTRALIZANTES

A imunogenicidade pode ser a causa da ausência de resposta clínica e, nesse contexto, é primordial entender os diferentes métodos de detecção e quantificação dos NABs. Por outro lado, os diferentes estudos utilizam distintos métodos, o que dificulta a padronização e avaliação entre os estudos. Há diversos ensaios laboratoriais existentes (Tabela 5) para poder detectar a presença de possíveis NABs (Bellows; Jankovic, 2019).

Eles podem ser classificados em ensaios estruturais e bioensaios. ELISA e imunoprecipitação (IPA) detectam anticorpos contra BTX com sensibilidade considerável, porém não conseguem diferenciar os anticorpos neutralizantes dos não neutralizantes. Já os bioensaios como o MPA ou MHDA utilizam animais para detectar os NABs e o primeiro tem sido considerado o “padrão ouro” na detecção e medição quantitativa dos NABs (Dressler; Bigalke, 2017; Hanna; Jankovic; Vincent, 1999; Naumann *et al.*, 2013).

O MPA é realizado através da incubação de uma quantidade padronizada de neurotoxina no soro de um paciente. Posteriormente, esta neurotoxina é administrada via injeção intraperitoneal em vários camundongos e os resultados baseiam-se no número de camundongos que sobrevivem devido aos efeitos dos NABs no soro do paciente. Estudos iniciais mostraram

baixa sensibilidade (47%), mas alta especificidade (100%), sem falso-positivos entre pacientes positivos no MPA (Bellows; Jankovic, 2019).

Tabela 5 - Métodos de detecção de anticorpos neutralizantes

<b>Métodos de Detecção</b>
Ensaio de Proteção do Camundongo ( <i>ou Mouse Protection Assay - MPA</i> )
Ensaio do Hemidiafragma do Camundongo ( <i>Mouse Hemidiaphragm Assay – MHDA</i> )
Ensaio de Imunoprecipitação ( <i>Immunoprecipitation Assay – IPA</i> )
Ensaio de Western Blot ( <i>Western Blot Assay – WBA</i> )
Ensaio de Inibição de Sinaptossomas ( <i>Synaptosome Inhibition Assay – SIA</i> )
Ensaio de Imunoabsorção Enzimática ( <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay – ELISA</i> )
Teste do Esternocleidomastoideo ( <i>Sternocleidomastoid Test – SCMT</i> )
Estimulação elétrica do músculo injetado ( <i>Electrical Stimulation of Injected Muscle</i> )
Outros ensaios ( <i>por exemplo, sudomotor, teste do suor com ninidrina - NST</i> )
Testes clínicos ( <i>Injeção unilateral de sobrelanceira – UBI; Teste de anticorpos do Músculo Frontal – FTAT</i> )

Fonte: Elaboração própria, 2025, adaptada de Bellows; Jankovic, 2019.

Alguns estudos usaram uma versão qualitativa do MPA enquanto outros o compararam com o IPA. Ambos evidenciaram sensibilidade e especificidade semelhantes sem falso-positivos. Vale ressaltar ainda que o MPA não é um ensaio ideal, pois é demorado, caro, semiquantitativo e requer o sacrifício de animais e um laboratório bem estruturado. Este ensaio, apesar de caro, ainda se encontra comercialmente disponível (Bellows; Jankovic, 2019; Hanna; Jankovic; Vincent, 1999).

Sobre o MHDA, utiliza-se o hemidiafragma esquerdo e o nervo frênico de um camundongo, os quais são colocados em uma câmara de órgãos. Posteriormente, uma combinação de soro mais neurotoxina é aplicada no ensaio e mede-se o tempo para atingir metade do máximo de uma força de contração induzida eletricamente. O tempo mensurado possui associação linear com a quantidade de NABs no soro adicionado ao ensaio (Bellows; Jankovic, 2019).

O MHDA demonstrou ser 25 vezes mais sensível que o limite de detecção do MPA. Todavia, essa alta sensibilidade trouxe preocupação em relação a uma maior taxa de falso-positivos (ou pelo menos detecção de anticorpos de relevância clínica incerta) e, portanto, dificuldade em prever ARS. Paradoxalmente, devido ao menor tempo para resultados, menor

utilização de animais e menor sofrimento animal, além de maior sensibilidade, alguns estudiosos têm defendido a substituição do MPA pelo MHDA (Dressler *et al.*, 2000; Dressler, 2004; Dressler; Bigalke, 2017; Lange *et al.*, 2009).

Porém, observou-se que pacientes detectados com NABs pelo MHDA, ainda continuaram a responder. Tal fato sugere fortemente que o MPA é clinicamente mais significativo do que o MHDA e isso pode explicar a variabilidade e diversidade dos estudos sobre ausência ou perda de resposta clínica (Dressler *et al.*, 2000; Dressler, 2004; Dressler; Bigalke, 2017; Lange *et al.*, 2009).

Sobre os ensaios estruturais, apesar de não haver a possibilidade de diferenciação entre o anticorpo neutralizante e o não neutralizante, há uma vasta utilização deles como testes de triagem seguidos de bioensaios confirmatórios. Dentre os estruturais, há os testes ELISA, os quais foram mais utilizados no passado, mas sem uma avaliação clara de sua qualidade. Mais recentemente, um estudo foi desenvolvido a fim de comparar a especificidade e sensibilidade das versões ELISA de várias concentrações de antígeno de BTX-A1, usando os resultados do MHDA como padrão de referência (Bellows; Jankovic, 2019).

Ao ajustar o valor de corte do resultado positivo, os autores foram capazes de calibrar o ELISA para a sensibilidade máxima (sensibilidade de 100% e especificidade de 55%) ou especificidade máxima (especificidade de 100% e sensibilidade de 90%) conforme os resultados referenciados determinados através do teste MHDA. A IPA apresentou uma sensibilidade mais alta (77-90%) versus MPA (30-50%), mas uma especificidade mais baixa (81-89%) versus MPA (100%), usando responsividade clínica – Injeção unilateral de sobrelha (UBI) e Teste de anticorpos do Músculo Frontal (FTAT) – como resultados de referência (Dressler *et al.*, 2000; Dressler, 2004; Hanna; Jankovic; Vincent, 1999).

Seguindo essa linha de raciocínio, ainda se observou grande variabilidade nas sensibilidades e especificidades encontradas com outras diluições de soro e concentrações de antígenos. Por fim, ainda adiciono que, similar aos demais estudos, o valor do teste parecia estar em sua sensibilidade e potencial de triagem, por conseguinte, os bioensaios, como MHDA e MPA, seguem sendo necessários como testes de confirmação (Dressler *et al.*, 2000; Dressler, 2004; Dressler *et al.*, 2014b; Dressler; Bigalke, 2017; Lange *et al.*, 2009).

Nesse contexto, é perceptível que há uma dificuldade de acesso a métodos confiáveis e que dispensem o sacrifício de animais. Portanto, o interesse por testes clínicos de imunorresistência tem crescido, pois são de fácil acesso e interpretação com boa correlação com a resposta terapêutica. Dentre eles, destacam-se: UBI, FTAT, Teste do

Esternocleidomastoideo (SCMT) e Teste do suor com ninidrina (NST) (Bellows; Jankovic, 2019).

O UBI é um teste de triagem e consiste na aplicação padrão de BTX na sobrancelha medial direita (por convenção), com reavaliação após 1-3 semanas para observar se o paciente está assimétrico (sinal de ausência de resistência clínica) ou não. Ele apresentou boa correlação com MPA, Western Blot e IPA, o que confere maior confiabilidade na sua interpretação (Brin *et al.*, 2008).

O FTAT é similar ao UBI, porém com aplicação no músculo frontal e posterior avaliação de assimetria no enrugamento da testa e elevação da sobrancelha. Dado o resultado inestético mais evidente, esse teste não tem sido tão utilizado (Hanna; Jankovic; Vincent, 1999; Hanna; Jankovic, 1998). No SCMT, a contração máxima do SCM do paciente é medida através de dois eletrodos de superfície antes e depois da aplicação de BTX e, posteriormente, avalia-se a redução na contração (Bellows; Jankovic, 2019; Dressler; Bigalke; Rothwell, 2000).

Já o NST é realizado em uma sala com umidade e temperatura controladas e o paciente pressiona a palma da mão sobre um papel, o qual é tingido e fixado com solução de ninidrina a 1%, depois é aplicado BTX na eminência hipotenar e o teste é repetido em 3 semanas e as lâminas coradas com ninidrina são comparadas para determinar a área de anidrose. Os dados do NST sugerem que ele pode ser capaz de detectar resistência subclínica (Bellows; Jankovic, 2019; Voller *et al.*, 2004).

Nessa conjuntura, diante de tantos métodos e achados, é válido ressaltar a importância da padronização de um método para testar NABs. Além disso, faz-se necessário o desenvolvimento de um método com alta sensibilidade e especificidade, capaz de detectar os NABs clinicamente relevantes, mas que não se utiliza de animais (Bellows; Jankovic, 2019; Voller *et al.*, 2004).

## 2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A toxina botulínica é uma das mais potentes neurotoxinas de longa duração e possui diversas finalidades terapêuticas, sendo utilizada para fins oftalmológicos, neurológicos, dermatológicos, urológicos e tantos outros. No início da década de 90, ela começou a ser utilizada para fins estéticos visando atenuação das ríides faciais e, devido ao baixo índice de complicações locais e sistêmicas, associado à sua eficácia e duração de sua ação, consolidou-se como uma das terapêuticas estéticas mais amplamente utilizadas em todo mundo.

Com o passar dos anos, novos estudos foram surgindo acerca do tema e a indústria farmacêutica passou a investir cada vez mais no aprimoramento das formulações comercialmente disponíveis. Nesse ínterim, começaram a surgir os primeiros trabalhos mostrando indivíduos que apresentavam pouca ou nenhuma resposta clínica à aplicação de BTX. Logo então, os estudos começaram a buscar fatores associados a não resposta clínica e suscitou algumas possibilidades como técnica inadequada, dose insuficiente, prognóstico da patologia de base a ser tratada, músculos injetados incorretamente, dentre outros.

Nesse contexto, um dos principais fatores estudados foi a indução de formação de NABs contra a toxina botulínica pelas proteínas presentes nas formulações comercialmente disponíveis. Assim sendo, as formulações foram aprimoradas, visando diminuir a carga antigênica, objetivando reduzir a imunogenicidade associada à aplicação de BTX. Porém, os trabalhos que mostraram essa relação, em sua maioria, estudaram as condições neurológicas, as quais utilizam doses e intervalos diferentes das condições dermatológicas. Além disso, os estudos que utilizaram a BTX com fins estéticos não conseguiram comprovar a existência dessa relação.

Por outro lado, há poucos trabalhos na área estética quando se compara com aqueles do âmbito neurológico. Para além, na prática clínica, tem-se tornado cada vez mais frequente, a presença de indivíduos que não respondem à aplicação da BTX, independente da formulação comercial utilizada. Desse modo, avaliar se há relação entre a imunogenicidade e a ausência de resposta clínica à BTX injetada com fins estéticos é fundamental. Afinal, a área da estética segue em constante expansão e o Brasil é um dos principais consumidores.

Portanto, a hipótese deste estudo é que a resposta clínica ausente ou reduzida à aplicação de BTX para fins estéticos está relacionada à presença de anticorpos antitoxina (AATx).



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Analisar se a ausência de resposta clínica (ou pouca resposta) à aplicação da toxina botulínica para fins estéticos possui relação com os níveis de anticorpos antitoxina.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Investigar fatores associados à ausência ou diminuição da resposta clínica à aplicação de toxina botulínica para fins estéticos.
- b) Analisar variáveis relacionadas à possível dissociação de indivíduos que apresentam altos níveis de anticorpos antitoxina, mas que não apresentam ausência ou perda de resposta clínica.
- c) Avaliar a aplicabilidade e eficácia de um método de avaliação de rugas.



## 4 METODOLOGIA

### 4.1 COMITÊ DE ÉTICA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM, CAAE 67961923.9.0000.5154, número do parecer 6.036.837 (Anexo A).

Os termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foram devidamente explicados para cada participante antes da assinatura de cada um deles. Os termos permanecerão guardados, assim como os demais dados relacionados aos participantes da pesquisa, pelo período de cinco anos (conforme exigência do CEP) e poderão ser solicitados a qualquer momento pelo CEP ou por qualquer participante da pesquisa.

### 4.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO

O estudo foi realizado em duas etapas e cada etapa ocorreu em dois locais diferentes.

A primeira etapa ocorreu no Ambulatório de Dermatologia que se localiza no Ambulatório de Especialidades do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC UFTM). Esse local possui a estrutura física necessária para a aplicação da toxina botulínica, realização das fotografias e coleta das amostras sanguíneas.

A segunda etapa foi realizada no Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas e Naturais (ICBN) da UFTM.

### 4.3 SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES

A seleção dos participantes foi por conveniência e o estudo selecionou 34 participantes, sendo 17 de cada sexo, dentre pacientes já acompanhados no Ambulatório de Cosmiatria do Serviço de Dermatologia do HC UFTM e que desejavam melhorar as ríides faciais.

### 4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Os critérios de inclusão desse estudo abarcaram indivíduos de ambos os sexos (respeitando a proporção de 1:1) com idade entre 25-45 anos, com desejo de melhorar as ríides

faciais e sem história prévia de aplicação de toxina botulínica, independentemente da finalidade que ela tenha sido realizada.

Desse modo, uniformizamos melhor a coorte quanto à idade e sexo, os quais são fatores diretamente relacionados à resposta clínica. Além disso, ao escolhermos apenas pacientes “virgens” de aplicação de BTX, reduzimos os potenciais fatores de confusão e viés, haja vista que exposição prévia à BTX, unidades acumuladas de BTX e os intervalos de aplicação influenciam diretamente na imunogenicidade e, conseqüentemente, na resposta clínica (Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Naumann *et al.*, 2013; Tomic *et al.*, 2021).

Já os critérios de exclusão foram: indivíduos portadores de distúrbios neuromusculares, doenças sistêmicas graves e alergia a quaisquer dos componentes da toxina botulínica, sinais inflamatórios ou infecciosos nos locais de aplicação, gestantes ou lactantes, e cirurgia facial no período avaliado. Além disso, foram excluídos indivíduos em uso de alguns medicamentos com potencial de interação com a toxina botulínica no período de 15 dias antes das aplicações, tais como: aminoglicosídeos, espectinomicina, bloqueadores dos canais de cálcio, relaxantes musculares, ácido acetilsalicílico ou vitamina E em altas doses.

#### 4.5 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo piloto clínico intervencionista e prospectivo com uma amostra por conveniência. Ele foi dividido por etapas conforme está descrito abaixo.

##### 4.5.1 1ª etapa

Os indivíduos compareceram ao Ambulatório de Dermatologia em três momentos distintos: D0, D1 (15-21 dias após o D0) e D2 (120 dias após o D0). No D0, eles foram submetidos à aplicação da toxina botulínica pela primeira vez. No D1, eles compareceram para uma nova aplicação visando melhorar as rugas residuais e, por fim, no D2, não houve aplicação de BTX.

Nos três momentos, antes da aplicação de BTX, houve coleta de amostra sanguínea e registro fotográfico padronizado tanto em repouso quanto no padrão dinâmico da mímica facial. As fotografias foram realizadas sempre com mesmo plano de fundo, nas mesmas posições, pela mesma pessoa e com a mesma câmera.

As aplicações foram realizadas pela mesma equipe, a qual é composta por dermatologistas do HC UFTM, com experiência em cosmiaatria e na aplicação de BTX. Cada

participante possuía uma ficha clínica para registro de dados de identificação e plano de aplicação (Anexo B).

As aplicações foram realizadas no terço superior da face, em plano intramuscular, incluindo a região frontal, o complexo glabellar (músculo prócero e corrugadores) e região pericocular lateral direita e esquerda. A técnica de aplicação seguiu conforme o que já tem descrito na literatura, de acordo com o padrão de ríides de cada participante.

O material utilizado incluiu seringas de 0,5 ml e agulha fixa de 31 G x 15/64” (6mm x 0,25mm). A toxina usada foi a *abo*BTX (*Dysport*<sup>®</sup>), a qual foi doada à equipe de Dermatologia do HC UFTM pelo Serviço de Neurologia do HC UFTM. A BTX foi então diluída cuidadosamente em 2 ml de solução fisiológica 0,9%, e a quantidade de unidades (U) *Speywood* utilizada foi personalizada a depender do padrão muscular do participante. As ampolas de *abo*BTX (*Dysport*<sup>®</sup>) foram abertas exclusivamente no D0 do estudo e o restante do conteúdo da ampola foi armazenado em geladeira com temperatura controlada entre 1,5 e 4 graus Celsius até ser utilizado no tempo D1.

Vale ressaltar que a U é uma medida elaborada pelo fabricante *Galderma*<sup>®</sup> e uma U é definida como a dose letal intraperitoneal média (DL50) em camundongos. Desse modo, uma U equivale a 0,0087ng de toxina, ou invertendo-se a proporção, cada nanograma de neurotoxina equivale a aproximadamente de 115 U (“*Dysport*<sup>®</sup> 500U – Toxina botulínica - 1 frasco-ampola – Galderma”, 2022).

#### 4.5.2 2ª Etapa

Após findado a primeira etapa, iniciou-se a próxima que consistiu na avaliação da resposta clínica dos participantes. Essa etapa utilizou as fotografias realizadas na 1ª etapa, as quais foram avaliadas por quatro examinadores, os quais são dermatologistas com experiência em cosmiaatria, em especial, em toxina botulínica.

Os examinadores avaliaram as fotografias de cada participante e classificaram o grau de rugas nas regiões faciais estudadas que foram: glabellar, frontal, pericocular esquerda e pericocular direita. Todas elas avaliadas tanto no padrão dinâmico como no padrão em repouso. O método de avaliação utilizado para a classificar as rugas foi a escala desenvolvida por Lemperle *et al.* (2001) (Anexo C), a qual foi adaptada para esse estudo.

Os examinadores só possuíam acesso às fotografias dos participantes e mais nenhum outro dado clínico ou de identificação. Cada examinador avaliou de forma independente, através de uma planilha, a qual foi enviada ao autor principal do estudo após preenchimento

completo. Cada planilha foi revisada, posteriormente, a fim de evitar preenchimento incorreto e, somente após isso, foi submetida à análise estatística.

Após avaliação dos examinadores, os participantes foram submetidos à estratificação clínica conforme Tabela 6.

Tabela 6 – Classificação da resposta clínica

CLASSIFICAÇÃO	CRITÉRIOS
<b>Boa Resposta</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mais de 80% das avaliações no D1 apresentam valores 0 ou 1 + Duas regiões (pelo menos) no D2 mostram uma redução de pelo menos um ponto em relação ao D0*.</li> </ul> <p><i>*Essa melhora deve ter a concordância de pelo menos 3 examinadores.</i></p>
<b>Moderada Resposta</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Entre 60% e 79% das avaliações no D1 apresentam valores 0 ou 1 <b>OU</b> Mais de 80% das avaliações no D1 apresentam valores 0 ou 1, porém menos de duas regiões no D2 mostram melhora em relação ao D0.</li> </ul>
<b>Baixa Resposta</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Entre 30% e 59% das avaliações no D1 apresentam valores 0 ou 1 + Menos de duas regiões no D2 mostram melhora em relação ao D0.</li> </ul>
<b>Resposta Ausente</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Menos de 30% das avaliações no D1 apresentam valores 0 ou 1.</li> </ul>

Fonte: Elaboração própria, 2025.

### 4.5.3 3ª Etapa

A terceira e última etapa foi responsável pela detecção e quantificação dos AATx e foi realizada no laboratório de imunologia do ICBN da UFTM. As amostras sanguíneas coletadas

na primeira etapa foram armazenadas em tubos de congelação até a realização do ELISA para detecção de anticorpo antitoxina Imunoglobulina G (ATTx-IgG).

A técnica utilizada consistiu em sensibilizar placas de polipropileno de alta afinidade com 100mL de solução de toxina botulínica (10µg/mL) diluída em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,3 e incubada por 18 horas (“overnight”) a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS contendo 0,05% Tween 20 (Sigma) (PBS-Tween) e incubadas com 200mL de solução de PBS contendo 2% de albumina bovina – BSA (Sigma), à temperatura ambiente por 4 horas com o intuito de bloquear os sítios ativos.

Após isso, foram lavadas 4 vezes com PBS-Tween 20 e foram adicionadas 100mL das amostras dos pacientes, diluídas em 1/100 em PBS-BSA 2%. As placas foram incubadas à temperatura de 37°C por 1 hora. Em seguida, foram lavadas novamente por 4 vezes com PBS-Tween 20 e incubadas com 100mL de solução de anti-IgG humana, conjugada à peroxidase em PBS-BSA 2%, durante 1 hora em 37°C.

Na sequência, as placas foram novamente lavadas em PBS-Tween 20 por 4 vezes. Adicionou-se 100mL de solução contendo tampão Tris-HCl (pH 7,2), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,05%) e OPD (1mg/mL). Após 15 minutos a reação foi interrompida pela adição de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N. Por fim, a absorbância foi determinada em leitor de microplacas com filtro de 490nm e os resultados foram expressos em absorbância.

#### 4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados fornecidos até a segunda etapa foram tabelados em um banco de dados no programa MS-Excel<sup>®</sup> (Microsoft). Os pacientes foram alocados considerando o padrão de resposta à BTX. As diferenças entre as médias das unidades nos sexos feminino e masculino foram avaliadas utilizando o teste t de Student para amostras independentes.

