

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA  
DOUTORADO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA

LEONARDO OLIVEIRA FERREIRA

ORIENTADORA: DRA. DENISE CANTARELLI MACHADO

**INCOBOTULINUMTOXINA A DILUÍDA EM SOLUÇÃO DE GLUCONATO DE ZINCO PARA RUGAS  
FACIAIS: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

Porto Alegre

2017

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

**LEONARDO OLIVEIRA FERREIRA**

**INCOBOTULINUMTOXINA A DILUÍDA EM SOLUÇÃO DE GLUCONATO DE  
ZINCO PARA RUGAS FACIAIS: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Gerontologia Biomédica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Dra. Denise Cantarelli Machado

Porto Alegre  
2017

F383i Ferreira, Leonardo Oliveira.  
Incobotulinumtoxina a diluída em solução de gluconato de zinco para  
rugas faciais: ensaio clínico randomizado. / Leonardo Oliveira Ferreira –  
2016.  
93 f.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do  
Sul, 2016.  
Orientação: Dra. Denise Cantarelli Machado

1. Zinco. 2. Toxinas botulínicas tipo A. 3. Músculos faciais. 4. Eficácia.  
5. Efeitos Colaterais. 6. Reações adversas relacionadas a medicamentos.  
I. Machado, Denise Cantarelli, orient. II. Título.

CDU 616.5

LEONARDO OLIVEIRA FERREIRA

**INCOBOTULINUMTOXINA A DILUÍDA EM SOLUÇÃO DE GLUCONATO DE ZINCO PARA  
RUGAS FACIAIS: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

Tese apresentada como requisito para  
obtenção do Grau de Doutor pelo  
Programa de Pós-Graduação em  
Gerontologia Biomédica da Pontifícia  
Universidade Católica do Rio Grande do  
Sul.

Aprovada em \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA:

---

Profa. Dra. Mirna Wetters Portuguez - PUCRS

---

Prof. Dr. Daniel Marinowic - PUCRS

---

Profa. Dra. Sandra Lyon - FASEH

---

Prof. Dr. Rodolfo Herberto Schneider (Suplente)

## **AGRADECIMENTOS**

As promessas de Deus tem se cumprido em minha vida e eu dedico esta obra à Ele. Mesmo não merecedor, eu creio, que esse mesmo Deus, usou pessoas para me abençoar neste tempo de aprendizado e abnegação: à minha querida esposa Paula Dellacqua Ferreira, o meu amor, com a qual pude compartilhar todos os detalhes desta obra, aos meus amados pais Elson Ferreira e Maria Lúcia Ferreira, que sempre me encorajaram e oraram para que tudo desse certo, ao meu irmão Elson Júnior, uma fonte incansável pelo saber, que mesmo distante, soube contemplar este trabalho, à minha querida orientadora, Dra. Denise Machado Cantarelli, que acreditou neste projeto, à amigos queridos como a Professora Lucia Helena Sagrillo Pimassoni e Leonardo Silva Oliveira, grandes cooperadores deste trabalho, à Dra. Sandra Lyon, guardiã da dermatologia Brasileira e fonte de inspiração para centenas de médicos no Brasil e exterior, à colega Débora Damasceno que compreendeu minha necessidade de estudar, à todas as pacientes, alunos, familiares e demais amigos que compreenderam minha ausência e torceram pela conclusão desta etapa. Meu respeito e gratidão à todos vocês.

*“Porque na muita sabedoria há muito enfado; e o que aumenta em conhecimento, aumenta em dor.”*

Eclesiastes 1:13-18

## RESUMO

**Introdução:** A toxina botulínica é uma metaloprotease dependente de zinco e promove a clivagem do receptor responsável pela toxina botulínica tipo A com consequente paralisia na junção neuromuscular.

Além de bloquear a liberação de acetilcolina, inibe a liberação local de neuropeptídeos relacionados com a dor. Embora mais reconhecida na estética, é indicada no tratamento de diversos transtornos.

**Objetivo:** Avaliar a eficácia e duração do efeito da toxina botulínica tipo A (incobotulinumtoxina A) aplicada no músculo frontal de mulheres, sendo reconstituída em gluconato de zinco comparada a diluição em solução fisiológica.

**Métodos:** Trata-se de um estudo prospectivo e duplo-cego. O tamanho da amostra foi de 48 indivíduos do sexo feminino, acima de 50 anos de idade e dividida em dois grupos, sendo calculado com a utilização do programa G-Power para verificar a associação entre variáveis. Para tanto utilizou-se um efeito de 0,5, um poder do teste de 80% e um nível de confiança de 95%. A comparação entre os dois grupos foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. A escolha pelo teste não paramétrico ocorreu devido as variáveis não apresentarem distribuição normal (Kolmogorov-Smirnov  $p > 0,05$ ). Os diversos momentos foram comparados pelo teste Kruskal-Wallis.