Para comparar as unidades pareadas nos tempos D0 e D1 em cada região, foi aplicado o teste t de Student pareado. A concordância entre as avaliações foi examinada por meio do coeficiente Kappa ponderado. Os testes utilizados se basearam nos estudos de Cohen (1968) e Landis e Koch (1977).

A média e o desvio padrão foram utilizados como medidas de tendência central e dispersão, respectivamente. A verificação dos pressupostos dos testes paramétricos foi realizada por meio da análise dos gráficos de Probabilidade Normal, Boxplot e Teste de Shapiro-Wilk. A variação na produção de ATTx-IgG ao longo dos três tempos avaliados (D0, D1 e D2) foi analisada por meio da ANOVA de uma via para medidas repetidas. A diferença

na produção de ATTx-IgG entre os sexos foi avaliada utilizando o Teste t de Student para amostras independentes.

Para identificar padrões na produção de ATTx-IgG entre os pacientes, foi aplicada a técnica de aprendizado de máquina não supervisionado, a Clusterização Hierárquica. A associação entre a resposta clínica à aplicação da toxina botulínica e o nível de ATTx-IgG foi avaliada por meio do Teste exato de Fisher.

O nível de significância foi fixado em  $\alpha = 0,05$ . Todas as análises estatísticas e visualizações de dados foram executadas no software R (versão 4.1.2).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PRIMEIRA ETAPA - AVALIAÇÃO CLÍNICA

#### 5.1.1 Caracterização da coorte

Dos 34 participantes, houve perda de seguimento de dois participantes nessa etapa, sendo um do sexo masculino e outro do sexo feminino, os quais foram excluídos das análises estatísticas. Esses participantes só compareceram no período D0 e D1 e não responderam ao contato dos pesquisadores para o retorno ao D2.

Para fins analíticos, foram incluídos 32 indivíduos, sendo 16 do sexo feminino e 16 do sexo masculino, todos sem histórico prévio de tratamento com BTX. A idade média dos participantes foi de 30 anos, com uma faixa etária variando de 25 a 44 anos para as mulheres e de 26 a 39 anos para os homens (Figura 7A).

#### 5.1.2 Avaliação das unidades de toxina botulínica aplicadas em homens e mulheres

As mulheres receberam, em média, 55 U totais de BTX, enquanto os homens receberam 59 U (Figura 7B). No momento D0, as mulheres receberam, em média, 46 U, enquanto os homens receberam, em média, 50 U (Figura 7C). No momento D1, ambos os grupos receberam, em média, 9 U (Figura 7D). Nosso estudo não fornece evidência de diferença nas médias entre os sexos (Tabela 7). Observa-se que, no D1, uma única paciente do sexo feminino recebeu 52 U.

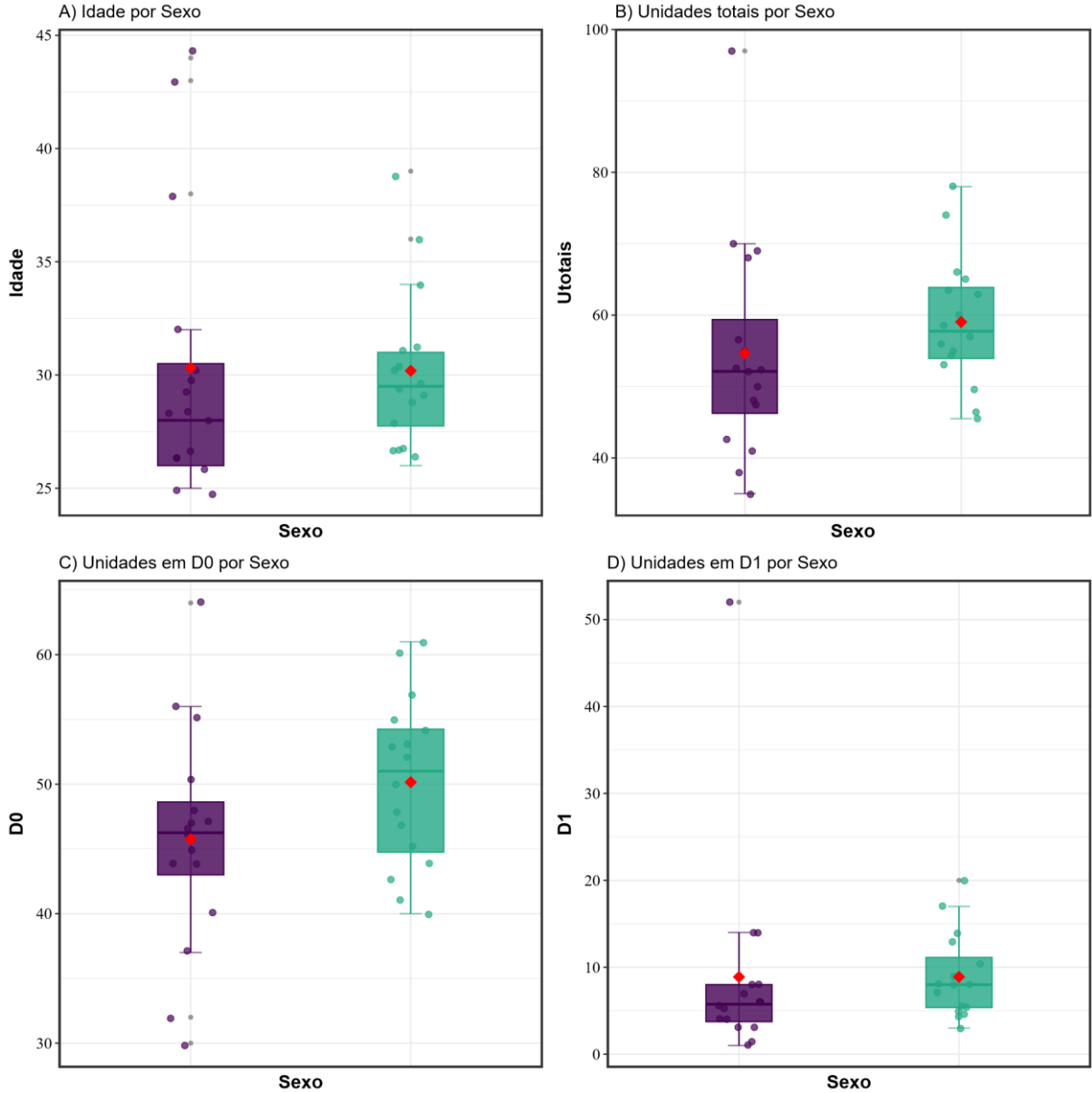
#### 5.1.3 Avaliação das unidades de toxina botulínica aplicadas pareadas entre D0 e D1

Realizamos uma análise pareada entre os tempos D0 e D1 com o objetivo de avaliar se há diferenças nas unidades médias de BTX aplicadas entre os dois tempos em cada região (Frontal, Glabellar, Periocular Esquerda e Periocular Direita) (Figura 8). Temos evidências que existem diferenças nas médias das unidades utilizadas entre os tempos D0 e D1 em todas as regiões avaliadas.

Em média, foram aplicadas 17 U no D0 e 2,4 U no D1 (p-valor<0,001) na região Frontal. Esse padrão foi observado nas regiões Glabellar (média D0: 18,3, D1: 2,94; p-valor < 0,001), Periocular Esquerda (média D0: 6,05, D1: 1,85; p-valor < 0,001) e Periocular Direita (média

D0: 6,17, D1: 1,78; p-valor < 0,001). Destaca-se a presença de um caso atípico (paciente 4), no qual foi necessária uma segunda aplicação com dosagem superior à primeira em todas as regiões avaliadas, divergindo do padrão observado nos demais casos (Tabela 8).

Figura 7 – Gráfico box plot mostrando variáveis relacionadas ao sexo



Fonte: Elaboração própria, 2025.

Nota: A) Idade por sexo. B) Unidades totais por Sexo. C) Unidades em D0 por Sexo. D) Unidades em D1 por Sexo.

Tabela 7 – Avaliação da quantidade média de unidades de toxina botulínica, incluindo o total de unidades aplicadas e os períodos D0 e D1, estratificada por sexo

	FEMININO N = 16 <sup>1</sup>	MASCULINO N = 16 <sup>1</sup>	P-VALUE <sup>2</sup>	IC95%
<b>IDADE</b>	30 (6.1)	30 (3.5)	0.94	(-3.5;3.7)
<b>UTOTAIS</b>	55 (15)	59 (9)	0.33	(-13.6;4.8)
<b>D0</b>	46 (9)	50 (7)	0.11	(-9.9;1.1)
<b>D1</b>	9 (12.1)	9 (4.9)	1.0	(-6.8;6.8)

Fonte: Elaboração própria, 2025.

Nota: <sup>1</sup>Média (Desvio padrão); <sup>2</sup>Teste t de Student.

#### 5.1.4 Avaliações clínicas da resposta à aplicação de toxina pelos examinadores

O padrão clínico das rugas foi avaliado por quatro examinadores independentes, com o objetivo de analisar a concordância entre eles nas avaliações das quatro regiões faciais: frontal, glabellar, periocular esquerda e periocular direita, considerando as condições de repouso e dinâmica de cada região. As análises apresentadas a seguir refletem as avaliações realizadas pelos examinadores para oito variáveis relacionadas à presença e profundidade das rugas, classificadas em uma escala de 0 a 5, nos tempos D0, D1 e D2.

##### 5.1.4.1 Examinador 1

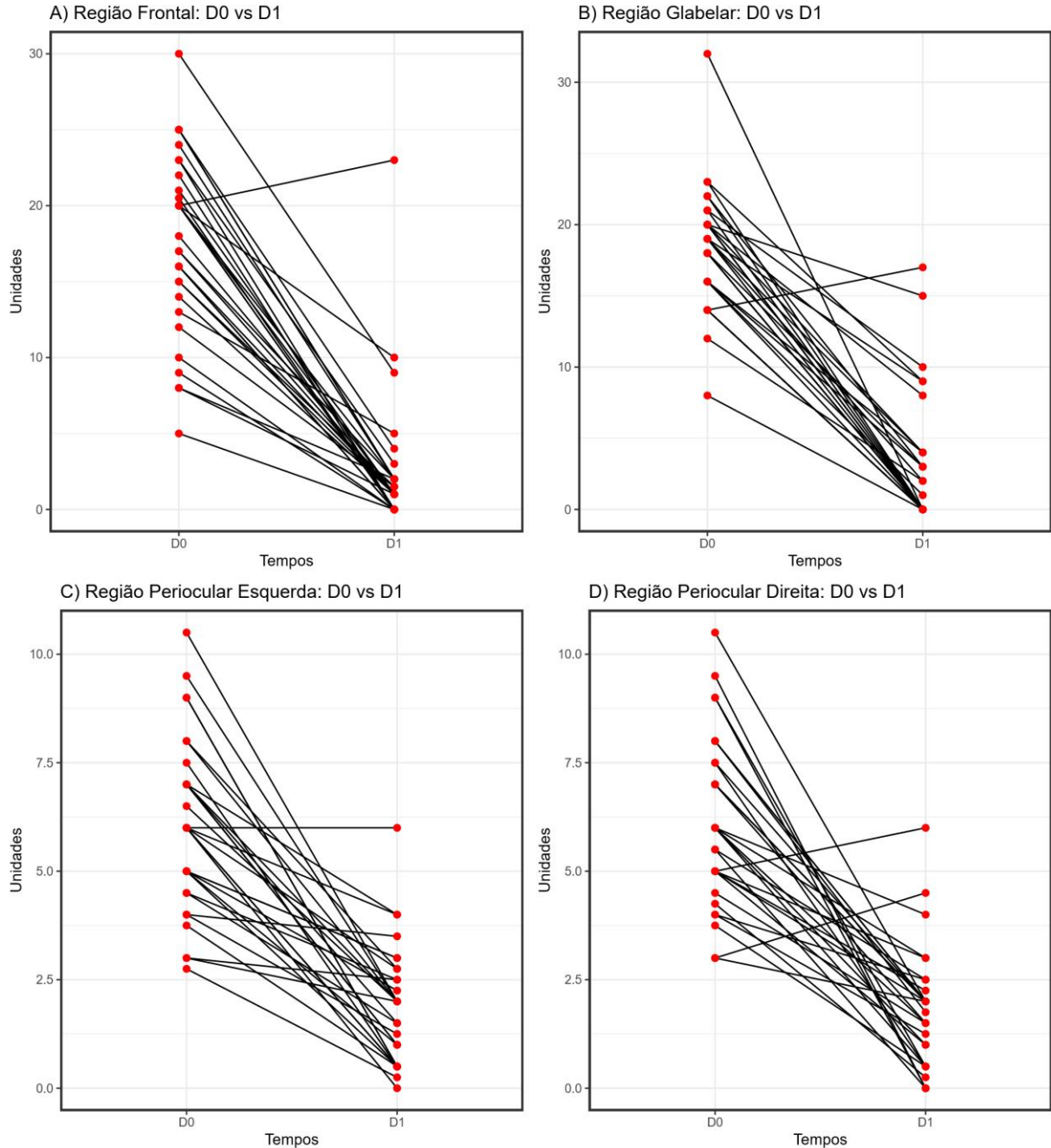
Os resultados mostram uma tendência geral de redução na profundidade das rugas ao longo do tempo, com maior frequência de pontuações mais baixas (0 ou 1) em D1 e D2, especialmente em regiões avaliadas em repouso. Nas avaliações dinâmicas, a distribuição foi mais variada, indicando que as rugas em movimento apresentaram menor redução em comparação às rugas em repouso (Tabela 9) (Figura 9).

No D0, observou-se alta prevalência de rugas em quase todas as regiões dinâmicas, com predominância de rugas moderadas (escala 3) ou profundas (escala 4 e 5). Em contrapartida, nas regiões em repouso, a maioria dos indivíduos apresentou ausência de rugas (escala 0), exceto na região frontal em repouso (53% dos pacientes com rugas finas).

No D1, houve uma redução significativa nas rugas, com aumento expressivo da ausência de rugas (escala 0) em todas as variáveis. Nas regiões em repouso, quase todos os indivíduos estavam sem rugas (84%-100%). Nas regiões dinâmicas, embora a ausência de rugas

(escala 0) tenha aumentado, ainda foram observadas rugas finas (escala 1) e poucas ocorrências de rugas profundas (escala 4 ou 5).

Figura 8 – Gráfico de análise pareada comparando a quantidade de unidades de toxina utilizadas em cada região entre os períodos D0 e D1.

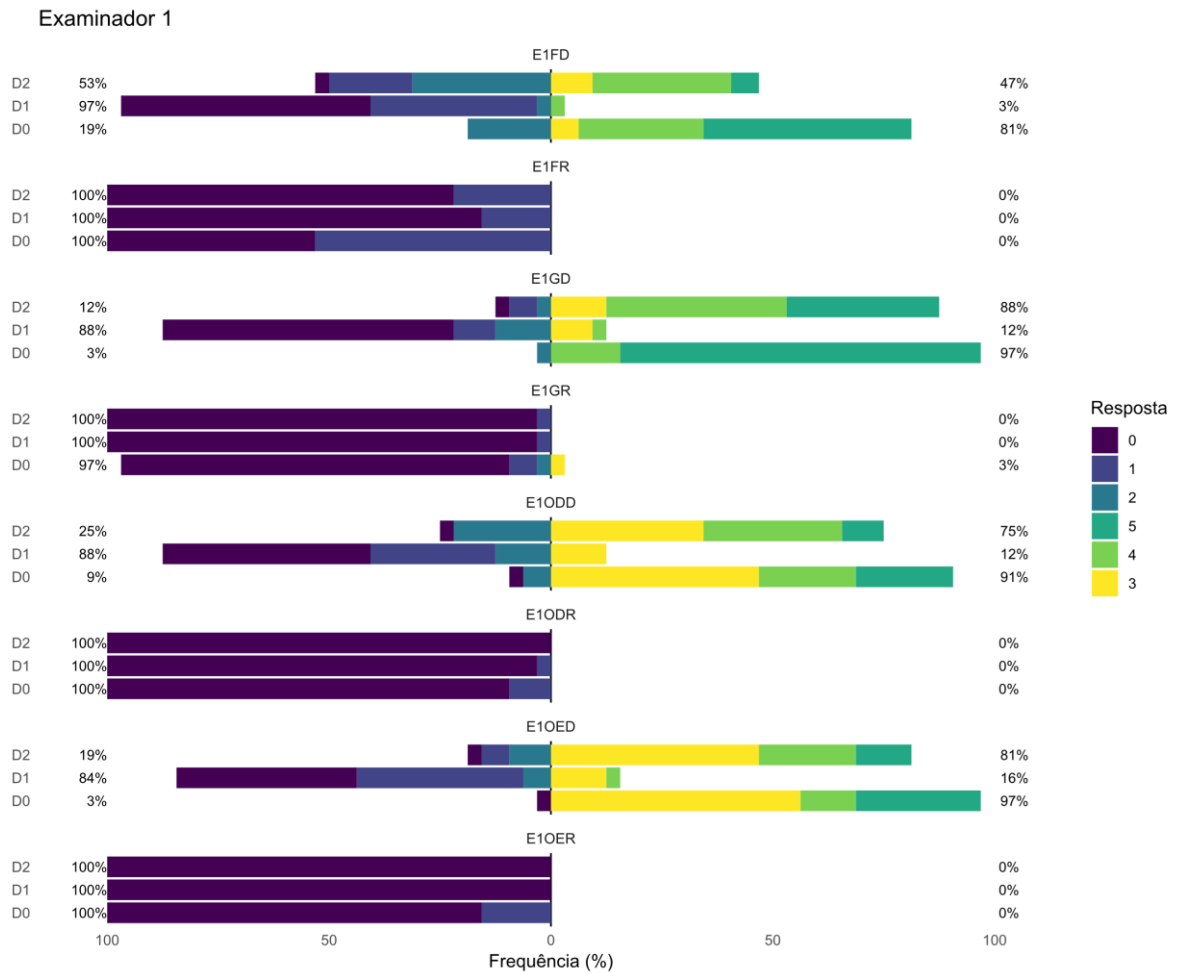


Fonte: Elaboração própria, 2025.

No D2, os resultados indicaram uma leve piora em comparação ao D1, mas ainda melhores que o D0. As regiões em repouso mantiveram alta proporção de ausência de rugas (78-100%), enquanto as regiões dinâmicas apresentaram maior diversidade nos graus de rugas.

Nas regiões frontal e glabellar em dinâmica, rugas moderadas e profundas (escalas 3-5) tornaram-se mais prevalentes, enquanto na região periocular direita em dinâmica, as rugas moderadas (escala 3) foram predominantes.

Figura 9 – Gráfico de barras apresentando a frequência relativa das respostas do Examinador 1, organizadas por região e distribuídas por períodos avaliados (D0, D1 e D2), de acordo com a escala de pontuação fornecida (0 a 5)



Fonte: Elaboração própria, 2025.

Tabela 8 – Avaliação Pareada das Unidades de Toxina Botulínica Aplicadas entre D0 e D1

(continua)

Paciente	Sexo	Idade	Frontal_ D0	Frontal_ D1	Glabelar_ D0	Glabelar_ D1	Periocular_ Esq_D0	Periocular_ Esq_D1	Periocular_ Dir_D0	Periocular_ Dir_D1
1	masculino	39	23	3	18	0	7	4	7	2
2	feminino	28	15	1	12	2	5	0,5	5	2
3	masculino	27	25	2	16	3	3	2	3	2
4	feminino	25	20	23	14	17	6	6	5	6
5	masculino	30	13	5	18	0	7	1	7	2
6	masculino	31	22	0	32	0	5	2,25	5	2,25
7	feminino	32	14	1	23	0	5	3	6	3
8	masculino	30	20	2	19	9	6,5	2	7,5	2
9	masculino	27	15	1,5	20	8	9	0,5	9	0,5
10	feminino	26	20,5	0	20	0	5	3	5	3
11	feminino	27	8	1	20	0	9	0,5	9	0
12	feminino	28	20	1	19	4	3,75	0,5	3,75	0,5
13	feminino	25	25	4	21	10	5	1	5	1
14	feminino	29	8	2	14	0	4	3,5	4	2,5
15	feminino	26	16	0	22	0	4,5	1,5	4,5	1,5
16	feminino	30	16	0	16	0	6	4	6	4

Tabela 8 – Avaliação Pareada das Unidades de Toxina Botulínica Aplicadas entre D0 e D1

(conclusão)

Paciente	Sexo	Idade	Frontal_	Frontal_	Glabealar_	Glabealar_	Periocular_	Periocular_	Periocular_	Periocular_
			D0	D1	D0	D1	Esq_D0	Esq_D1	Dir_D0	Dir_D1
17	masculino	31	9	0	22	3	6	0	5,5	0
18	masculino	28	21	1	23	9	8	2	8	2
19	feminino	26	12	1,5	8	0	6	0,5	6	1
20	feminino	38	20	10	14	0	10,5	2	10,5	2
21	feminino	28	17	1	14	0	8	2,75	8	1,75
22	masculino	29	10	0	20	15	4,5	2,5	5,5	2,5
23	masculino	34	20	0	18	0	6	2,75	6	1,5
24	feminino	30	24	2	21	0	9,5	2	9,5	0
26	feminino	43	5	0	20	0	7,5	0,5	7,5	0,5
27	feminino	44	16	1	14	0	7	1	7	2
28	masculino	29	17	2	16	1	4	1,25	4	1,25
29	masculino	29	25	2	18	3	7	1,5	7	1,5
30	masculino	26	23	0	19	0	3	2,5	3	4,5
31	masculino	27	18	1	19	2	2,75	0,25	4,25	0,25
32	masculino	36	30	9	16	4	7	2	8	2

Fonte: Elaboração própria, 2025.

Tabela 9 – Frequências absoluta e relativa das classificações por região e padrão, de acordo com os períodos (D0, D1 e D2), segundo a avaliação do Examinador 1

<b>Regiões e Padrões (Examinador 1)</b>	(continua)		
	<b>D0</b> N = 32	<b>D1</b> N = 32	<b>D2</b> N = 32
<b>Região frontal em repouso (E1FR)</b>			
0	15 (47%)	27 (84%)	25 (78%)
1	17 (53%)	5 (16%)	7 (22%)
2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Região frontal em dinâmica (E1FD)</b>			
0	0 (0%)	18 (56%)	1 (3.1%)
1	0 (0%)	12 (38%)	6 (19%)
2	6 (19%)	1 (3.1%)	10 (31%)
3	2 (6.3%)	0 (0%)	3 (9.4%)
4	9 (28%)	1 (3.1%)	10 (31%)
5	15 (47%)	0 (0%)	2 (6.3%)
<b>Região glabellar em repouso (E1GR)</b>			
0	28 (88%)	31 (97%)	31 (97%)
1	2 (6.3%)	1 (3.1%)	1 (3.1%)
2	1 (3.1%)	0 (0%)	0 (0%)
3	1 (3.1%)	0 (0%)	0 (0%)
4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Região glabellar em dinâmica (E1GD)</b>			
0	0 (0%)	21 (66%)	1 (3.1%)
1	0 (0%)	3 (9.4%)	2 (6.3%)
2	1 (3.1%)	4 (13%)	1 (3.1%)
3	0 (0%)	3 (9.4%)	4 (13%)
4	5 (16%)	1 (3.1%)	13 (41%)
5	26 (81%)	0 (0%)	11 (34%)

Tabela 9 – Frequências absoluta e relativa das classificações por região e padrão, de acordo com os períodos (D0, D1 e D2), segundo a avaliação do Examinador 1

Regiões e Padrões (Examinador 1)	(conclusão)		
	D0 N = 32	D1 N = 32	D2 N = 32
Região periocular esquerda em repouso (E1OER)			
0	27 (84%)	32 (100%)	32 (100%)
1	5 (16%)	0 (0%)	0 (0%)
2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Região periocular esquerda em dinâmica (E1OED)			
0	1 (3.1%)	13 (41%)	1 (3.1%)
1	0 (0%)	12 (38%)	2 (6.3%)
2	0 (0%)	2 (6.3%)	3 (9.4%)
3	18 (56%)	4 (13%)	15 (47%)
4	4 (13%)	1 (3.1%)	7 (22%)
5	9 (28%)	0 (0%)	4 (13%)
Região periocular direita em repouso (E1ODR)			
0	29 (91%)	31 (97%)	32 (100%)
1	3 (9.4%)	1 (3.1%)	0 (0%)
2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Região periocular direita em dinâmica (E1ODD)			
0	1 (3.1%)	15 (47%)	1 (3.1%)
1	0 (0%)	9 (28%)	0 (0%)
2	2 (6.3%)	4 (13%)	7 (22%)
3	15 (47%)	4 (13%)	11 (34%)
4	7 (22%)	0 (0%)	10 (31%)
5	7 (22%)	0 (0%)	3 (9.4%)
N (%)			

#### 5.1.4.2 Examinador 2

Os resultados da avaliação do Examinador 2 mostram uma tendência geral de redução na profundidade das rugas ao longo do tempo, com maior frequência de pontuações mais baixas (0 ou 1) em D1 e D2. As regiões avaliadas em repouso apresentaram maior redução de rugas, enquanto as avaliações dinâmicas mostraram maior variabilidade, com melhora menos expressiva (Tabela 10) (Figura 10).

No D0, nas regiões em repouso, a maioria dos participantes foi classificada sem rugas (escala 0), com percentuais variando de 84% na região frontal a 97% nas regiões perioculares. No entanto, nas avaliações dinâmicas, foram observadas rugas mais profundas (escala 4 ou 5) em todas as regiões: 63% na região glabellar, 50% na região frontal e 22% nas regiões perioculares. Rugas moderadas (escala 3) também foram frequentes, especialmente nas regiões perioculares.

No D1, houve uma redução marcante nas rugas em todas as variáveis. Nas regiões em repouso, quase todos os participantes apresentaram ausência de rugas. Nas regiões dinâmicas, a ausência de rugas (escala 0) aumentou expressivamente: de 3% para 81% na região frontal, 66% nas regiões perioculares e 53% na região glabellar. Rugas profundas (escala 4 ou 5) praticamente desapareceram, sendo substituídas por rugas mais finas (escala 1) ou ausentes.

No D2, observou-se uma leve piora em relação ao D1, mas ainda melhor que no D0. As regiões em repouso mantiveram alta prevalência de ausência de rugas (94%-100%). Nas regiões dinâmicas, a diversidade das pontuações foi mais evidente. Rugas finas e moderadas (escalas 1 e 3) se tornaram mais frequentes, especialmente na região frontal (41% na escala 1) e na região glabellar (34% na escala 5). Rugas profundas voltaram a aparecer em menor proporção (22%-34%), principalmente na região glabellar em dinâmica.

#### 5.1.4.3 Examinador 3

Os resultados da avaliação do Examinador 3 apresentam uma tendência geral de redução das rugas ao longo do tempo, especialmente nas regiões em repouso, que mantiveram pontuações mais baixas em D1 e D2. No entanto, nas regiões dinâmicas, a melhora foi mais limitada, com maior diversidade nas distribuições das pontuações (Tabela 11) (Figura 11).

No D0, as regiões em repouso mostraram predominância de ausência de rugas (escala 0), com 50% na região frontal, 84% na região glabellar e 94% nas regiões perioculares. Rugas moderadas e profundas foram observadas em todas as regiões dinâmicas.

Tabela 10 – Frequências absoluta e relativa das classificações por região e padrão, de acordo com os períodos (D0, D1 e D2), segundo a avaliação do Examinador 2

(continua)

<b>Regiões e Padrões (Examinador 2)</b>	<b>D0</b> N = 32	<b>D1</b> N = 32	<b>D2</b> N = 32
<b>Região frontal em repouso (E2FR)</b>			
0	27 (84%)	32 (100%)	30 (94%)
1	5 (16%)	0 (0%)	2 (6.3%)
2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Região frontal em dinâmica (E2FD)</b>			
0	1 (3.1%)	26 (81%)	2 (6.3%)
1	5 (16%)	4 (13%)	13 (41%)
2	1 (3.1%)	1 (3.1%)	3 (9.4%)
3	5 (16%)	0 (0%)	5 (16%)
4	4 (13%)	1 (3.1%)	5 (16%)
5	16 (50%)	0 (0%)	4 (13%)
<b>Região glabellar em repouso (E2GR)</b>			
0	29 (91%)	32 (100%)	32 (100%)
1	2 (6.3%)	0 (0%)	0 (0%)
2	1 (3.1%)	0 (0%)	0 (0%)
3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Região glabellar em dinâmica (E2GD)</b>			
0	0 (0%)	17 (53%)	1 (3.1%)
1	0 (0%)	9 (28%)	4 (13%)
2	2 (6.3%)	2 (6.3%)	3 (9.4%)
3	1 (3.1%)	3 (9.4%)	3 (9.4%)
4	9 (28%)	1 (3.1%)	10 (31%)
5	20 (63%)	0 (0%)	11 (34%)

Tabela 10 – Frequências absoluta e relativa das classificações por região e padrão, de acordo com os períodos (D0, D1 e D2), segundo a avaliação do Examinador 2

<b>Regiões e Padrões (Examinador 2)</b>	(conclusão)		
	<b>D0</b> N = 32	<b>D1</b> N = 32	<b>D2</b> N = 32
<b>Região periocular esquerda em repouso (E2OER)</b>			
0	30 (94%)	32 (100%)	31 (97%)
1	2 (6.3%)	0 (0%)	0 (0%)
2	0 (0%)	0 (0%)	1 (3.1%)
3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Região periocular esquerda em dinâmica (E2OED)</b>			
0	1 (3.1%)	21 (66%)	3 (9.4%)
1	7 (22%)	9 (28%)	9 (28%)
2	3 (9.4%)	0 (0%)	6 (19%)
3	8 (25%)	1 (3.1%)	4 (13%)
4	6 (19%)	1 (3.1%)	7 (22%)
5	7 (22%)	0 (0%)	3 (9.4%)
<b>Região periocular direita em repouso (E2ODR)</b>			
0	31 (97%)	32 (100%)	31 (97%)
1	1 (3.1%)	0 (0%)	0 (0%)
2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
5	0 (0%)	0 (0%)	1 (3.1%)
<b>Região periocular direita em dinâmica (E2ODD)</b>			
0	0 (0%)	21 (66%)	2 (6.3%)
1	8 (25%)	8 (25%)	11 (34%)
2	3 (9.4%)	1 (3.1%)	4 (13%)
3	8 (25%)	2 (6.3%)	4 (13%)
4	6 (19%)	0 (0%)	7 (22%)
5	7 (22%)	0 (0%)	4 (13%)
N (%)			

Fonte: Elaboração própria, 2025.

Figura 10 – Gráfico de barras apresentando a frequência relativa das respostas do Examinador 2, organizadas por região e distribuídas por períodos avaliados (D0, D1 e D2), de acordo com a escala de pontuação fornecida (0 a 5)



Fonte: Elaboração própria, 2025.

No D1, observou-se uma melhora significativa em todas as regiões, especialmente nas avaliações em repouso. A ausência de rugas (escala 0) foi registrada em 78%-100% dos casos em todas as regiões avaliadas em repouso. Nas regiões dinâmicas, também houve uma redução expressiva das rugas profundas, com ausência de rugas aumentando para 56%-66% nas regiões frontal e glabellar, e 34% nas regiões perioculares. Rugas finas (escala 1) foram as mais prevalentes em algumas áreas, enquanto rugas profundas praticamente desapareceram.

No D2, houve uma leve piora em relação ao D1, principalmente nas avaliações dinâmicas. As regiões em repouso mantiveram altos percentuais de ausência de rugas (75%-97%). Em regiões dinâmicas, as rugas profundas (escalas 4 e 5) voltaram a aparecer nas regiões frontal (28%), glabellar (41%) e perioculares (34%-41%). Rugas moderadas (escala 3) também foram observadas em todas as regiões dinâmicas.

Tabela 11 – Frequências absoluta e relativa das classificações por região e padrão, de acordo com os períodos (D0, D1 e D2), segundo a avaliação do Examinador 3

(continua)

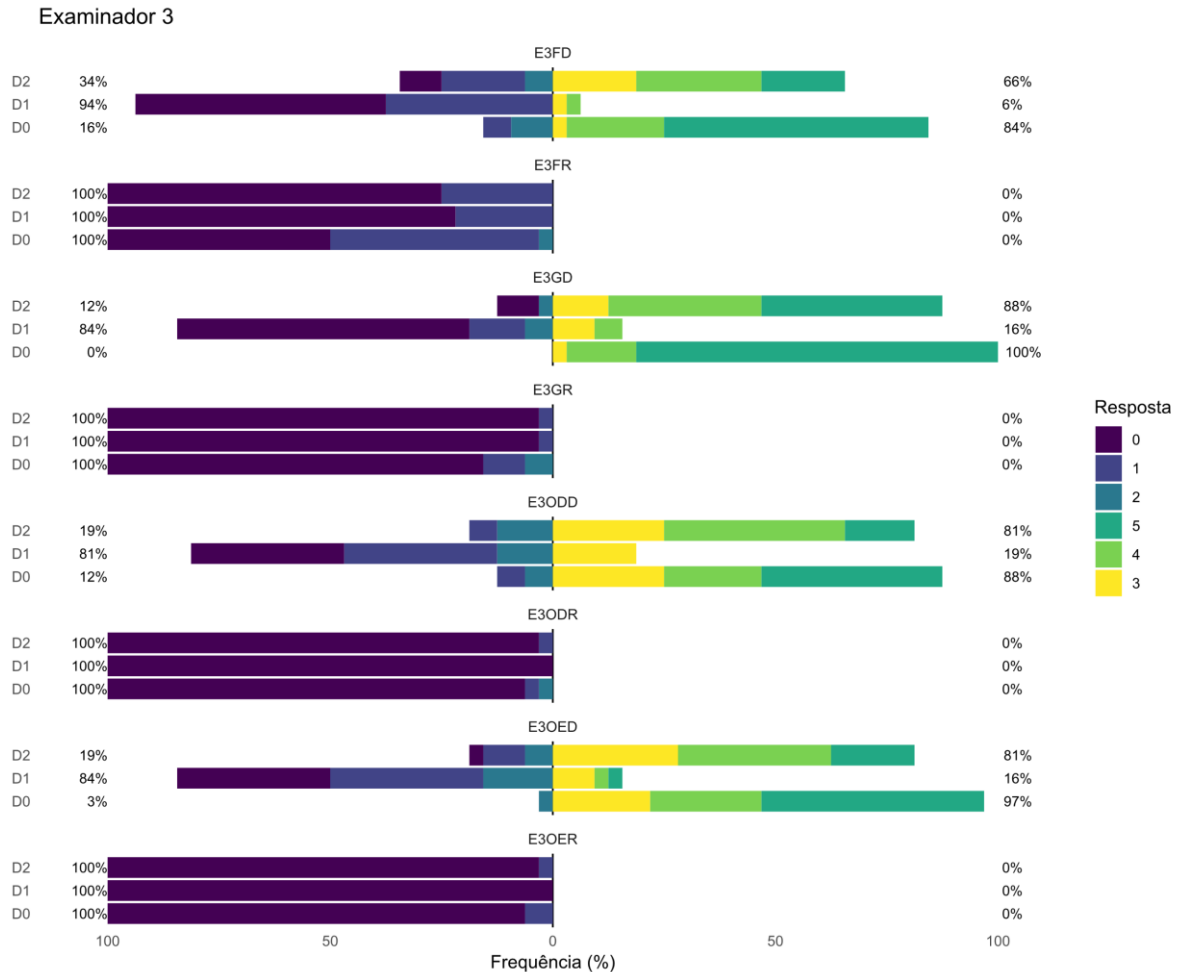
<b>Regiões e Padrões (Examinador 3)</b>	<b>D0</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>
	<b>N = 32</b>	<b>N = 32</b>	<b>N = 32</b>
<b>Região frontal em repouso (E3FR)</b>			
0	16 (50%)	25 (78%)	24 (75%)
1	15 (47%)	7 (22%)	8 (25%)
2	1 (3.1%)	0 (0%)	0 (0%)
3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Região frontal em dinâmica (E3FD)</b>			
0	0 (0%)	18 (56%)	3 (9.4%)
1	2 (6.3%)	12 (38%)	6 (19%)
2	3 (9.4%)	0 (0%)	2 (6.3%)
3	1 (3.1%)	1 (3.1%)	6 (19%)
4	7 (22%)	1 (3.1%)	9 (28%)
5	19 (59%)	0 (0%)	6 (19%)
<b>Região glabelar em repouso (E3GR)</b>			
0	27 (84%)	31 (97%)	31 (97%)
1	3 (9.4%)	1 (3.1%)	1 (3.1%)
2	2 (6.3%)	0 (0%)	0 (0%)
3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Região glabelar em dinâmica (E3GD)</b>			
0	0 (0%)	21 (66%)	3 (9.4%)
1	0 (0%)	4 (13%)	0 (0%)
2	0 (0%)	2 (6.3%)	1 (3.1%)
3	1 (3.1%)	3 (9.4%)	4 (13%)
4	5 (16%)	2 (6.3%)	11 (34%)
5	26 (81%)	0 (0%)	13 (41%)

Tabela 11 – Frequências absoluta e relativa das classificações por região e padrão, de acordo com os períodos (D0, D1 e D2), segundo a avaliação do Examinador 3

Regiões e Padrões (Examinador 3)	(conclusão)		
	D0	D1	D2
Região periocular esquerda em repouso (E3OER)			
0	30 (94%)	32 (100%)	31 (97%)
1	2 (6.3%)	0 (0%)	1 (3.1%)
2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Região periocular esquerda em dinâmica			
0	0 (0%)	11 (34%)	1 (3.1%)
1	0 (0%)	11 (34%)	3 (9.4%)
2	1 (3.1%)	5 (16%)	2 (6.3%)
3	7 (22%)	3 (9.4%)	9 (28%)
4	8 (25%)	1 (3.1%)	11 (34%)
5	16 (50%)	1 (3.1%)	6 (19%)
Região periocular direita em repouso (E3ODR)			
0	30 (94%)	32 (100%)	31 (97%)
1	1 (3.1%)	0 (0%)	1 (3.1%)
2	1 (3.1%)	0 (0%)	0 (0%)
3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Região periocular direita em dinâmica (E3ODD)			
0	0 (0%)	11 (34%)	0 (0%)
1	2 (6.3%)	11 (34%)	2 (6.3%)
2	2 (6.3%)	4 (13%)	4 (13%)
3	8 (25%)	6 (19%)	8 (25%)
4	7 (22%)	0 (0%)	13 (41%)
5	13 (41%)	0 (0%)	5 (16%)
N (%)			

Fonte: Elaboração própria, 2025

Figura 11 – Gráfico de barras apresentando a frequência relativa das respostas do Examinador 3, organizadas por região e distribuídas por períodos avaliados (D0, D1 e D2), de acordo com a escala de pontuação fornecida (0 a 5)



Fonte: Elaboração própria, 2025.

#### 5.1.4.4 Examinador 4

Os resultados do Examinador 4 demonstram uma tendência geral de melhora nas rugas entre os tempos analisados, especialmente nas regiões em repouso, onde as pontuações mais baixas (ausência de rugas) foram mantidas ou melhoradas até o D1 e mantiveram-se estáveis até o D2. Nas regiões dinâmicas, a melhora foi menos consistente, com um aumento na diversidade das pontuações e uma leve piora no D2 (Tabela 12) (Figura 12).

No D0, as avaliações em repouso mostraram alta proporção de ausência de rugas (escala 0), com 84% na região frontal, 91% na glabellar e 94%-97% nas regiões perioculares. Nas regiões dinâmicas, as rugas profundas (escala 5) predominaram, especialmente nas regiões

frontal (50%) e glabellar (63%). Rugas moderadas (escala 3) e finas (escala 1) também estavam presentes, mas em menor proporção.

No D1, observou-se uma melhora significativa, especialmente nas regiões em repouso, onde a ausência de rugas atingiu 97%-100% em todas as áreas avaliadas. Nas regiões dinâmicas, a proporção de ausência de rugas também aumentou, com 56% na região frontal, 66% na glabellar e 41%-47% nas regiões perioculares. Rugas finas (escala 1) tornaram-se mais frequentes, enquanto rugas profundas praticamente desapareceram.

No D2, houve uma leve piora em comparação ao D1, principalmente nas regiões dinâmicas. Em repouso, a ausência de rugas manteve-se elevada, com 78%-100% em todas as áreas. Em contrapartida, as regiões dinâmicas apresentaram maior diversidade nos graus de rugas, com aumento das rugas profundas (escala 4 ou 5) nas regiões frontal (31%), glabellar (41%), e perioculares (22%-31%). Rugas moderadas (escala 3) também se tornaram mais prevalentes.

Em resumo, os quatro examinadores identificaram uma tendência geral de redução na profundidade das rugas ao longo do tempo, com melhora mais expressiva nas regiões avaliadas em repouso, especialmente no D1, quando a ausência de rugas (escala 0) foi predominante em quase todas as áreas. Em repouso, as rugas praticamente desapareceram em D1 e D2, enquanto no padrão dinâmico, a redução foi menos consistente, apresentando maior variabilidade nas pontuações.