No grupo controle, os frascos de incobotulinumtoxina A (100 U) foram diluídos em 2 mL de solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%. No grupo caso, diluiu-se com 2 mL de uma solução de gluconato de zinco 0,02%. O acompanhamento das participantes foi realizado por meio da escala validada Merz-Aesthetics de linhas frontais em repouso e em movimento e documentado por meio de fotografia digital, cujo os resultados foram analisados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon para comparar as linhas frontais antes e depois da aplicação. Para caracterizar os grupos, foram utilizados métodos da estatística descritiva como frequências e percentuais para variáveis categóricas e mediana, mínimo e máximo para as quantitativas.

A verificação da homogeneidade dos grupos em relação as variáveis clínicas foram realizadas pelo teste qui-quadrado e Manny-Whitney.

**Resultados:** Os resultados obtidos mostraram que não há relação entre raça, etilismo, tabagismo e uso de protetor solar com o efeito da toxina nos dois grupos. Para as variáveis idade e quantidade ingesta de zinco semanal o resultado do teste Manny-Whitney indicou que não existe diferença significativa nos grupos. No grupo controle, em 14 semanas da aplicação houve redução de 66% dos efeitos nos pacientes com as rugas do frontal em repouso e redução de 75% do efeito desejado em movimento. No grupo caso, após 14 semanas da aplicação, houve redução de 100% dos efeitos nos pacientes com as rugas do frontal em repouso e de 75% em movimento.

**Conclusão:** Os dados identificam que os hábitos de vida das pacientes não influenciam no resultado final do procedimento, e que a duração do efeito não está ligado à diluição do produto com substância diferente da diluição clássica com solução fisiológica. Contudo, o estudo demonstrou que os pacientes que ingerem bebida alcoólica que utilizaram a toxina botulínica diluída em gluconato de zinco 0,02% parecem ter uma melhor eficácia.

**Palavras-chave:** Zinco. Toxinas botulínicas tipo A. Músculos faciais. Eficácia. Efeitos Colaterais. Reações adversas relacionadas a medicamentos.

Registro de ensaio clínico: ISRCTN27486491

## ABSTRACT

**Introduction:** Botulinum toxin is a zinc-dependent metalloprotease and promotes cleavage of the receptor responsible for botulinum toxin type A with consequent paralysis at the neuromuscular junction.

In addition to blocking the release of acetylcholine, it inhibits the local release of pain-related neuropeptides. Although more recognized in aesthetics, it is indicated in the treatment of several disorders.

**Objective:** To evaluate the efficacy and duration of the effect of botulinum toxin type A (incobotulinumtoxin A) applied to the frontal muscle of women, being reconstituted in zinc gluconate compared to dilution in physiological solution.

**Methods:** This is a prospective, double-blind study. The sample size was 48 females, over 50 years of age and divided into two groups, being calculated using the G-Power program to verify the association between variables. For this purpose an effect of 0.5, a power of the test of 80% and a level of confidence of 95% were used. The comparison between the two groups was performed by the Mann-Whitney test. The non-parametric test was chosen because the variables had no normal distribution (Kolmogorov-Smirnov  $p > 0.05$ ). The various moments were compared by the Kruskal-Wallis test.

In the control group, Incobotulinumtoxin A flasks (100 U) were diluted in 2 mL of 0.9% sodium chloride physiological solution. In the case group, it was diluted with 2 mL of a 0.02% zinc gluconate solution. Participants were monitored using the Merz-Esthetics validated scale of resting and moving frontal lines and documented by means of digital photography, the results of which were analyzed by Wilcoxon's non-parametric test to compare the frontal lines before and after the application. To characterize the groups, descriptive statistics methods were used as frequencies and percentages for categorical variables and median, minimum and maximum for quantitative variables.

The chi-square and Mann-Whitney tests were used to verify the homogeneity of the groups in relation to the clinical variables.

**Results:** The results showed that there is no relationship between race, ethnicity, smoking and sunscreen use with the toxin effect in the two groups. For the variables age and amount weekly zinc intake the Mann-Whitney test result indicated that there was no significant difference in the groups. In the control group, at 14 weeks of application, there was a 66% reduction of the effects in patients with resting frontal wrinkles and a 75% reduction in the desired effect on movement. In the case group, after 14 weeks of application, there was a 100% reduction in effects in patients with resting frontal wrinkles and 75% in movement.