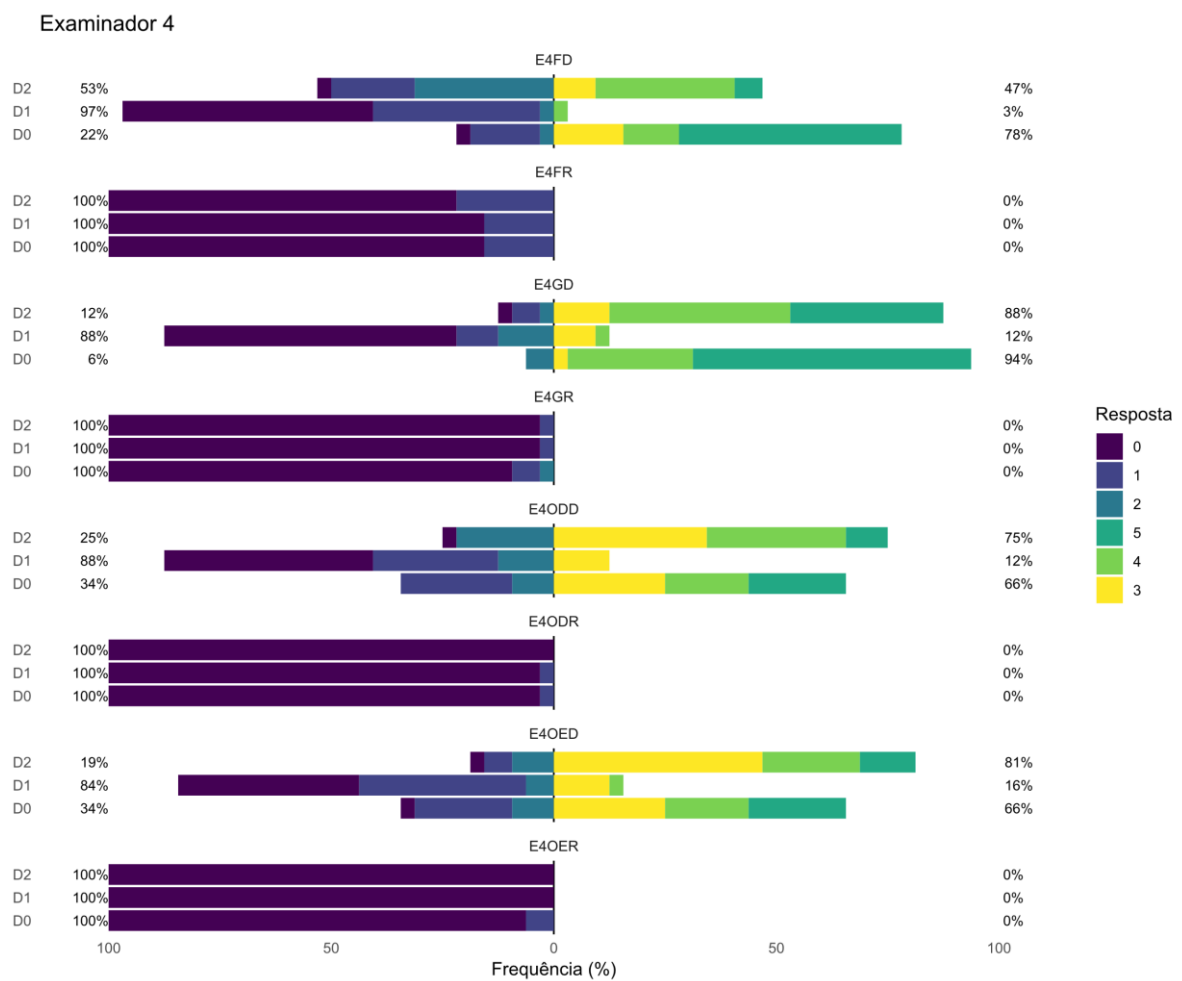
No D2, observou-se uma leve piora em comparação ao D1, principalmente no que tange às rugas dinâmicas, com reaparecimento de rugas moderadas e profundas (escalas 3-5). Apesar de diferenças pontuais na intensidade e distribuição das rítmicas, os examinadores concordaram que houve maior redução das rugas no padrão em repouso. Além disso, a variabilidade de pontuações foi maior no padrão dinâmico da mímica facial.

### **5.1.5 Concordância entre os examinadores por região**

Com o objetivo de avaliar a concordância entre os quatro examinadores em relação às diferentes regiões do padrão dinâmico nos três tempos, aplicamos o coeficiente Kappa ponderado (Tabela 13). O Kappa ponderado é uma medida que ajusta a concordância para o acaso, proporcionando uma avaliação mais precisa e realista do nível de concordância entre os observadores. A interpretação da magnitude do coeficiente Kappa foi realizada com base na classificação proposta por Landis e Koch (1977). De acordo com esse artigo, os valores do Kappa podem ser interpretados da seguinte forma: valores abaixo de 0 indicam discordância

maior que o esperado por acaso; de 0 a 0,20, uma concordância desprezível; de 0,21 a 0,40, uma concordância leve; de 0,41 a 0,60, uma concordância moderada; de 0,61 a 0,80, uma concordância substancial; e de 0,81 a 1,00, uma concordância quase perfeita. As análises a seguir apresentam a concordância entre os examinadores, considerando cada par de examinador por região, com foco exclusivo no padrão dinâmico.

Figura 12 – Gráfico de barras apresentando a frequência relativa das respostas do Examinador 3, organizadas por região e distribuídas por períodos avaliados (D0, D1 e D2), de acordo com a escala de pontuação fornecida (0 a 5)



Fonte: Elaboração própria, 2025.

Tabela 12 – Frequências absoluta e relativa das classificações por região e padrão, de acordo com os períodos (D0, D1 e D2), segundo a avaliação do Examinador 4

<b>Regiões e Padrões (Examinador 4)</b>	(continua)		
	<b>D0</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>
	<b>N = 32</b>	<b>N = 32</b>	<b>N = 32</b>
<b>Região frontal em repouso (E4FR)</b>			
0	27 (84%)	27 (84%)	25 (78%)
1	5 (16%)	5 (16%)	7 (22%)
2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Região frontal em dinâmica (E4FD)</b>			
0	1 (3.1%)	18 (56%)	1 (3.1%)
1	5 (16%)	12 (38%)	6 (19%)
2	1 (3.1%)	1 (3.1%)	10 (31%)
3	5 (16%)	0 (0%)	3 (9.4%)
4	4 (13%)	1 (3.1%)	10 (31%)
5	16 (50%)	0 (0%)	2 (6.3%)
<b>Região glabelar em repouso (E4GR)</b>			
0	29 (91%)	31 (97%)	31 (97%)
1	2 (6.3%)	1 (3.1%)	1 (3.1%)
2	1 (3.1%)	0 (0%)	0 (0%)
3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Região glabelar em dinâmica (E4GD)</b>			
0	0 (0%)	21 (66%)	1 (3.1%)
1	0 (0%)	3 (9.4%)	2 (6.3%)
2	2 (6.3%)	4 (13%)	1 (3.1%)
3	1 (3.1%)	3 (9.4%)	4 (13%)
4	9 (28%)	1 (3.1%)	13 (41%)
5	20 (63%)	0 (0%)	11 (34%)

Tabela 12 – Frequências absoluta e relativa das classificações por região e padrão, de acordo com os períodos (D0, D1 e D2), segundo a avaliação do Examinador 4

Regiões e Padrões (Examinador 4)	(conclusão)		
	D0	D1	D2
Região periocular esquerda em repouso (E4OER)			
0	30 (94%)	32 (100%)	32 (100%)
1	2 (6.3%)	0 (0%)	0 (0%)
2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Região periocular esquerda em dinâmica			
0	1 (3.1%)	13 (41%)	1 (3.1%)
1	7 (22%)	12 (38%)	2 (6.3%)
2	3 (9.4%)	2 (6.3%)	3 (9.4%)
3	8 (25%)	4 (13%)	15 (47%)
4	6 (19%)	1 (3.1%)	7 (22%)
5	7 (22%)	0 (0%)	4 (13%)
Região periocular direita em repouso (E4ODR)			
0	31 (97%)	31 (97%)	32 (100%)
1	1 (3.1%)	1 (3.1%)	0 (0%)
2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
5	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Região periocular direita em dinâmica (E4ODD)			
0	0 (0%)	15 (47%)	1 (3.1%)
1	8 (25%)	9 (28%)	0 (0%)
2	3 (9.4%)	4 (13%)	7 (22%)
3	8 (25%)	4 (13%)	11 (34%)
4	6 (19%)	0 (0%)	10 (31%)
5	7 (22%)	0 (0%)	3 (9.4%)
N (%)			

Fonte: Elaboração própria, 2025.

#### 5.1.5.1 Região Frontal

Os resultados do coeficiente Kappa ponderado para a região Frontal em dinâmica entre os pares de examinadores nos tempos mostraram variações na concordância. No tempo D0, os valores de Kappa variaram de 0,66 a 1, com a maior concordância observada no par D0E2FD\_D0E4FD (Kappa=1). Os pares D0E1FD\_D0E2FD, D0E1FD\_D0E3FD e D0E1FD\_D0E4FD apresentaram Kappa entre 0,68 e 0,71, indicando concordância substancial. No tempo D1, os valores de Kappa variaram entre 0,61 e 1, com concordância máxima no par D1E1FD\_D1E4FD (Kappa = 1). Os outros pares apresentaram Kappa entre 0,61 e 0,64, refletindo concordância substancial. No tempo D2, a concordância variou de moderada a perfeita, com Kappa de 1 para os pares D2E1FD\_D2E4FD e D2E1FD\_D2E2FD, e Kappa entre 0,61 e 0,68 nos outros pares. Em resumo, os resultados indicaram concordância máxima entre os pares D0E2FD\_D0E4FD, D1E1FD\_D1E4FD, D2E1FD\_D2E4FD) (Tabela 13).

#### 5.1.5.2 Região Glabellar

Os resultados do coeficiente Kappa ponderado para a região glabellar em dinâmica (GD) nos tempos mostraram variações na concordância. No tempo D0, os valores de Kappa variaram de 0,26 a 1, com a maior concordância observada no par D0E2GD\_D0E4GD (Kappa = 1). Outros pares apresentaram Kappa entre 0,26 e 0,48, indicando concordância de suave a moderada. No tempo D1, a concordância foi maior, com valores de Kappa variando de 0,66 a 1. Os pares D1E1GD\_D1E4GD e D1E1GD\_D1E3GD mostraram Kappa=1 e 0,81, respectivamente, refletindo concordância substancial a perfeita. No tempo D2, a concordância também foi alta, com Kappa = 1 para os pares D2E1GD\_D2E4GD. Outros pares apresentaram Kappa entre 0,66 e 0,77, indicando concordância substancial (Tabela 13).

#### 5.1.5.3 Região Periocular Direita

Os resultados do coeficiente Kappa ponderado para a região periocular direita em dinâmica mostraram variações na concordância entre os tempos. No tempo D0, os valores de Kappa variaram de 0,39 a 1,00, com concordância máxima no par D0E2ODD\_D0E4ODD (Kappa=1) e concordância moderada nos demais pares. No tempo D1, os valores oscilaram entre 0,36 e 1,00, com maior concordância no par D1E1ODD\_D1E4ODD e concordância de moderada a substancial nos outros pares. No tempo D2, a concordância foi de moderada a

perfeita, com Kappa máximo no par D2E1ODD\_D2E4ODD e valores entre 0,36 e 0,50 nos demais. Em resumo, os pares que apresentaram concordância máxima foram D0E2ODD\_D0E4ODD, D1E1ODD\_D1E4ODD e D2E1ODD\_D2E4ODD (Tabela 13).

#### 5.1.5.4 Região Periocular Esquerda

Os resultados do coeficiente Kappa ponderado para a região periocular esquerda em dinâmica mostraram variações na concordância entre os tempos. No tempo D0, os valores de Kappa variaram de 0,28 a 1,00, com concordância máxima no par D0E2OED\_D0E4OED e concordância moderada nos pares D0E1OED\_D0E2OED e D0E1OED\_D0E4OED (Kappa = 0,49). No tempo D1, os valores oscilaram entre 0,40 e 1,00, com maior concordância no par D1E1OED\_D1E4OED.

Os pares D1E1OED\_D1E3OED e D1E3OED\_D1E4OED apresentaram Kappa substancial de 0,62, enquanto os demais pares tiveram concordância moderada. No tempo D2, os valores de Kappa variaram de 0,42 a 1,00, com concordância máxima no par D2E1OED\_D2E4OED. Os pares D2E1OED\_D2E3OED e D2E3OED\_D2E4OED apresentaram concordância substancial (Kappa = 0,60). Em resumo, os pares com concordância máxima foram D0E2OED\_D0E4OED, D1E1OED\_D1E4OED e D2E1OED\_D2E4OED (Tabela 13).

Em síntese, os resultados do coeficiente Kappa ponderado para as diferentes regiões do padrão dinâmico (frontal, glabellar, periocular direita e esquerda) indicaram variações na concordância entre os pares de examinadores ao longo dos tempos D0, D1 e D2. Em todas as regiões, os pares D0E2\_D0E4, D1E1\_D1E4 e D2E1\_D2E4 se destacaram com concordância máxima (Kappa=1). Além disso, outros pares apresentaram concordância substancial a moderada, refletindo uma consistência geral nos tempos avaliados.

Os resultados gerais de concordância para o padrão dinâmico mostraram variações entre as regiões faciais avaliadas. Na região frontal, a concordância variou de 40% a 59% ao longo dos três tempos avaliados. Para a região glabellar, a variação foi de 56% a 62%. Já nas regiões periorbitais, a concordância foi menor, variando de 25% a 50% para o lado direito e de 31% a 46% para o lado esquerdo.

Tabela 13 – Avaliação da concordância entre os examinadores no padrão dinâmico através do coeficiente Kappa ponderado

Frontal Dinâmico (FD)				Glabelar Dinâmico (GD)				Periocular Direita (ODD)				Periocular Esquerda (OED)			
Pair	Kappa	CI_Lower	CI_Upper	Pair	Kappa	CI_Lower	CI_Upper	Pair	Kappa	CI_Lower	CI_Upper	Pair	Kappa	CI_Lower	CI_Upper
D0E1FD_D0E2FD	0,68	0,58	0,78	D0E1GD_D0E2GD	0,26	0,02	0,5	D0E1ODD_D0E2ODD	0,44	0,26	0,62	D0E1OED_D0E2OED	0,49	0,33	0,65
D0E1FD_D0E3FD	0,71	0,57	0,85	D0E1GD_D0E3GD	0,45	0,1	0,8	D0E1ODD_D0E3ODD	0,39	0,19	0,59	D0E1OED_D0E3OED	0,36	0,16	0,56
D0E1FD_D0E4FD	0,68	0,58	0,78	D0E1GD_D0E4GD	0,26	0,02	0,5	D0E1ODD_D0E4ODD	0,44	0,26	0,62	D0E1OED_D0E4OED	0,49	0,33	0,65
D0E2FD_D0E3FD	0,66	0,48	0,84	D0E2GD_D0E3GD	0,48	0,19	0,77	D0E2ODD_D0E3ODD	0,43	0,21	0,65	D0E2OED_D0E3OED	0,28	0,12	0,44
D0E2FD_D0E4FD	1	1	1	D0E2GD_D0E4GD	1	1	1	D0E2ODD_D0E4ODD	1	1	1	D0E2OED_D0E4OED	1	1	1
D0E3FD_D0E4FD	0,66	0,48	0,84	D0E3GD_D0E4GD	0,48	0,19	0,77	D0E3ODD_D0E4ODD	0,43	0,21	0,65	D0E3OED_D0E4OED	0,28	0,12	0,44
D1E1FD_D1E2FD	0,64	0,35	0,93	D1E1GD_D1E2GD	0,66	0,44	0,88	D1E1ODD_D1E2ODD	0,46	0,22	0,7	D1E1OED_D1E2OED	0,4	0,18	0,62
D1E1FD_D1E3FD	0,63	0,36	0,9	D1E1GD_D1E3GD	0,81	0,65	0,97	D1E1ODD_D1E3ODD	0,62	0,42	0,82	D1E1OED_D1E3OED	0,62	0,48	0,76
D1E1FD_D1E4FD	1	1	1	D1E1GD_D1E4GD	1	1	1	D1E1ODD_D1E4ODD	1	1	1	D1E1OED_D1E4OED	1	1	1
D1E2FD_D1E3FD	0,61	0,34	0,88	D1E2GD_D1E3GD	0,7	0,5	0,9	D1E2ODD_D1E3ODD	0,36	0,11	0,61	D1E2OED_D1E3OED	0,4	0,15	0,65
D1E2FD_D1E4FD	0,64	0,35	0,93	D1E2GD_D1E4GD	0,66	0,44	0,88	D1E2ODD_D1E4ODD	0,46	0,22	0,7	D1E2OED_D1E4OED	0,4	0,18	0,62
D1E3FD_D1E4FD	0,63	0,36	0,9	D1E3GD_D1E4GD	0,81	0,65	0,97	D1E3ODD_D1E4ODD	0,62	0,42	0,82	D1E3OED_D1E4OED	0,62	0,48	0,76
D2E1FD_D2E2FD	0,68	0,54	0,82	D2E1GD_D2E2GD	0,68	0,52	0,84	D2E1ODD_D2E2ODD	0,5	0,34	0,66	D2E1OED_D2E2OED	0,46	0,26	0,66
D2E1FD_D2E3FD	0,66	0,52	0,8	D2E1GD_D2E3GD	0,77	0,65	0,89	D2E1ODD_D2E3ODD	0,5	0,32	0,68	D2E1OED_D2E3OED	0,6	0,42	0,78
D2E1FD_D2E4FD	1	1	1	D2E1GD_D2E4GD	1	1	1	D2E1ODD_D2E4ODD	1	1	1	D2E1OED_D2E4OED	1	1	1
D2E2FD_D2E3FD	0,61	0,43	0,79	D2E2GD_D2E3GD	0,66	0,52	0,8	D2E2ODD_D2E3ODD	0,36	0,18	0,54	D2E2OED_D2E3OED	0,42	0,22	0,62
D2E2FD_D2E4FD	0,68	0,54	0,82	D2E2GD_D2E4GD	0,68	0,52	0,84	D2E2ODD_D2E4ODD	0,5	0,34	0,66	D2E2OED_D2E4OED	0,46	0,26	0,66
D2E3FD_D2E4FD	0,66	0,52	0,8	D2E3GD_D2E4GD	0,77	0,65	0,89	D2E3ODD_D2E4ODD	0,5	0,32	0,68	D2E3OED_D2E4OED	0,6	0,42	0,78

Fonte: Elaboração própria, 2025.

## 5.2 SEGUNDA ETAPA – AVALIAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL

### 5.2.1 Avaliação da produção de anticorpos antitoxina IgG

Entre as duas etapas, houve perda de seguimento de um participante do sexo masculino, devido problemas no processamento de sua amostra. Para fins analíticos, foram analisados 31 participantes nessa etapa, sendo 16 do sexo feminino e 15 do sexo masculino, todos eles foram devidamente avaliados também na etapa anterior.

A dosagem de ATTx-IgG foi realizada nos 31 participantes nos três momentos (D0, D1 e D2). No tempo D0, a concentração média foi de 0,28 (desvio padrão: 0,10), com valores variando de 0,10 a 0,56. No tempo D1, a média observada foi de 0,28 (desvio padrão: 0,10), com variação entre 0,10 e 0,52. No tempo D2, a concentração média foi de 0,29 (desvio padrão: 0,09), variando de 0,13 a 0,49 (Tabela 14). A análise de ANOVA de medidas repetidas mostrou que não há evidência de diferença na produção média de ATTx-IgG ao longo do tempo (D0, D1 e D2) (p-valor = 0,52) (Figura 13). A análise do gráfico de probabilidade Normal (QQ-plot) mostrou correlação entre o conjunto de dados e a distribuição normal (Teste de Shapiro-Wilk, p-valor = 0,127; 0,271; 0,747). Como todos os pontos se situam aproximadamente ao longo da linha de referência, podemos assumir a normalidade (Figura 14).

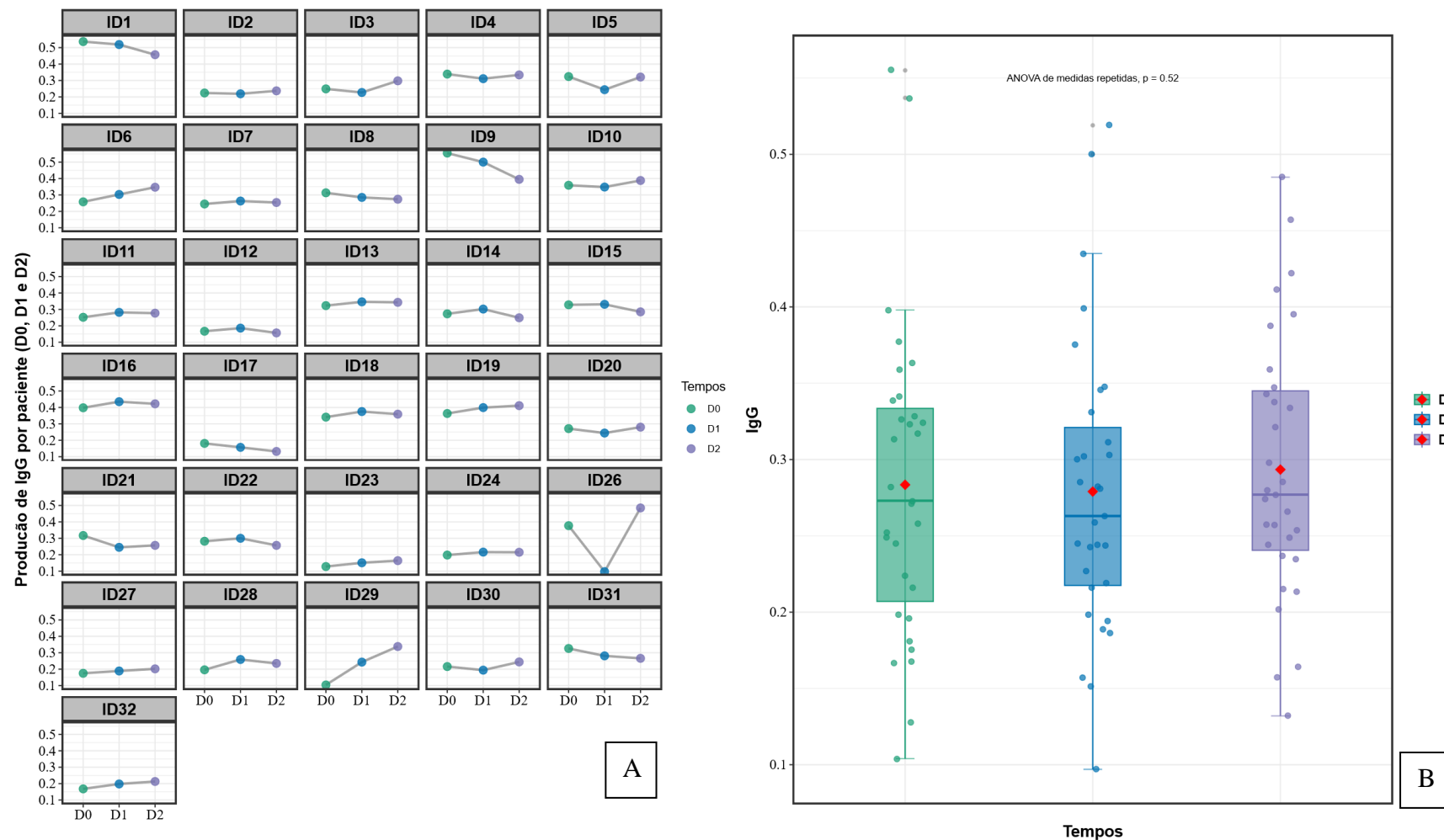
Tabela 14 – Dados de estatística descritiva, teste de normalidade de Shapiro Wilk e ANOVA

Medidas-resumo	n=31			p-valor <sup>1</sup>
	IgG_D0	IgG_D1	IgG_D2	
Média	0,28	0,28	0,29	0,52
Mediana	0,27	0,26	0,28	
Desvio padrão	0,10	0,10	0,09	
Mínimo	0,10	0,10	0,13	
Máximo	0,56	0,52	0,49	
Q1	0,21	0,22	0,24	
Q3	0,33	0,32	0,35	
IQR <sup>1</sup>	0,13	0,10	0,10	
Shapiro-Wilk	0,13	0,27	0,75	

Fonte: Elabora própria, 2025.

Nota: <sup>1</sup>ANOVA de medidas repetidas

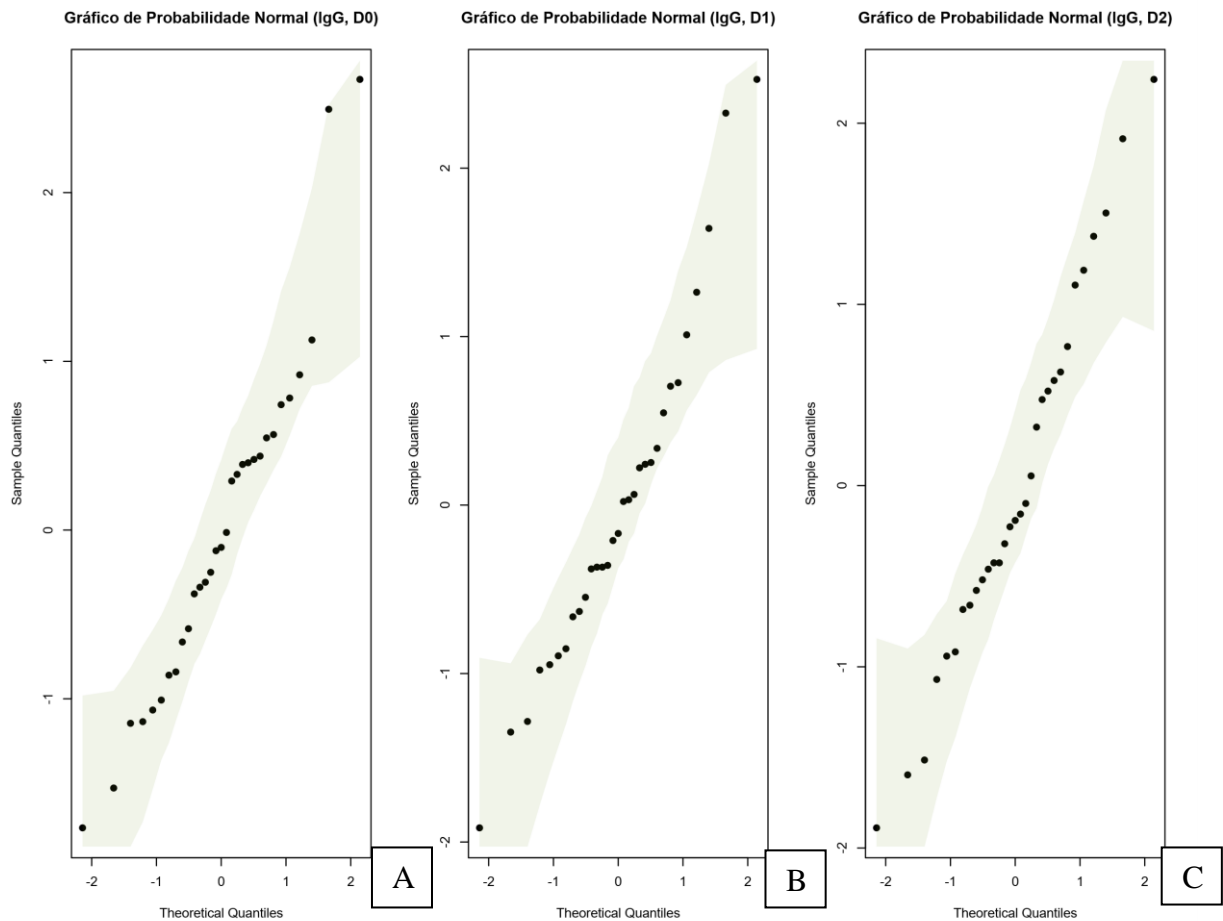
Figura 13 – Painel com Gráficos 13A e 13B representando a produção de ATTx-IgG nos três tempos



Fonte: Elaboração própria, 2025.

Nota: Gráfico A (esquerda) - Gráfico em linhas demonstrando Produção de ATTx-IgG por paciente no D0 (verde), D1 (azul), e D2 (roxo). Gráfico B (direita) - Gráfico Box Plot mostrando ANOVA de medidas repetidas no D0 (verde), D1 (azul) e D2 (roxo).

Figura 14 – Gráfico de probabilidade normal para variável ATTx-IgG nos três tempos



Fonte: Elaboração própria, 2025.

Nota: A) Tempo D0; B) Tempo D1; C) Tempo D2.

## 5.2.2 Avaliação da produção de anticorpos antitoxina IgG em homens e mulheres

Ao avaliar a produção de ATTx-IgG de acordo com o sexo dos pacientes, observamos que o nosso estudo não forneceu evidência de diferença na produção média de ATTx-IgG entre os sexos no D0 (Teste t de Student, p-valor = 0,81, IC95% = -0,07; 0,09), D1 (Teste t de Student, p-valor = 0,85, IC95% = -0,08; 0,06), e D2 (Teste t de Student, p-valor = 0,68, IC95% = -0,05; 0,08). No momento D0, a concentração média dos pacientes do sexo feminino foi de 0,29 (desvio padrão: 0,07) variando de 0,17 a 0,4. De maneira similar, a média dos pacientes do sexo masculino foi de 0,28 (desvio padrão: 0,13), variando de 0,1 a 0,56.

No D1, a concentração média foi 0,28 em ambos os grupos, com variabilidades similares (desvios padrão: 0,09 e 0,11). No momento D2, a concentração média dos pacientes do sexo feminino foi de 0,3 (desvio padrão: 0,09) variando de 0,16 a 0,49, enquanto a média dos pacientes do sexo masculino foi de 0,29 (desvio padrão: 0,09), variando de 0,13 a 0,46 (Tabela

15). Observou-se a presença de valores atípicos na produção de ATTx-IgG nos momentos D0 e D1 em dois pacientes do sexo masculino (ID1 e ID9).

No entanto, análises indicaram que esses valores, embora atípicos, não são considerados extremos. Valores acima de  $Q3 + 3 \times IQR$  ou abaixo de  $Q1 - 3 \times IQR$  são considerados outliers extremos. Além disso, a variabilidade na produção de ATTx-IgG foi semelhante entre os sexos feminino e masculino, sugerindo um comportamento homogêneo entre os grupos analisados (Figura 15).

Tabela 15 – Análise estatística descritiva comparada entre os sexos

Medidas-resumo	<i>Grupos</i>					
	Feminino (n=16)			Masculino (n=15)		
	D0	D1	D2	D0	D1	D2
Média	0,29	0,28	0,3	0,279	0,282	0,29
Mediana	0,29	0,27	0,28	0,258	0,259	0,27
Desvio padrão	0,07	0,09	0,0899	0,131	0,109	0,09
Mínimo	0,17	0,1	0,16	0,104	0,151	0,13
Máximo	0,4	0,44	0,49	0,555	0,519	0,46
Q1	0,24	0,22	0,25	0,188	0,213	0,24
Q3	0,34	0,34	0,35	0,325	0,302	0,34
IQR	0,1	0,12	0,11	0,136	0,089	0,1

Fonte: Elaboração própria, 2025.

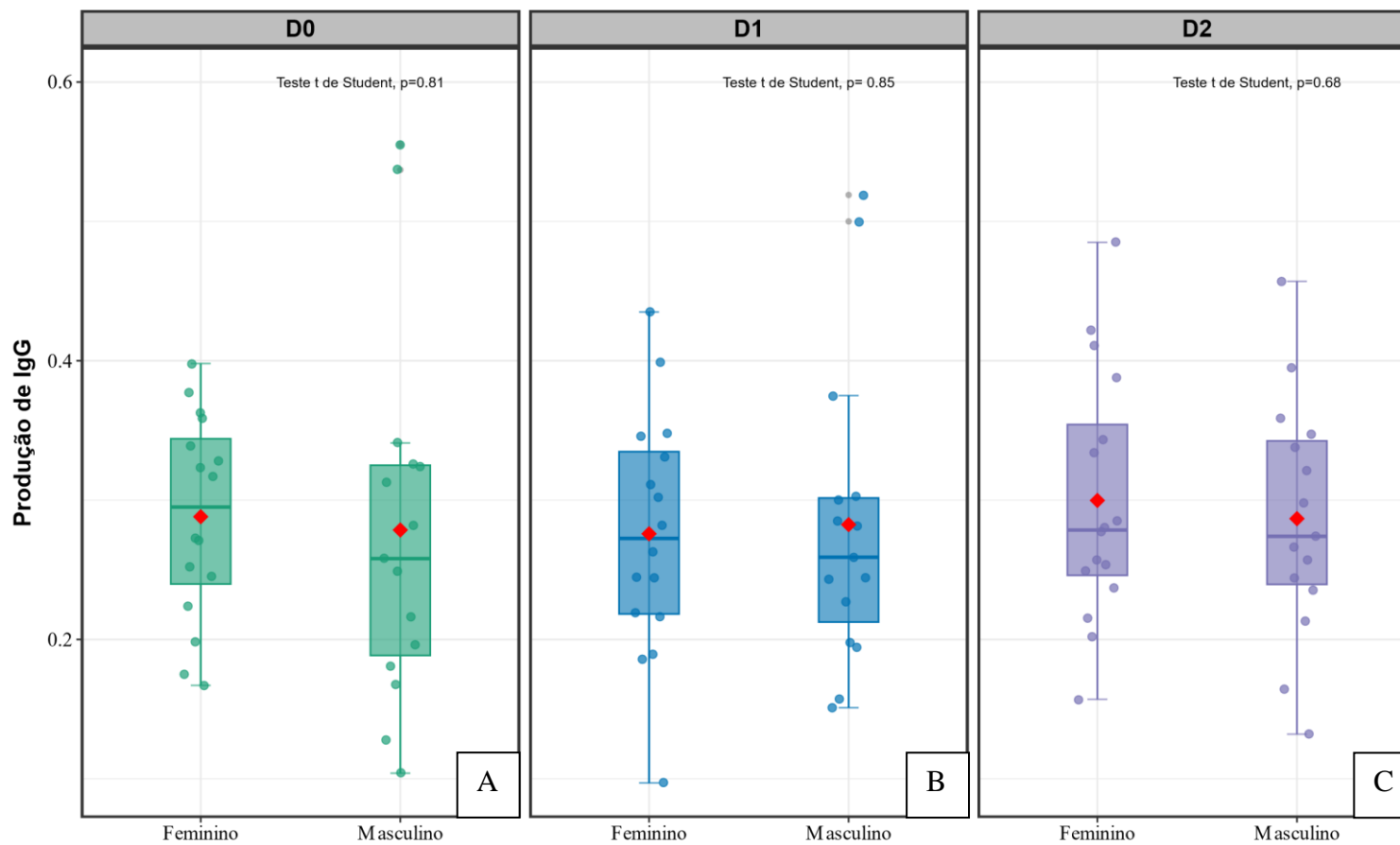
### 5.2.3 Avaliação da correlação entre a produção de anticorpos antitoxina IgG e a idade dos pacientes

Com o objetivo de investigar a possível correlação entre a produção de ATTx-IgG e a idade dos pacientes, foi elaborado um gráfico de dispersão. A análise não indicou evidências de correlação entre essas variáveis, conforme demonstrado pelo gráfico de dispersão e pelos coeficientes de correlação de Spearman obtidos ( $\rho = -0,28; -0,41; -0,20$ ) (Figura 16).

### 5.2.4 Avaliação da resposta clínica à aplicação de toxina botulínica para fins estéticos

De acordo com os critérios estabelecidos para a classificação da resposta clínica à toxina botulínica, 11 pacientes foram classificados como bons respondedores, 19 como moderados e 1 como ausente (Tabela 16).

Figura 15 – Gráfico Box plot mostrando a produção de ATTx-IgG nos três tempos e por sexo



Fonte: Elaboração própria, 2025.

Nota: A) Tempo D0 (verde); B) Tempo D1 (azul); C) Tempo D2 (roxo).

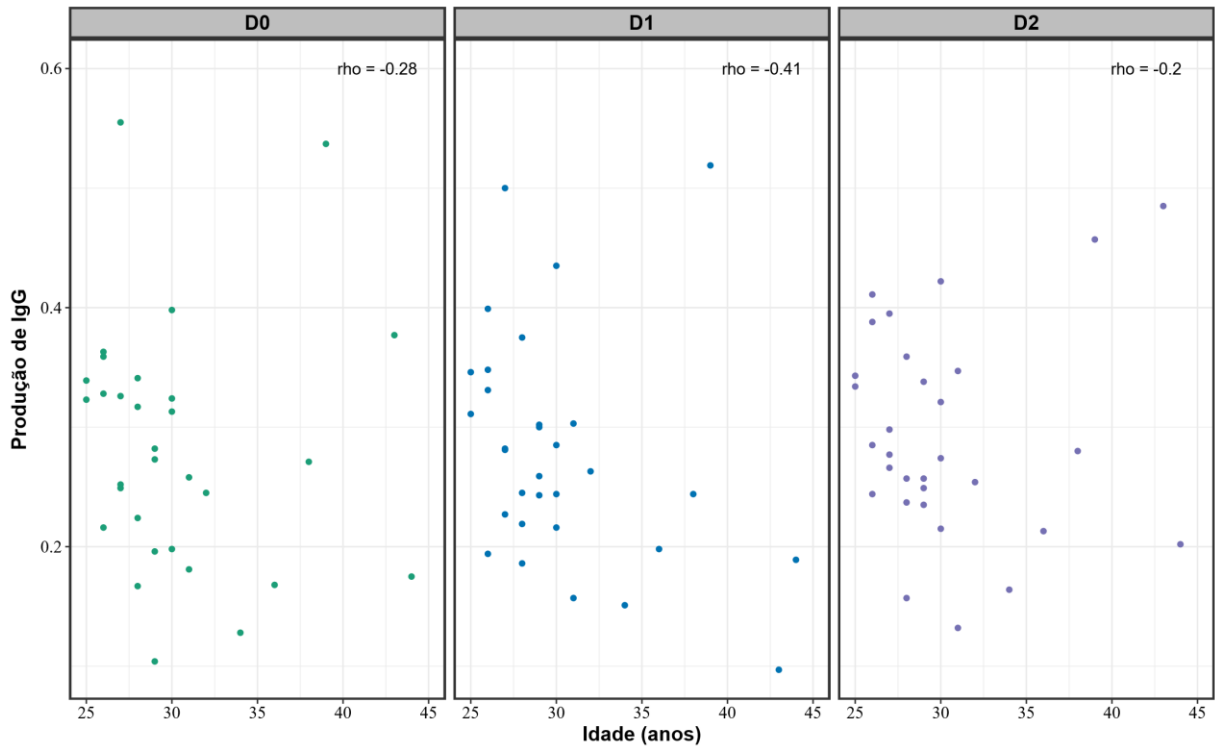
### 5.2.5 Análise de clusterização dos pacientes de acordo com a produção de anticorpos antitoxina IgG

Com o objetivo de agrupar os pacientes de acordo com o padrão de produção de ATTx-IgG, empregamos um algoritmo de aprendizado de máquina não supervisionado: a Clusterização Hierárquica. Essa abordagem visa agrupar indivíduos que apresentem características homogêneas dentro de cada grupo e heterogêneas entre si, considerando os níveis de ATTx-IgG nos três tempos analisados (D0, D1 e D2). A distância euclidiana foi utilizada como medida de similaridade, e os resultados foram analisados a partir de três métodos de encadeamento: único (*Single Linkage*), médio (*Average Linkage*) e completo (*Complete Linkage*). Após avaliação comparativa, o método de encadeamento único foi selecionado para a definição dos clusters porque prioriza as menores distâncias.

O dendrograma resultante indicou a formação de quatro clusters: Cluster 1 (indivíduo 29 – ID29), Cluster 2 (ID1 e ID9), Cluster 3 (ID26) e Cluster 0, que reuniu os demais indivíduos (27 pacientes) (Figura 17). No *cluster 0*, a produção média de ATTx-IgG manteve-se constante ao longo dos três tempos avaliados (D0, D1 e D2), com valor de 0,27. Nos demais clusters, observou-se variação nos níveis médios entre os diferentes tempos. No cluster 1, a média de ATTx-IgG foi de 0,10 em D0, aumentando para 0,24 em D1 e atingindo 0,34 em D2. Já no cluster 2, observou-se uma redução progressiva: 0,55 em D0, 0,51 em D1 e 0,43 em D2. No cluster 3, a média foi de 0,38 em D0, apresentou queda para 0,10 em D1, seguida por um aumento para 0,49 em D2 (Tabela 17).

Esses agrupamentos foram posteriormente utilizados como variável de entrada (*input*) no Teste de hipótese de Fisher, com o objetivo de investigar possíveis associações entre os clusters e a resposta clínica.

Figura 16 - Gráfico de dispersão mostrando a produção de ATTx-IgG por idade nos três tempos



Fonte: Elaboração própria, 2025.

Tabela 16 – Quantificação de ATTx-IgG nos três tempos, estratificação da resposta clínica e o cluster correspondente a cada paciente (ID)

<b>Paciente</b>	<b>D0</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>Resposta clínica</b>	<b>Cluster</b>
ID1	0,537	0,519	0,457	Moderada_resposta	2
ID2	0,224	0,219	0,237	Moderada_resposta	0
ID3	0,249	0,227	0,298	Moderada_resposta	0
ID4	0,339	0,311	0,334	Ausente	0
ID5	0,324	0,244	0,321	Boa_resposta	0
ID6	0,258	0,303	0,347	Moderada_resposta	0
ID7	0,245	0,263	0,254	Moderada_resposta	0
ID8	0,313	0,285	0,274	Moderada_resposta	0
ID9	0,555	0,5	0,395	Moderada_resposta	2
ID10	0,359	0,348	0,388	Moderada_resposta	0
ID11	0,252	0,282	0,277	Boa_resposta	0
ID12	0,167	0,186	0,157	Boa_resposta	0
ID13	0,323	0,346	0,343	Moderada_resposta	0
ID14	0,273	0,302	0,249	Moderada_resposta	0
ID15	0,328	0,331	0,285	Boa_resposta	0
ID16	0,398	0,435	0,422	Moderada_resposta	0
ID17	0,181	0,157	0,132	Moderada_resposta	0
ID18	0,341	0,375	0,359	Moderada_resposta	0
ID19	0,363	0,399	0,411	Moderada_resposta	0
ID20	0,271	0,244	0,28	Boa_resposta	0
ID21	0,317	0,245	0,257	Boa_resposta	0
ID22	0,282	0,3	0,257	Boa_resposta	0
ID23	0,128	0,151	0,164	Boa_resposta	0
ID24	0,198	0,216	0,215	Boa_resposta	0
ID26	0,377	0,097	0,485	Moderada_resposta	3
ID27	0,175	0,189	0,202	Moderada_resposta	0
ID28	0,196	0,259	0,235	Boa_resposta	0
ID29	0,104	0,243	0,338	Moderada_resposta	1
ID30	0,216	0,194	0,244	Boa_resposta	0
ID31	0,326	0,281	0,266	Moderada_resposta	0
ID32	0,168	0,198	0,213	Moderada_resposta	0

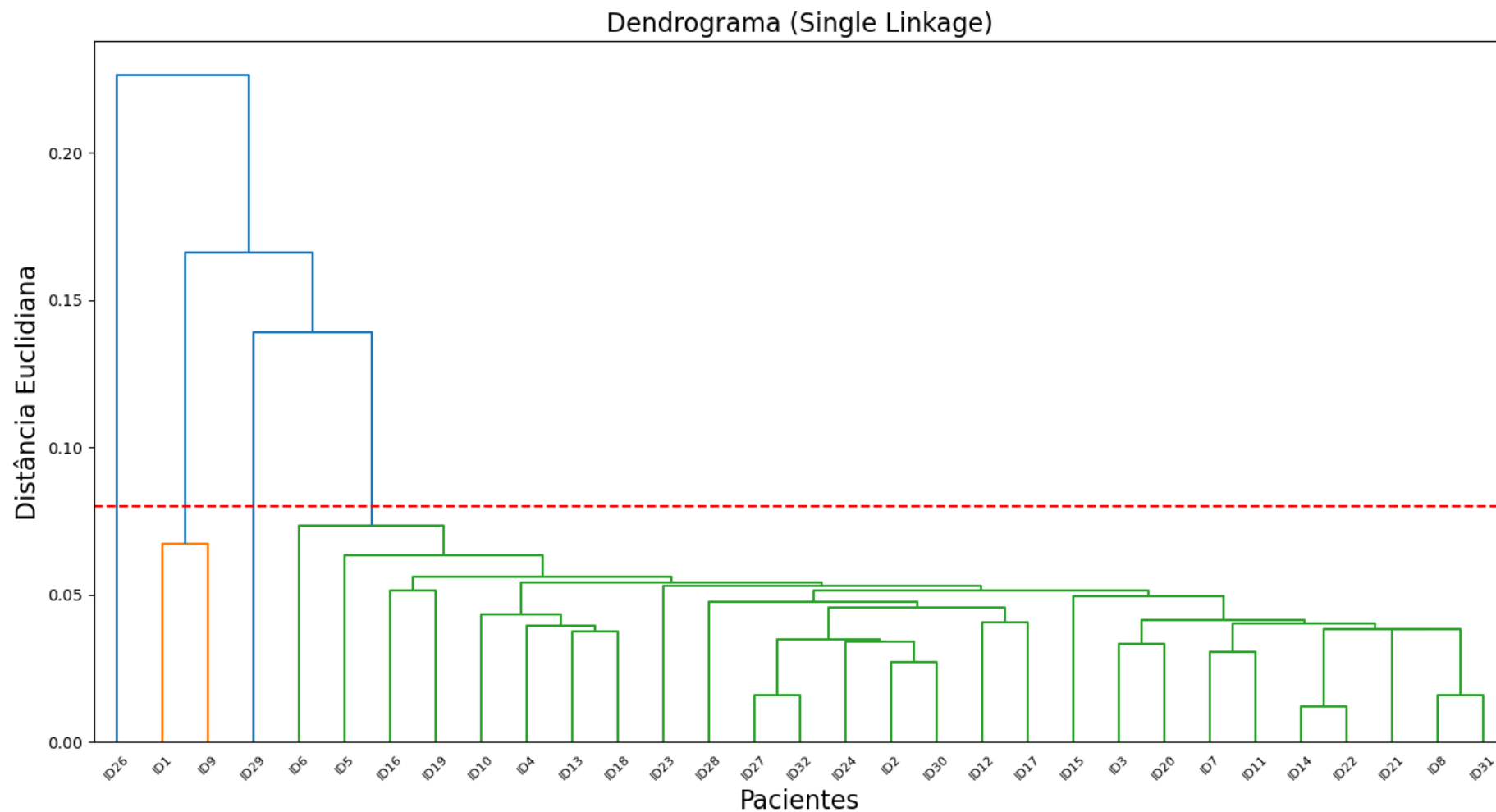
Fonte: Elaboração própria, 2025.

Tabela 17 – Média de produção de ATTx-IgG nos três tempos (D0, D1 e D2) e por cluster

<b>Cluster</b>	<b>n</b> <b>(n=31)</b>	<b>D0</b> <b>(média)</b>	<b>D1</b> <b>(média)</b>	<b>D2</b> <b>(média)</b>
0	27	0,27	0,27	0,27
1	1	0,10	0,24	0,34
2	2	0,55	0,51	0,43
3	1	0,38	0,10	0,49

Fonte: Elaboração própria, 2025.

Figura 17 – Gráfico em forma de Dendrograma apresentando a clusterização



Fonte: Elaboração própria, 2025.

Nota: No eixo X encontra-se os pacientes e no eixo Y encontra-se a distância euclidiana utilizada no método Single Linkage. O cluster 3 é formado pelo ID26; o Cluster 2 é formado pelos ID1 e ID9; o Cluster 3 é formado pelo ID 29; e o cluster 0 é composto pelos demais paciente (total de 27 pacientes).

### 5.2.6 Associação entre a resposta clínica à aplicação de toxina botulínica e o nível de anticorpos antitoxina IgG

A análise de clusterização permitiu agrupar os pacientes com base no padrão de produção de ATTx-IgG. A variável “cluster” foi utilizada para construir a tabela de contingência e avaliar a associação entre a resposta clínica e os clusters formados. Dentre os 27 pacientes pertencentes ao cluster 0, 11 foram classificados como tendo uma boa resposta clínica, 15 apresentaram uma resposta moderada e 1 foi classificado como ausente. Por outro lado, os pacientes dos demais clusters (1, 2 e 3) foram classificados exclusivamente como tendo uma resposta moderada. A análise não evidenciou associação entre a resposta clínica à aplicação da toxina botulínica e os clusters formados com base na produção de ATTx-IgG (Teste exato de Fisher, p-valor = 0,82) (Tabela 18).

Tabela 18 – Associação entre resposta clínica e cluster

Cluster	Resposta clínica			Total	p-valor <sup>1</sup>
	Boa	Ausente	Moderada		
0	11	1	15	27	0,82
1	0	0	1	1	
2	0	0	2	2	
3	0	0	1	1	
Total	11	1	19	31	

Fonte: Elaboração própria, 2025.

Nota: <sup>1</sup>Teste exato de Fisher.



## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 SOBRE A COORTE

O estudo apresentou cerca de 8% de perda de seguimento, o que não resultou em grandes impactos para análise estatística desse estudo e é aceitável para literatura (Ferreira; Patino, 2019; Miot, 2011). Dois participantes perderam seguimento ainda na etapa clínica, pois não retornaram ao D2, provavelmente porque avaliaram que não haveria benefícios em retornar a esse momento já que não seria realizado novas aplicações de BTX. Assim sendo, a coorte da primeira etapa incluiu 32 participantes (16 de cada sexo). Outro participante perdeu seguimento na etapa laboratorial devido a problemas no processamento da amostra. Logo, na segunda etapa, a coorte abarcou 31 participantes (15 do sexo masculino e 16 do sexo feminino).

Todos os participantes eram “virgens” de exposição à BTX. Tal critério tornou a análise mais homogênea e reduziu a chance de possíveis fatores confundidores, haja vista que exposições prévias podem influenciar a produção de NABs e, conseqüentemente, a perda de resposta clínica. Todavia, não há um consenso sobre a quantidade exata de aplicações prévias ou dose acumulada de BTX que podem ocasionar tal efeito. (Bellows; Jankovic, 2019; Brin *et al.*, 2008; Gart; Gutowski, 2016; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Müller *et al.*, 2009; Naumann *et al.*, 2013; Rahman; Alhitmi; Mosahebi, 2022).

Por outro lado, o pressuposto de ser “virgem” à exposição à BTX reduz as chances de encontrar os não respondedores, uma vez que limita apenas aos “não respondedores primários”, os quais são de baixa prevalência (Bellows; Jankovic, 2019; Gart; Gutowski, 2016; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000). Aliado a isso, o estudo possui uma coorte pequena, o que limita as análises estatísticas, reduzindo as possibilidades de encontrar dados e associações com evidências.

Mesmo assim, esse estudo encontrou uma paciente não respondedora primária, o que é de grande importância à literatura e ajuda a suscitar questionamentos sobre a real prevalência da ARP e os possíveis fatores relacionados a essa condição. Além disso, o tamanho amostral trouxe limitações na interpretação e análise dos dados,

### 6.2 DIFERENÇA DAS UNIDADES DE TOXINA BOTULÍNICA APLICADAS EM HOMENS E MULHERES

Os homens receberam uma dose de BTX superior às mulheres, porém não foi possível fornecer evidência de diferença entre os sexos através desse estudo, o que se deve, provavelmente, ao tamanho amostral. Afinal, na literatura já é descrito uso de doses maiores no sexo masculino, pois, quanto maior a massa e a atividade muscular, maior será a dose utilizada e, geralmente, os homens possuem músculos maiores e/ou mais fortes (Carruthers; Carruthers, 2006; Gart; Gutowski, 2016; Keaney; Alster, 2013).

Além disso, as doses aplicadas em cada sexo no D0, média de 46 U nas mulheres e de 50 U nos homens, está condizente com a literatura (Carruthers; Carruthers, 2006; Flynn, 2010; Gart; Gutowski, 2016; Keaney; Alster, 2013). Vale ressaltar que uma única participante do sexo feminino destoou não somente do grupo das mulheres, mas como de todos os participantes, pois recebeu dose bem acima da média. Isso demonstra que o sexo não é o único fator determinante para definição de dose a ser aplicada, necessitando avaliar outros fatores como intensidade da atividade muscular, técnica utilizada, grupo muscular injetado e possível resistência clínica (primária ou secundária) (Bellows; Jankovic, 2019; Gart; Gutowski, 2016; Naumann *et al.*, 2013; Rahman; Alhitmi; Mosahebi, 2022).

### 6.3 CONCORDÂNCIA ENTRE OS EXAMINADORES POR REGIÃO

A aplicação do Kappa ponderado entre as regiões, na avaliação das rugas dinâmicas, demonstrou maior concordância dos examinadores no que tange às regiões frontal e glabellar do que às regiões periocular direita e esquerda. Esse achado provavelmente se deve às particularidades da região periocular, uma vez que as ríides periorculares possuem diversos padrões descritos e distintos das demais regiões. Além disso, elas são influenciadas por múltiplos fatores como a flacidez, idade, história prévia de tabagismo, fotodano, espessura cutânea, quantidade de gordura subcutânea e, por fim, pelo padrão específico de contração do músculo orbicular lateral do olho (Kane, 2003; Kane *et al.*, 2015).

Para além, ainda é possível observar que a concordância geral foi de leve à moderada e não houve diferença significativa entre os lados direito e esquerdo da região periocular. Porém, vale ressaltar que alguns examinadores concordaram 100% (Kappa = 1) entre si em alguns períodos e regiões, demonstrando que a escala utilizada é um bom instrumento de avaliação, todavia, pode ser aperfeiçoada (Cohen, 1968; Landis; Koch, 1977; Lemperle *et al.*, 2001).

### 6.4 AVALIAÇÕES CLÍNICAS DA RESPOSTA À APLICAÇÃO DE TOXINA BOTULÍNICA PELOS EXAMINADORES

Os resultados evidenciaram uma tendência geral de melhora das rugas ao longo do tempo, a qual foi mais evidente no D1, o que é compatível com o pico de ação da BTX que ocorre entre 1-4 semanas após a aplicação conforme descrito anteriormente. Partindo desse raciocínio, já era esperado que houvesse uma melhora das rugas no D2, porém inferior ao D1, haja vista que, segundo a literatura, o período de ação da toxina gira em torno de 3-6 meses, tempo necessário para a restauração da fisiologia normal (Gart; Gutowski, 2016; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Naumann *et al.*, 2013; Park; Ahn, 2021; Sundaram *et al.*, 2016).

Avaliando assim, talvez fosse necessário um D2 com intervalo menor em relação ao D0, para que assim a resposta clínica pudesse ser melhor avaliada ainda na vigência da duração do efeito para todos os participantes.

Para além, os examinadores também concordaram que a resposta clínica para as rugas em repouso foi superior à das rugas dinâmicas. Esse resultado vai de encontro à literatura, a qual evidencia benefício o contrário, ou seja, a aplicação da BTX melhora tanto as rugas dinâmicas quanto as rugas em repouso, todavia, o benefício é maior no primeiro caso (Flynn, 2010; Gart; Gutowski, 2016; Small, 2014; Sundaram *et al.*, 2016)

Uma explicação também possível sobre o porquê desse resultado reside no fato de que a escala de avaliação utilizada nesse estudo, foi elaborada por outros autores apenas para avaliação das rugas estáticas. Porém, diante do escasso repertório de instrumentos de avaliação das rugas dinâmicas, nesse estudo, optou-se por utilizar uma mesma escala para avaliação das rítmicas dinâmicas e estáticas (Lemperle *et al.*, 2001).

Assim sendo, como houve resultado diferente do demonstrado pela literatura, mesmo diante da concordância significativa entre os examinadores, faz-se necessário refletir que esse instrumento de avaliação talvez seja mais adequado para avaliação apenas das rugas estáticas.

## 6.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTITOXINA - IgG

A dosagem de ATTx-IgG foi realizada nos 31 participantes ao longo dos três tempos (D0, D1 e D2) e, dado o comportamento das imunoglobulinas (Carnicelli *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2023), esperava-se diferença na concentração média ao longo do tempo, porém isso não se confirmou após a análise de ANOVA de medidas repetidas. Isso pode ser explicado pelo tamanho amostral pequeno, utilização do método ELISA para quantificação dos ATTx-IgG e/ou devido ao intervalo de tempo utilizado para dosar o ATTx-IgG, o qual pode ter sido curto.

Sobre o método ELISA, sabe-se que ele é susceptível a reações cruzadas entre anticorpos e não possui a capacidade de diferenciar os NABs dos não neutralizantes (Bellows; Jankovic, 2019; Alhaji; Zubair; Farhana, 2023; Franco *et al.*, 2021). Quanto ao intervalo de tempo da dosagem, esse fator é importante, pois a Imunoglobulina M (IgM), que não foi dosada nesse estudo, é formada precocemente e antes da IgG (Carnicelli *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2023). Tal fato, inclusive, pode ter influenciado na formação de falsos-negativos. Logo, nessa perspectiva, talvez a dosagem de IgM possa trazer novas contribuições e conclusões, ainda mais no contexto de um tamanho amostral pequeno como o desse estudo.

Contudo, vale ressaltar que os AATx são tipicamente IgG, o que pode justificar a medição apenas da IgG (Bellows; Jankovic, 2019). Além disso, o D2 ocorreu 120 dias depois do D0, tempo suficiente para formação de IgG, esperando assim que houvesse diferença entre os tempos, a qual pode não ter se comprovado, mais provavelmente, pelo tamanho amostral (Carnicelli *et al.*, 2021; Rahman; Carruthers, 2024; Zhang *et al.*, 2023).

Além disso, não houve diferença na produção de ATTx-IgG quando comparado os sexos e as idades, o que está em conformidade com o que há de registro até hoje na literatura (Bellows; Jankovic, 2019; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Naumann *et al.*, 2013; Rahman; Carruthers, 2024).

## 6.6 CORRELAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL

A análise pareada dos tempos D0 e D1 para avaliar diferenças nas doses aplicadas entre os períodos permitiu concluir que há diferença entre as unidades médias de BTX aplicadas entre os períodos em todas as regiões ( $p$ -valor  $< 0,001$ ), o que já era esperado pela descrição da literatura. Afinal, o efeito da BTX se inicia entre 2º e 5º dia e atinge um pico de ação entre a 1ª e 4ª semana (Colhado; Boeing; Ortega, 2009; Flynn, 2010; Flynn; Clark 2nd, 2003; Luquetti *et al.*, 2024), assim sendo, como o D1 ocorreu 15-21 dias após o D0, esperava-se que doses menores fossem aplicadas no D1, pois, nesse momento, os participantes já se encontravam sob o efeito da BTX e a maioria já no pico da ação.

Contudo, uma única participante do sexo feminino necessitou de dose maior no D1 do que no D0, em todas as regiões, inclusive bem superior à média (recebeu 52U versus 9U da média no D1). Vale ressaltar que os examinadores concordaram, em todas as regiões e em ambos os padrões de mímica facial, que a paciente não apresentou resposta clínica entre os tempos. Essa ausência de resposta torna-se mais expressiva entre o D0 e D1, momento em que se esperava melhora mais evidente conforme o padrão dos demais participantes e pela própria

ação da BTX, porém ocorreu o contrário e há piora das rírides em todas as regiões, conforme evidencia as Figuras 18-21 (Colhado; Boeing; Ortega, 2009; Flynn, 2010; Luquetti *et al.*, 2024).

Diante do caso de ausência de resposta primária da paciente 4 é necessário considerar, antes da imunogenicidade, outros fatores como: dose insuficiente, atividade muscular muito intensa ou técnica inadequada (Bellows; Jankovic, 2019; Gart; Gutowski, 2016; Müller *et al.*, 2009; Naumann *et al.*, 2013). O último fator é menos provável, haja vista que, os profissionais injetores do estudo foram os mesmos para todos os participantes e, pela análise, é possível observar que os participantes, em sua maioria, responderam clinicamente à aplicação da BTX. Além disso, a equipe que injetou possui experiência em cosmiatria e, em especial, na aplicação de BTX para fins estéticos.

Nesse contexto, esperava-se que a paciente 4 apresentasse maiores níveis de AATx e/ou alocação em cluster específico no momento da clusterização. Contudo, isso não se confirmou, pois ela apresentou níveis de AATx similares à maioria dos participantes e integrou o maior cluster (Cluster 0) que detém 87% dos pacientes da coorte. Além disso, ao se realizar o Teste de Associação de Fisher o valor do p é igual 0,82 ( $p > 0,05$ ). Portanto, observa-se que não houve associação entre a ausência da resposta clínica e os níveis dos AATx.

Em adendo, os pacientes 1 e 9, alocados no cluster 2 e classificados como resposta clínica moderada, apresentaram níveis elevados de ATTx-IgG. Como a resposta clínica moderada é inferior à melhor resposta (“boa resposta”) bem como espera-se que a primeira aplicação seja a melhor resposta clínica do indivíduo (Small, 2014; Sundaram *et al.*, 2016), mais uma vez aventou-se a possibilidade da associação entre AATx e resposta clínica. Contudo, ao se realizar o Teste de Associação de Fisher, não conseguimos encontrar evidência estatística suficiente ( $p = 0,82$ ).

A literatura aponta para a existência de uma relação entre a resposta clínica e a presença de NABs (Bellows; Jankovic, 2019; Choudhury *et al.*, 2021; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Shtefan; Fletcher; Duclos, 2022). Porém, o que ocorreu com a paciente 4 demonstra que há outras causas para ausência da resposta clínica para além da imunogenicidade. Dose insuficiente, injeção muscular incorreta, forma de armazenamento e reconstituição podem comprometer a resposta clínica (Rahman; Carruthers, 2024; Shtefan; Fletcher; Duclos, 2022), porém são de baixa probabilidade para essa paciente, haja vista que outros participantes foram submetidos às mesmas condições, mas apresentaram responsividade clínica.

Já foi sugerido a possibilidade de mutações impedindo a ligação da BTX aos seus receptores ou a clivagem dos seus substratos, levando a ausência de resposta clínica. Entretanto,

estudos mais recentes não encontraram tal evidência (Pirazzini *et al.*, 2018; Rahman; Carruthers, 2024).

Outras hipóteses mais prováveis incluem alterações sinápticas (porém esperava que a paciente pudesse apresentar outras alterações), uso de alguns medicamentos, perfil imunológico e variações genéticas da própria paciente (Bellows; Jankovic, 2019; Huang; Foster; Rogachefsky, 2000; Rahman; Carruthers, 2024; Shtefan; Fletcher; Duclos, 2022). Essa última tem ganhado cada vez mais importância, pois estudos identificaram alelos específicos do antígeno leucocitário humano (HLA), como HLA-DQA1\*01:02 e HLADQB1\*06:04, associados ao aumento da suscetibilidade a respostas imunes contra BTX. Isso consegue explicar muitos casos de ausência de resposta clínica que não eram devidamente justificados pela presença ou ausência dos NABs (Oshima *et al.*, 2017; Rahman; Carruthers, 2024).

Outro ponto de discussão é a elevação de AATx sem necessariamente haver comprometimento da resposta clínica, como ocorreu com os pacientes 1 e 9. Porém, já é sabido que há indivíduos que apresentam resposta clínica mesmo na vigência de títulos elevados de AATx, demonstrando que há outros fatores implicados na responsividade clínica, tais como as variações genéticas (Bellows; Jankovic, 2019; Rahman; Carruthers, 2024).

As limitações do método ELISA podem também explicar essa elevação de AATx mesmo na vigência de resposta clínica. A começar pelo fato de não conseguir diferenciar os anticorpos neutralizantes dos não neutralizantes (Bellows; Jankovic, 2019). Além disso, esse bioensaio possui uma faixa de quantificação limitada e é susceptível à reação cruzada e interferências, alterando seu resultado com ligações não intencionais (Alhadj; Zubair; Farhana, 2023; Franco *et al.*, 2021).

Atualmente, na suspeição de ausência de resposta clínica, recomenda-se revisão pormenorizada do histórico clínico (incluindo as fotografias) e da dosagem e técnica de aplicação. Caso a suspeita de imunogenicidade persista, recomenda-se o ELISA, se for positivo, o paciente deve realizar o Teste do Extensor Digitorum Brevis (EDB) (Rahman; Carruthers, 2024).

Figura 18 – Fotografias da paciente 4 no D0 (à esquerda) e D1 (à direita) evidenciando as rugas glabélares no padrão dinâmico da mímica facial



Fonte: Acervo do estudo, 2025.

Figura 19 – Fotografias da paciente 4 no D0 (à esquerda) e D1 (à direita) evidenciando as rugas frontais no padrão dinâmico da mímica facial



Fonte: Acervo do estudo, 2025.

Figura 20 - Fotografias da paciente 4 no D0 (à esquerda) e D1 (à direita) evidenciando as rugas perioculares à esquerda no padrão dinâmico da mímica facial



Fonte: Acervo do estudo, 2025.

Figura 21 - Fotografias da paciente 4 no D0 (à esquerda) e D1 (à direita) evidenciando as rugas perioculares à direita no padrão dinâmico da mímica facial



Fonte: Acervo do estudo, 2025.

O resultado positivo no EDB deve levar à realização de testes para os marcadores HLA DQA101:02 e HLA-DQB106:04; se o resultado for positivo, recomenda-se aconselhamento. Todavia, se resultado negativo, é necessário reavaliar o plano de tratamento do paciente, com potencial para suspender o tratamento por 6 a 12 semanas para permitir a redução dos títulos de anticorpos (Rahman; Carruthers, 2024).

Nesse contexto, entende-se que os NABs existem e influenciam a resposta clínica, porém sua prevalência é baixa (Bellows; Jankovic, 2019; Rahman; Carruthers, 2024). Isso pode explicar o fato desse estudo, com tamanho amostral reduzido, não ter encontrado relação entre NABs e resposta clínica. Contudo, esse estudo piloto foi essencial para o delineamento e viabilidade de estudos maiores em torno dessa temática.

## 7 CONCLUSÃO

Como houve boa concordância entre os examinadores, podemos concluir que a ferramenta de avaliação clínica utilizada nesse estudo foi um bom método. Isso é fundamental, primeiro porque permitiu que o estudo prosseguisse para a fase final e, segundo, porque não há um consenso na literatura sobre a melhor forma de avaliar a resposta clínica à aplicação de toxina botulínica. Logo, esse estudo contribuiu para a propagação de um método acessível, de fácil entendimento e com boa concordância entre examinadores.

Uma paciente destacou-se por necessitar de doses maiores de toxina botulínica e não ter apresentado resposta clínica. Diante disso, esperava-se níveis elevados de AATx, porém isso não ocorreu. Esse fato já sugeria não haver relação entre a resposta clínica e os níveis de ATTX-IgG, mas isso foi reforçado após o Teste de Fisher. Outras possibilidades de insuficiência na resposta clínica devem ser investigadas, pois são mais prevalentes e incluem as questões técnicas, histórico clínico do paciente, perfil imunológico e variações genéticas.

Por outro lado, alguns pacientes apresentaram resposta clínica e, paradoxalmente, níveis elevados de AATx. Nesse contexto, já há essa descrição na literatura e as variações genéticas ganham novamente importância, pois pode ser a explicação para que isso ocorra. Além disso, o método ELISA apresenta limitações que podem também explicar essa alteração. Apesar disso, continua sendo um método bastante utilizado dado sua acessibilidade.

Por fim, esse estudo apresentou limitações no que tange ao tamanho amostral, ausência de quantificação de IgM e outras inerentes ao método ELISA, porém conseguiu chegar a conclusões importantes e elucidação de alguns questionamentos. Todavia, espera-se estudos mais abrangentes, pois ainda há muitos questionamentos em aberto e o conhecimento acerca do tema ainda precisa ser ampliado.



## 8 REFERÊNCIAS

- ALBANESE, A.; BHATIA, K.; BRESSMAN, S. B.; DELONG, M. R.; FAHN, S.; FUNG, V. S. *et al.* Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update. **Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society**, v. 28, n. 7, p. 863–873, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mds.25475>. Acesso em: 11 maio 2025.
- ALEXIADES-ARMENAKAS, M. A quantitative and comprehensive grading scale for rhytides, laxity, and photoaging. **Journal of drugs in dermatology: JDD**, v. 5, n. 8, p. 808–9, set. 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16989197/>. Acesso em: 11 maio 2025.
- ALHAJJ, M.; ZUBAIR, M.; FARHANA, A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). **StatPearls [Internet]**, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>. Acesso em: 11 maio 2025.
- ALMEIDA, A. T.; CARRUTHERS, J.; COX, S. E.; GOLDMAN, M. P.; WHEELER, S.; GALLAGHER, C. J. Patient satisfaction and safety with aesthetic onabotulinumtoxinA after at least 5 years: a retrospective cross-sectional analysis of 4,402 glabellar treatments. **Dermatologic Surgery: Official Publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]**, v. 41, Suppl. 1, p. S19–S28, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000000275>. Acesso em: 11 maio 2025.
- ALMEIDA, A. T.; MARQUES, E. R. C.; BANEGAS, R.; KADUNC, B. V. Glabellar Contraction Patterns: A Tool to Optimize Botulinum Toxin Treatment. **Dermatologic Surgery**, v. 38, n. 9, p. 1506–1515, set. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2012.02505.x>. Acesso em: 11 maio 2025.
- ANDRADE, C. D. **O avesso das coisas: aforismos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Record, 1990.
- AOKI, K. R.; GUYER, B. Botulinum toxin type A and other botulinum toxin serotypes: a comparative review of biochemical and pharmacological actions. **European Journal of Neurology**, v. 8, n. s5, p. 21–29, nov. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1468-1331.2001.00035.x>. Acesso em: 11 maio 2025.
- ATASSI, M. Z.; DOLIMBEK, B. Z.; JANKOVIC, J.; STEWARD, L. E.; AOKI, K. R. Regions of botulinum neurotoxin A light chain recognized by human anti-toxin antibodies from cervical dystonia patients immunoresistant to toxin treatment: the antigenic structure of the active toxin recognized by human antibodies. **Immunobiology**, v. 216, n. 7, p. 782–792, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.12.009>. Acesso em: 11 maio 2025.
- BATOOL, N.; CHELLAPPA, R. Fast detection of facial wrinkles based on Gabor features using image morphology and geometric constraints. **Pattern Recognition**, v. 48, n. 3, p. 642–658, mar. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.patcog.2014.08.003>. Acesso em: 11 maio 2025.
- BELLOWS, S.; JANKOVIC, J. Immunogenicity Associated with Botulinum Toxin Treatment. **Toxins**, v. 11, n. 9, p. 491, 26 ago. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins11090491>. Acesso em: 11 maio 2025.

BINZ, T.; RUMMEL, A. Cell entry strategy of clostridial neurotoxins. **Journal of Neurochemistry**, [S. l.], v. 109, n. 6, p. 1584–1595, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06093.x>. Acesso em: 11 maio 2025.

BORBA, A.; MATAYOSHI, S.; RODRIGUES, M. Avoiding complications on the upper face treatment with botulinum toxin: a practical guide. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 46, n. 1, p. 385–394, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00266-021-02483-1>. Acesso em: 11 maio 2025.

BORODIC, G. E.; COZZOLINO, D. Blepharospasm and its treatment, with emphasis on the use of botulinum toxin. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 83, n. 3, p. 546–54, mar. 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00006534-1989033000-00028>. Acesso em: 11 maio 2025.

BRIN, M. F.; COMELLA, C. L.; JANKOVIC, J.; LAI, F.; NAUMANN, M.; CD-017 BONTA STUDY GROUP. Long-term treatment with botulinum toxin type A in cervical dystonia has low immunogenicity by mouse protection assay. **Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society**, v. 23, n. 10, p. 1353–1360, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mds.22157>. Acesso em: 11 maio 2025.

BURSTEIN, R.; BLUMENFELD, A. M.; SILBERSTEIN, S. D.; MANACK ADAMS, A.; BRIN, M. F. Mechanism of action of OnabotulinumtoxinA in chronic migraine: a narrative review. **Headache**, v. 60, n. 7, p. 1259–1272, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/head.13849>. Acesso em: 11 maio 2025.

CARNICELLI, A.; FIORI, B.; RICCI, R.; PIANO, A.; BONADA, N.; TADDEI, E. *et al.* Characteristic of IgA and IgG antibody response to SARS-CoV-2 infection in an Italian referral COVID-19 Hospital. **Internal and Emergency Medicine**, v. 17, n. 1, p. 53–64, 10 maio 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11739-021-02750-8>. Acesso: 11 maio 2025.

CARRUTHERS, J.; FAGIEN, S.; MATARASSO, S. L.; BOTOX CONSENSUS GROUP. Consensus recommendations on the use of botulinum toxin type A in facial aesthetics. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 114, n. 6 Suppl, p. 1S–22S, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/01.PRS.0000144795.76040.D3>. Acesso em: 11 maio 2025.

CARRUTHERS, A.; CARRUTHERS, J. Prospective, Double-Blind, Randomized, Parallel-Group, Dose-Ranging Study of Botulinum Toxin Type A in Men with Glabellar Rhytids. **Dermatologic Surgery**, v. 31, n. 10, p. 1297–1303, 21 mar. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2005.31206>. Acesso em: 11 maio 2025.

CARRUTHERS, A.; CARRUTHERS, J.; HARDAS, B.; KAUR, M.; GOERTELMEYER, R.; JONES, D. *et al.* A validated grading scale for crow's feet. **Dermatologic Surgery: Official Publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]**, v. 34, supl. 2, p. S173–S178, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2008.34367.x>. Acesso em: 11 maio 2025.

CARRUTHERS, A.; SADICK, N.; BRANDT, F.; ALMEIDA, A. R. T.; FAGIEN, S.; GOODMAN, G. J. *et al.* Evolution of Facial Aesthetic Treatment Over Five or More

Years. **Dermatologic Surgery**, v. 41, n. 6, p. 693–701, jun. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/dss.0000000000000340>. Acesso em: 11 maio 2025.

CARRUTHERS, A., DONOFRIO, L.; HARDAS, B.; MURPHY, D. K.; CARRUTHERS, J.; SYKES, J. M. *et al.* Development and Validation of a Photometric Scale for Evaluation of Static Horizontal Forehead Lines. **Dermatologic Surgery**, v. 42, n. 1, p. S243–S250, out. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/dss.0000000000000855>. Acesso em: 11 maio 2025.

CHOUDHURY, S.; BAKER, M. R.; CHATTERJEE, S.; KUMAR, H. Botulinum Toxin: An Update on Pharmacology and Newer Products in Development. **Toxins**, v. 13, n. 1, p. 58, 14 jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins13010058>. Acesso em: 11 maio 2025.

COHEN, J. Weighted kappa: Nominal scale agreement provision for scaled disagreement or partial credit. **Psychological bulletin**, v. 70, n. 4, p. 213, 1968. Disponível em: <https://doi.org/10.1037/h0026256>. Acesso em: 11 maio 2025.

COLHADO, O. C. G.; BOEING, M.; ORTEGA, L. B. Botulinum toxin in pain treatment. **Revista Brasileira De Anestesiologia**, v. 59, n. 3, p. 366–381, 1 maio 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0034-70942009000300013>. Acesso em: 11 maio 2025.

DHAKED, R. K.; SINGH, M. K.; SINGH, P.; GUPTA, P. Botulinum toxin: bioweapon & magic drug. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 132, n. 5, p. 489–503, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21149997/>. Acesso em: 11 maio 2025.

DOLLY, J. O.; AOKI, K. R. The structure and mode of action of different botulinum toxins. **European Journal of Neurology**, v. 13, n. s4, p. 1–9, dez. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2006.01648.x>. Acesso em: 11 maio 2025.

DRESSLER, D.; DIRNBERGER, G.; BHATIA, K. P.; IRMER, A.; QUINN, N. P.; BIGALKE, H. *et al.* Botulinum toxin antibody testing: comparison between the mouse protection assay and the mouse lethality assay. **Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society**, v. 15, n. 5, p. 973–6, set. 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/1531-8257\(200009\)15:5%3C973::aid-mds1031%3E3.0.co;2-x](https://doi.org/10.1002/1531-8257(200009)15:5%3C973::aid-mds1031%3E3.0.co;2-x). Acesso em: 11 maio 2025.

DRESSLER, D. Clinical presentation and management of antibody-induced failure of botulinum toxin therapy. **Movement Disorders**, v. 19, n. S8, p. S92–S100, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mds.20022>. Acesso em: 11 maio 2025.

DRESSLER, D.; SABERI, F. A.; KOLLEWE, K.; SCHRADER, C. Safety aspects of incobotulinumtoxinA high-dose therapy. **Journal of Neural Transmission**, v. 122, n. 2, p. 327–333, 17 jul. 2014a. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1252-9>. Acesso em: 11 maio 2025.

DRESSLER, D.; GESSLER, F.; TACIK, P.; BIGALKE, H. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of botulinum toxin-antibodies. **Movement Disorders**, v. 29, n. 10, p. 1322–1324, 29 jul. 2014b. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mds.25956>. Acesso em: 11 maio 2025.

DRESSLER, D.; BIGALKE, H. Immunological aspects of botulinum toxin therapy. **Expert review of neurotherapeutics**, v. 17, n. 5, p. 487–494, 1 maio 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14737175.2017.1262258>. Acesso em: 11 maio 2025.

DRESSLER, D.; BIGALKE, H.; ROTHWELL, J. C. The sternocleidomastoid test: an in vivo assay to investigate botulinum toxin antibody formation in humans. **Journal of Neurology**, v. 247, n. 8, p. 630–632, 30 ago. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s004150070132>. Acesso em: 11 maio 2025.

DRESSLER, D.; JOHNSON, E. A. Botulinum toxin therapy: past, present and future developments. **Journal of Neural Transmission**, v. 129, n. 5-6, p. 829–833, 9 abr. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00702-022-02494-5>. Acesso em: 11 maio 2025.

**Dysport® 500U – Toxina botulínica - 1 frasco-ampola. Galderma.** 2022. Disponível em: <https://www.mygaldermastore.com.br/dysport-500.html>. Acesso em: 11 maio 2025.

ESPINOZA, Y.; WONG, D.; AHENE, A.; DER, K.; MARTINEZ, Z.; PHAM, J. *et al.* Pharmacokinetics of Human Recombinant Anti-Botulinum Toxin Antibodies in Rats. **Toxins**, v. 11, n. 6, p. 345, 1 jun. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins11060345>. Acesso em: 11 maio 2025.

FASSI, A.; SANGALLI, F.; COLOMBI, F.; PERICO, N.; REMUZZI, G.; REMUZZI, A. Beneficial effects of calcium channel blockade on acute glomerular hemodynamic changes induced by cyclosporine. **American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation**, v. 33, n. 2, p. 267–275, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0272-6386\(99\)70299-4](https://doi.org/10.1016/s0272-6386(99)70299-4). Acesso em: 11 maio 2025.

FERREIRA, J. C.; PATINO, C. M. Loss to follow-up and missing data: important issues that can affect your study results. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 45, n. 2, 25 abr. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1806-3713/e20190091>. Acesso em: 11 maio 2025.

FIELD, M.; SPLEVINS, A.; PICAUT, P.; VAN DER SCHANS, M.; LANGENBERG, J.; NOORT, D. *et al.* AbobotulinumtoxinA (Dysport®), OnabotulinumtoxinA (Botox®), and IncobotulinumtoxinA (Xeomin®) neurotoxin content and potential implications for duration of response in patients. **Toxins**, v. 10, n. 12, p. 535, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins10120535>. Acesso em: 11 maio 2025.

FISHER, G. J. The pathophysiology of photoaging of the skin. **Cutis**, v. 75, n. 2 Suppl, p. 5–8; discussion 8-9, 1 fev. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15773537/>. Acesso em: 11 maio 2025.

FLYNN, T. C. Botulinum toxin: examining duration of effect in facial aesthetic applications. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 11, n. 3, p. 183–199, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.2165/11530110-000000000-00000>. Acesso em: 11 maio 2025.

FLYNN, T. C.; CLARK 2nd, R. E. Botulinum Toxin Type B (MYOBLOC) Versus Botulinum Toxin Type A (BOTOX) Frontalis Study: Rate of Onset and Radius of Diffusion. **Dermatologic Surgery**, v. 29, n. 5, p. 519–522, maio 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1524-4725.2003.29124.x>. Acesso em: 11 maio 2025.

FRANCO, V. L. M.; MARQUES, L. O. C.; DINIZ, S. G. S.; ASSUNÇÃO, V. I. S.; NOGUEIRA, A. B. L.; BRAGAGNOLO, J. C. B. *et al.* A técnica de elisa e a sua importância para o diagnóstico clínico. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 9, p. 89877–89885, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n9-243>. Acesso em: 11 maio 2025.

FREIMAN, A.; BIRD, G.; METELITSA, A. I.; BARANKIN, B.; LAUZON, G. J. Cutaneous effects of smoking. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 8, n. 6, p. 415–423, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10227-005-0020-8>. Acesso em: 11 maio 2025.

FREVERT, J.; DRESSLER, D. Complexing proteins in botulinum toxin type A drugs: a help or a hindrance? **Biologics: Targets & Therapy**, v. 4, p. 325–332, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/btt.s14902>. Acesso em: 11 maio 2025.

FUJINO, S.; IWANAGA, T. Real-time wrinkle evaluation method using Visual Illusion-based image feature enhancement System. **Skin Research and Technology**, v. 29, n. 1, 16 nov. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/srt.13206>. Acesso em: 11 maio 2025.

GART, M. S.; GUTOWSKI, K. A. Overview of Botulinum Toxins for Aesthetic Uses. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 43, n. 3, p. 459–471, jul. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cps.2016.03.003>. Acesso em: 11 maio 2025.

GIMENEZ, R.; GEMPERLI, R.; SALLES, A. G.; FERREIRA, M. C. Evaluation of the frontal and glabellar wrinkles after multiple botulinum toxin type A injections. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 25, n. 2, p. 297–303, 2010. Disponível em: <https://www.rbcpc.org.br/Content/imagebank/pdf/v25n2a12.pdf>. Acesso em: 11 maio 2025.

GONNERING, R. S. Negative Antibody Response to Long-Term Treatment of Facial Spasm With Botulinum Toxin. **American Journal of Ophthalmology**, v. 105, n. 3, p. 313–315, mar. 1988. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0002-9394\(88\)90016-5](https://doi.org/10.1016/0002-9394(88)90016-5). Acesso em: 11 maio 2025.

GOODMAN, G. J.; HALSTEAD, M. B.; ROGERS, J. D.; BORZILLO, D.; RYAN, E.; RILEY, N. *et al.* A software program designed to educate patients on age-related skin changes of facial and exposed extrafacial regions: the results of a validation study. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 5, p. 23–31, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/CCID.S26920>. Acesso em: 11 maio 2025.

GÖSCHEL, H.; WOHLFARTH, K.; FREVERT, J.; DENGLER, R.; BIGALKE, H. Botulinum A toxin therapy: neutralizing and nonneutralizing antibodies--therapeutic consequences. **Experimental Neurology**, v. 147, n. 1, p. 96–102, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/exnr.1997.6580>. Acesso em: 11 maio 2025.

HANNA, E.; PON, K. Updates on Botulinum Neurotoxins in Dermatology. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 21, n. 2, p. 157–162, 28 nov. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40257-019-00482-2>. Acesso em: 11 maio 2025.

HANNA, P. A.; JANKOVIC, J.; VINCENT, A. Comparison of mouse bioassay and immunoprecipitation assay for botulinum toxin antibodies. **Journal of Neurology**,

**Neurosurgery & Psychiatry**, v. 66, n. 5, p. 612–616, 1 maio 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/jnnp.66.5.612>. Acesso em: 11 maio 2025.

HANNA, P. A.; JANKOVIC, J. Mouse bioassay versus Western blot assay for botulinum toxin antibodies Correlation with clinical response. **Neurology**, v. 50, n. 6, p. 1624–1629, 1 jun. 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1212/wnl.50.6.1624>. Acesso em: 11 maio 2025.

HATZIS, J. The wrinkle and its measurement--a skin surface Profilometric method. **Micron (Oxford, England: 1993)**, v. 35, n. 3, p. 201–219, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2003.11.007>. Acesso em: 11 maio 2025.

HECKMANN, M.; SCHÖN-HUPKA, G. Quantification of the efficacy of botulinum toxin type A by digital image analysis. **Journal of The American Academy of Dermatology**, v. 45, n. 4, p. 508–514, 1 out. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1067/mjd.2001.116216>. Acesso em: 11 maio 2025.

HOEDEMAEKERS, A. C.; VRIESMAN, P. J. V. B.; DE BAETS, M. H. Myasthenia gravis as a prototype autoimmune receptor disease. **Immunologic research**, v. 16, n. 4, p. 341–54, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/bf02786398>. Acesso em: 11 maio 2025.

HSIUNG, G. Y.; DAS, S. K.; RANAWAYA, R.; LAFONTAINE, A. L.; SUCHOWERSKY, O. Long-term efficacy of botulinum toxin A in treatment of various movement disorders over a 10-year period. **Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society**, v. 17, n. 6, p. 1288–1293, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mds.10252>. Acesso em: 11 maio 2025.

HUANG, W.; FOSTER, J. A.; ROGACHEFSKY, A. S. Pharmacology of botulinum toxin. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 43, n. 2, p. 249–259, ago. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1067/mjd.2000.105567>. Acesso em: 11 maio 2025.

JACOBI, U.; CHEN, M.; FRANKOWSKI, G.; SINKGRAVEN, R.; HUND, M.; RZANY, B. *et al.* In vivo determination of skin surface topography using an optical 3D device. **Skin Research and Technology: Official Journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS), International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) and International Society for Skin Imaging (ISSI)**, v. 10, n. 4, p. 207–214, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2004.00075.x>. Acesso em: 11 maio 2025.

KANE, M. A. C. Classification of Crows Feet Patterns among Caucasian Women: The Key to Individualizing Treatment. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 112, n. Supplement, p. 33S–39S, out. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000082192.45787.b6>. Acesso em: 11 maio 2025.

KANE, M.A.C.; COX, S.E.; JONES, D.; LEI, X.; GALLAGHER, C.J. Heterogeneity of Crow's Feet Line Patterns in Clinical Trial Subjects. **Dermatologic Surgery**, v. 41, n. 4, p; 447–456, abr. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25789814/>. Acesso em: 11 maio de 2025.

KASSIR, M.; GUPTA, M.; GALADARI, H.; KROUMPOUZOS, G.; KATSAMBAS, A.; LOTTI, T. *et al.* Complications of botulinum toxin and fillers: a narrative review. **Journal of**

**Cosmetic Dermatology**, v. 19, n. 3, p. 570–573, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jocd.13266>. Acesso em: 11 maio 2025.

KEANEY, T.; ALSTER, T. Botulinum Toxin in Men: Review of Relevant Anatomy and Clinical Trial Data. **Dermatologic surgery**, v. 39, p.1434-1443, 01 out. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/dsu.12302>. Acesso em: 11 maio 2025.

KLEIN, A. W. Contraindications and complications with the use of botulinum toxin. **Clinics in Dermatology**, v. 22, n. 1, p. 66–75, 1 jan. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2003.12.026>. Acesso em: 11 maio 2025.

LACY, D. B.; TEPP, W.; COHEN, A. C.; DASGUPTA, B. R.; STEVENS, R. C. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. **Nature Structural Biology**, v. 5, n. 10, p. 898–902, 1 out. 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/2338>. Acesso em: 11 maio 2025.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159–174, 1 mar. 1977. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/843571/>. Acesso em: 11 maio 2025.

LANGE, O.; BIGALKE, H.; DENGLER, R.; WEGNER, F.; DEGROOT, M.; WOHLFARTH, K. Neutralizing antibodies and secondary therapy failure after treatment with botulinum toxin type A: much ado about nothing? **Clinical Neuropharmacology**, v. 32, n. 4, p. 213–218, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/WNF.0b013e3181914d0a>. Acesso em: 11 maio 2025.

LEMPERLE, G.; HOLMES, R. E.; COHEN, S. R.; LEMPERLE, S. M. A classification of facial wrinkles. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 108, n. 6, p. 1735–1752, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00006534-200111000-00048>. Acesso em: 11 maio 2025.

LUQUETTI, C. M.; ZANONI, R. D.; ALVES NETO, L. B.; ASSIS, G. P.; HEIDEMANN, D. B.; DINIZ, B. B. *et al.* Toxina Botulínica para Indicações Cosméticas: uma visão geral. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, [S. l.], v. 6, n. 8, p. 3515–3527, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.36557/2674-8169.2024v6n8p3515-3527>. Acesso em: 11 maio 2025.

MIOT, H. A. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 10, n. 4, p. 275–278, dez. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1677-54492011000400001>. Acesso em: 11 maio 2025.

MONHEIT, G.; LIN, X.; NELSON, D.; KANE, M. Consideration of muscle mass in glabellar line treatment with botulinum toxin type A. **Journal of Drugs in Dermatology: JDD**, v. 11, n. 9, p. 1041–1045, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23135645/>. Acesso em: 11 maio 2025.

MOREL, E.; FEUILLET-FIEUX, M. N.; VERNET-DER GARABEDIAN, B.; RAIMOND, F.; D'ANGLEJAN, J.; BATAILLE, R. *et al.* Autoantibodies in D-penicillamine-induced myasthenia gravis: a comparison with idiopathic myasthenia and rheumatoid arthritis.

**Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 58, n. 3, p. 318–330, 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0090-1229\(91\)90123-r](https://doi.org/10.1016/0090-1229(91)90123-r). Acesso em: 11 maio 2025.

MÜLLER, K.; MIX, E.; ADIB SABERI, F.; DRESSLER, D.; BENECKE, R. Prevalence of neutralising antibodies in patients treated with botulinum toxin type A for spasticity. **Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)**, v. 116, n. 5, p. 579–585, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00702-009-0223-z>. Acesso em: 11 maio 2025.

NAUMANN, M.; BOO, L. M.; ACKERMAN, A. H.; GALLAGHER, C. J. Immunogenicity of botulinum toxins. **Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)**, v. 120, n. 2, p. 275–290, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00702-012-0893-9>. Acesso em: 11 maio 2025.

NESTOR, M. S.; HAN, H.; GADE, A.; FISCHER, D.; SABAN, Y.; POLSELLI, R. Botulinum toxin-induced blepharoptosis: anatomy, etiology, prevention, and therapeutic options. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 20, n. 10, p. 3133–3146, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jocd.14361>. Acesso em: 11 maio 2025.

NGUYEN, T. V.; HONG, J.; PROSE, N. S. Compassionate care: enhancing physician-patient communication and education in dermatology: Part I: patient-centered communication. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 68, n. 3, p. 353.e1–353.e38, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2012.10.059>. Acesso em: 11 maio 2025.

OSHIMA, M.; DEITIKER, P.; HASTINGS-ISON, T.; AOKI, K. R.; GRAHAM, H. K.; ATASSI, M. Z. Antibody responses to botulinum neurotoxin type A of toxin-treated spastic equinus children with cerebral palsy: a randomized clinical trial comparing two injection schedules. **Journal of Neuroimmunology**, v. 306, p. 31–39, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.02.014>. Acesso em: 11 maio 2025.

PARK, M. Y.; AHN, K. Y. Scientific review of the aesthetic uses of botulinum toxin type A. **Archives of Craniofacial Surgery**, v. 22, n. 1, p. 1–10, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.7181/acfs.2021.00003>. Acesso em: 11 maio 2025.

PECK, M. W.; SMITH, T. J.; ANNIBALLI, F.; AUSTIN, J. W.; BANO, L.; BRADSHAW, M. *et al.* Historical perspectives and guidelines for botulinum neurotoxin subtype nomenclature. **Toxins**, v. 9, n. 1, p. 38, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins9010038>. Acesso em: 11 maio 2025.

PIRAZZINI, M.; CARLE, S.; BARTH, H.; ROSSETTO, O.; MONTECUCCO, C. Primary resistance of human patients to botulinum neurotoxins A and B. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 5, n. 8, p. 971–975, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/acn3.586>. Acesso em: 11 maio 2025.

RAHMAN, E.; ALHITMI, H. K.; MOSAHEBI, A. Immunogenicity to botulinum toxin type A: a systematic review with meta-analysis across therapeutic indications. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 42, n. 1, p. 106–120, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/asj/sjab058>. Acesso em: 11 maio 2025.

RAHMAN, E.; CARRUTHERS, J. D. A. Immunogenicity of botulinum toxin A: insights. **Dermatologic Surgery: Official Publication for American Society for Dermatologic**

**Surgery** [*et al.*], v. 50, n. 9S, p. S117–S126, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000004293>. Acesso em: 11 maio 2025.

RAMIREZ-CASTANEDA, J.; JANKOVIC, J. Long-term efficacy and safety of botulinum toxin injections in dystonia. **Toxins**, v. 5, n. 2, p. 249–266, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins5020249>. Acesso em: 11 maio 2025.

ROSALES, R. L.; BIGALKE, H.; DRESSLER, D. Pharmacology of botulinum toxin: differences between type A preparations. **European Journal of Neurology**, v. 13, Suppl. 1, p. 2–10, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2006.01438.x>. Acesso em: 11 maio 2025.

SCAGLIONE, F. Conversion ratio between Botox®, Dysport®, and Xeomin® in clinical practice. **Toxins**, v. 8, n. 3, p. 65, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins8030065>. Acesso em: 11 maio 2025.

SCHIAVO, G.; MALIZIO, C.; TRIMBLE, W. S.; LAURETO, P. P.; MILAN, G.; SUGIYAMA, H. *et al.* Botulinum G neurotoxin cleaves VAMP/synaptobrevin at a single Ala-Ala peptide bond. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 32, p. 20213–20216, 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8051110/>. Acesso em: 11 maio 2025.

SECK, A.; DEE, H.; SMITH, W.; TIDDEMAN, B. 3D surface texture analysis of high-resolution normal fields for facial skin condition assessment. **Skin Research and Technology: Official Journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS), International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) e International Society for Skin Imaging (ISSI)**, v. 26, n. 2, p. 169–186, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/srt.12793>. Acesso em: 11 maio 2025.

SEGURA-AGUILAR, J.; TIZABI, Y. Botulinum Neurotoxin, an Example of Successful Translational Research. **Clinical pharmacology and translational medicine**, v. 2, n. 3, p. 125–126, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30801056/>. Acesso em: 11 maio 2025.

SETHI, N.; SINGH, S.; DEBOULLE, K.; RAHMAN, E. A review of complications due to the use of botulinum toxin A for cosmetic indications. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 45, n. 3, p. 1210–1220, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00266-020-01983-w>. Acesso em: 11 maio 2025.

SHOSHANI, D.; MARKOVITZ, E.; MONSTREY, S. J.; NARINS, D. J. The modified Fitzpatrick Wrinkle Scale: a clinical validated measurement tool for nasolabial wrinkle severity assessment. **Dermatologic Surgery: Official Publication for American Society for Dermatologic Surgery** [*et al.*], v. 34, Suppl. 1, p. S85–S91, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2008.34248.x>. Acesso em: 11 maio 2025.

SHTEFAN, V.; FLETCHER, J.; DUCLOS, O. A. Causes of botulinum toxin treatment failure. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 15, p. 1045–1049, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/CCID.S363321>. Acesso em: 11 maio 2025.

SMALL, R. Botulinum toxin injection for facial wrinkles. **American Family Physician**, v. 90, n. 3, p. 168–175, 1 ago. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25077722/>. Acesso em: 11 maio 2025.

SOLISH, N.; CARRUTHERS, J.; KAUFMAN, J.; RUBIO, R. G.; GROSS, T. M.; GALLAGHER, C. J. Overview of DaxibotulinumtoxinA for injection: a novel formulation of botulinum toxin type A. **Drugs**, v. 81, n. 18, p. 2091–2101, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01631-w>. Acesso em: 11 maio 2025.

STEPHAN, F.; HABRE, M.; TOMB, R. Clinical resistance to three types of botulinum toxin type A in aesthetic medicine. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 13, n. 4, p. 346–348, 17 nov. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jocd.12108>. Acesso em: 11 maio 2025.

SUNDARAM, H.; SIGNORINI, M.; LIEW, S.; ALMEIDA, A. R. T.; WU, Y.; BRAZ, A. V. *et al.* Global Aesthetics Consensus: Botulinum Toxin Type A--evidence-based review, emerging concepts, and consensus recommendations for aesthetic use, including updates on complications. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 137, n. 3, p. 518e–529e, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000475758.63709.23>. Acesso: 11 maio 2025.

TOMIC, M. T.; FARR-JONES, S.; SYAR, E. S.; NIEMUTH, N.; KOBBS, D.; HACKETT, M. J. *et al.* Neutralizing concentrations of anti-botulinum toxin antibodies positively correlate with mouse neutralization assay results in a guinea pig model. **Toxins**, v. 13, n. 9, p. 671, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins13090671>. Acesso em: 11 maio 2025.

VINCENT, A.; LANG, B.; NEWSOM-DAVIS, J. Autoimmunity to the voltage-gated calcium channel underlies the Lambert-Eaton myasthenic syndrome, a paraneoplastic disorder. **Trends in Neurosciences**, v. 12, n. 12, p. 496–502, 1989. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90109-4](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90109-4). Acesso em: 11 maio 2025.

VINCENT, A.; WILLCOX, N.; HILL, M.; CURNOW, J.; MACLENNAN, C.; BEESON, D. Determinant spreading and immune responses to acetylcholine receptors in myasthenia gravis. **Immunological Reviews**, v. 164, p. 157–168, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1998.tb01217.x>. Acesso em: 11 maio 2025.

VOLLER, B.; MORARU, E.; AUFF, E.; BENESCH, M.; POEWE, W.; WISSEL, J. *et al.* Ninhydrin sweat test: a simple method for detecting antibodies neutralizing botulinum toxin type A. **Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society**, v. 19, n. 8, p. 943–947, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mds.20073>. Acesso: 11 maio 2025.

WANG, Y. C.; BURR, D. H.; KORTHALS, G. J.; SUGIYAMA, H. Acute toxicity of aminoglycoside antibiotics as an aid in detecting botulism. **Applied and environmental microbiology**, v. 48, n. 5, p. 951–955, 1984. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aem.48.5.951-955.1984>. Acesso em: 11 maio 2025.

YAMADA, S.; KUNO, Y.; IWANAGA, H. Effects of aminoglycoside antibiotics on the neuromuscular junction: Part I. **International journal of clinical pharmacology, therapy, and toxicology**, v. 24, n. 3, p. 130–8, mar. 1986. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3699939/>. Acesso em: 11 maio 2025.

YAO, G.; ZHANG, S.; MAHRHOLD, S.; LAM, K. H.; STERN, D.; BAGRAMYAN, K. *et al.* N-linked glycosylation of SV2 is required for binding and uptake of botulinum neurotoxin A. **Nature Structural & Molecular Biology**, [S. l.], v. 23, n. 7, p. 656–662, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nsmb.3245>. Acesso em: 11 maio 2025.

ZHANG, H.; HUA, Q.; XU, N. N.; ZHANG, X.; CHEN, B.; MA, X. *et al.* Evaluation of antibody kinetics and durability in healthy individuals vaccinated with inactivated COVID-19 vaccine (CoronaVac): A cross-sectional and cohort study in Zhejiang, China. **eLife**, v. 12, p. e84056, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.7554/eLife.84056>. Acesso em: 11 maio 2025.



## 9 ANEXOS

### 9.1 ANEXO A: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da relação entre a ausência de resposta clínica à aplicação da toxina botulínica para fins estéticos e a produção de anticorpos IgG e IgM anti toxina.

**Pesquisador:** Meire Soares de Ataíde

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 07981823.9.0000.5154

**Instituição Proponente:** Pro Reitoria de Pesquisa

**Patrocinador Principal:** Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 6.036.837

##### Apresentação do Projeto:

O projeto está sendo reapresentado com o objetivo de atender pendência(s) apontada(s) no parecer nº 6.022.776.

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_2098133.pdf, de 28/04/2023) e do Projeto Detalhado (Projeto\_modelo\_CEP\_UFTM.docx, de 28/04/2023).

Segundo os pesquisadores:

"INTRODUÇÃO: As neurotoxinas botulínicas (BoNT) são uma das toxinas mais potentes de longa duração para a humanidade e são produzidas pelas bactérias anaeróbicas e gram-positivas *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum*, e *Clostridium baratii*, as quais juntas produzem os sete sorotipos distintos de toxinas botulínicas (BTX-A, B, C, D, E, F e G). O sistema nervoso humano é susceptível a cinco sorotipos (BTX-A, B, E, F e G) e não é afetado por apenas dois (BTX-C e D)1-3,9-10. Em camundongos, a duração da ação é

**Objetivo da Pesquisa:** Avaliação da relação entre a ausência de resposta clínica a aplicação da toxina botulínica para fins estéticos e a produção de anticorpos IgG e IgM anti toxina.

**Pesquisador:** Meire Soares de Ataíde

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 67961923.9.0000.5154

**Instituição Proponente:** Pro Reitoria de Pesquisa

**Patrocinador Principal:** Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 6.036.837

#### Apresentação do Projeto:

O projeto está sendo reapresentado com o objetivo de atender pendência(s) apontada(s) no parecer nº 6.022.776.

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_2099133.pdf, de 28/04/2023) e do Projeto Detalhado (Projeto\_modelo\_CEP\_UFTM.docx, de 28/04/2023).

Segundo os pesquisadores:

"INTRODUÇÃO: As neurotoxinas botulínicas (BoNT) são uma das toxinas mais potentes de longa duração para a humanidade e são produzidas pelas bactérias anaeróbicas e gram-positivas *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum*, e *Clostridium baratii*, as quais juntas produzem os sete sorotipos distintos de toxinas botulínicas (BTX-A, B, C, D, E, F e G). O sistema nervoso humano é susceptível a cinco sorotipos (BTX-A, B, E, F e G) e não é afetado por apenas dois (BTX-C e D)1-3,9-10. Em camundongos, a duração da ação é mais longa em BTX-A e progressivamente mais curta em BTX-B, BTX-F e BTX-E. Em humanos, essa relação parece ser a mesma2-5. Dentro dos limites, a duração da ação pode ser modificada pela quantidade de BTX aplicada1-4. A atuação dessas neurotoxinas causa o botulismo humano, o qual possui 3 formas diferentes

<b>Endereço:</b> Av. Getúlio Guarã, nº 159, Casa das Comissões	
<b>Bairro:</b> Abadia	<b>CEP:</b> 38.025-440
<b>UF:</b> MG	<b>Município:</b> UBERABA
<b>Telefone:</b> (34)3700-6803	<b>E-mail:</b> cep@uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 6.036.837

(Pesquisadora Responsável), Orlando Oliveira Silva Júnior (médico residente de dermatologia do HC UFTM), Prof. Dr. Virmondos Rodrigues Junior (Pesquisador Assistente) e Ana Carolina Monteiro Camargo (médica residente do serviço de Dermatologia do HC UFTM).

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Termos de apresentação obrigatória adequados.

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 e Norma Operacional 001/2013, a Coordenação do CEP-UFTM manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O CEP-UFTM informa que de acordo com as orientações da CONEP, o pesquisador deve notificar na página da Plataforma Brasil, o início do projeto. A partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios parciais (semestrais), assim como também é obrigatória, a apresentação do relatório final, quando do término do estudo.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2089133.pdf	28/04/2023 11:41:35		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_modelo_CEP_UFTM.docx	28/04/2023 11:40:49	Orlando Oliveira Silva Júnior	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	28/04/2023 11:39:19	Orlando Oliveira Silva Júnior	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	27/04/2023 16:48:12	Orlando Oliveira Silva Júnior	Aceito
Declaração de concordância	concordanciaCEP.pdf	27/04/2023 09:02:39	ANANDA PATRICIA DA SILVA	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	troca_de_titularidade.pdf	26/04/2023 17:14:48	Orlando Oliveira Silva Júnior	Aceito



Continuação do Parecer: 6.036.837

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CEP_UFTM.docx	26/04/2023 12:24:26	Orlando Oliveira Silva Júnior	Aceito
Outros	anexos.pdf	13/03/2023 14:55:48	Orlando Oliveira Silva Júnior	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	Pesquisador.pdf	10/03/2023 15:38:05	Orlando Oliveira Silva Júnior	Aceito
Outros	anuencia.pdf	08/03/2023 12:49:28	Orlando Oliveira Silva Júnior	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	08/03/2023 11:46:10	Orlando Oliveira Silva Júnior	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

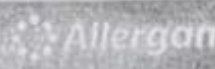
Não

UBERABA, 03 de Maio de 2023



Assinado por:

**Alessandra Cavalcanti de Albuquerque e Souza**  
(Coordenador(a))

## 9.2 ANEXO B: FICHA CLÍNICA COM PLANO DE APLICAÇÃO

**PLANO DE APLICAÇÃO** 

Paciente:  Idade:

**BOTOX**

Data de Aplicação:

U Frontal

U Corrugador

U Próceros

U Orbicular do olho

U Nasal

U Orbicular da boca

U Mental

U Outras: \_\_\_\_\_

U Total de unidades injetadas \_\_\_\_\_

Validade: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Número do Lote: \_\_\_\_\_

Volume de Diluição: \_\_\_\_\_

**JUVEDERM**

Data de Aplicação: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

REGIÃO TRATADA	PUNTO	VOLUME INJETADO

Etiquetas JUVEDERM: \_\_\_\_\_

Etiquetas JUVEDERM: \_\_\_\_\_

Etiquetas JUVEDERM: \_\_\_\_\_


Etiquetas JUVEDERM: \_\_\_\_\_

Observações: \_\_\_\_\_

**RETORNO PARA AVALIAÇÃO**

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Hora: \_\_\_:\_\_\_

**NOVA APLICAÇÃO** Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_



**CUIDADOS POS-APLICAÇÃO**

9.3 ANEXO C: ESCALA DE LEMPERLE *ET AL.*, 2001**AVALIAÇÃO CLÍNICA**

- A avaliação ocorrerá por áreas e será graduada de 0 a 5 conforme a escala de *Lempere et al.*
  0. Sem rugas
  1. Rugas finas, apenas perceptíveis
  2. Rugas pouco profundas
  3. Rugas moderadamente profundas
  4. Rugas profundas com bordas bem definidas
  5. Rugas muito profundas com bordas redundantes
- Abaixo encontram-se as imagens correspondentes a cada grau da classificação conforme cada região estudada.

**> REGIÃO FRONTAL:**

0



1



2



3



4



5



> REGIÃO GLABELAR:



0



1



4



5



> REGIÃO PERIORBITAL

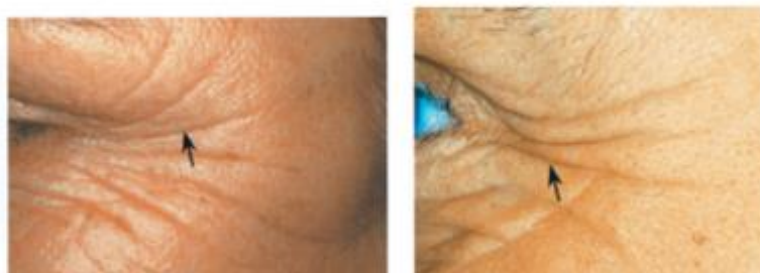


0



1



**REFERÊNCIA:**

1. GOTTFRIED LEMPERLE; HOLMES, R. E.; STEFAN, S. A Classification of Facial Wr Plastic and reconstructive surgery/PSEF CD journals, v. 108, n. 6, p. 1735–1750, 1 nov. 2001.