**Conclusion:** The data identify that patients' life habits do not influence the final outcome of the procedure and that the duration of the effect is not related to the dilution of the product with a substance other than the classic dilution with physiological solution. However, the study showed that patients who ingest alcoholic beverages using Botulinum toxin diluted in 0.02% zinc gluconate seem to have better efficacy.

**Keywords:** Zinc. Botulinum toxins type A. Facial muscles. Efficiency. Side effects. Adverse drug-related reactions.

Clinical Trial Registry: ISRCTN27486491



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação das características clínicas das pacientes entre os grupos.....	49
Tabela 2: Comparação das variáveis prognósticas antes e após a aplicação da toxina e comparação entre os grupos em cada momento. ....	50
Tabela 3: Grau de concordância entre as avaliações das pacientes e do médico.....	51
Tabela 4: Comparação da duração do efeito relaxante do músculo frontal entre os momentos e entre os grupos em cada momento .....	60
Tabela 5: Comparação da duração do efeito em relação a presença de etilismo.....	61
Tabela 6: Comparação da duração do efeito em relação a presença de tabagismo. ....	62
Tabela 7: Comparação da duração do efeito em relação ao uso de protetor solar.....	63
Tabela 8: Comparação da duração do efeito na raça. ....	64

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>21</b>
2.1 ASPECTOS CLÍNICOS DA TOXINA BOTULÍNICA .....	21
2.2 ESTRUTURA E MECANISMO DE AÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA .....	27
2.3 UTILIZAÇÃO DO ZINCO COMO AGENTE POTENCIALIZADOR DO EFEITO DE DURAÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA.....	37
<b>3 HIPÓTESES</b> .....	<b>42</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>43</b>
4.1 OBJETIVO GERAL.....	43
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
<b>5 MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
5.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	44
5.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA .....	44
5.2.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	45
5.2.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	46
5.3 MÉTODOS DE RECONSTITUIÇÃO DAS DIFERENTES APRESENTAÇÕES DE TOXINA BOTULÍNICA .....	46
5.4 ESTRATÉGIAS DE AVALIAÇÃO DAS PARTICIPANTES ANTES E APÓS O TRATAMENTO .....	47
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	48
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	<b>65</b>
<b>8 CONCLUSÕES</b> .....	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>71</b>
<b>ANEXO A – ACEITE E PUBLICAÇÃO DE ARTIGO (QUALIS B3)</b> .....	<b>75</b>
<b>ANEXO B – DECLARAÇÃO DE ARTIGO SUBMETIDO (QUALIS B1)</b> .....	<b>82</b>
<b>ANEXO C – QUESTIONÁRIO VALIDADO WHOQOL-BREF</b> .....	<b>83</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento da pele é um processo complexo, influenciado por fatores endógenos e exógenos. Os primeiros incluem o acúmulo de mutações nas células, o encurtamento dos telômeros, as alterações no metabolismo das células cutâneas, distúrbios hormonais relacionados à idade, etc. Estes últimos são representados pela radiação ultravioleta, radiação ionizante, poluentes e microrganismos. O número e a intensidade de fatores exógenos e endógenos determinam a predominância de um processo de envelhecimento, o qual inclui processos fisiológicos e patológicos. O processo fisiológico (ou cronológico) está relacionado a fatores endógenos. Seus sinais clínicos são o ressecamento da pele e flacidez, pequenos linhas e neoplasias benignas. O processo de envelhecimento patológico, por exemplo, o foto envelhecimento, é induzido por fatores exógenos e caracteriza-se por sulcos profundos, rugosidade, amarelamento da pele, pigmentação, baixa capacidade no reparo de feridas e predisposição a neoplasias tanto benignas quanto malignas.

Estudos de pele não exposta ao sol mostram que o envelhecimento cursa com atrofia da epiderme, que podendo torná-la 10 a 50% mais fina em um intervalo de 30 a 80 anos. A atrofia acomete principalmente a camada espinhosa. Após a idade de 30 anos, a densidade de melanócitos diminui de oito a 20% à cada década e os linfócitos tornam-se mais heterogêneos.

Estudos histológicos da epiderme indicam que a camada basal da pele experimenta mudanças profundas com o envelhecimento, cujos queratinócitos transformam-se marcadamente heterogêneos e o volume total de uma célula aumenta. Essas mudanças são chamadas de discrasia epidérmica e ocorrem na epiderme danificada pela radiação ultravioleta (UV). A discrasia epidérmica é

marcada por uma menor taxa de mitoses, ciclo celular mais longo e maior migração de queratinócitos da camada basal para a camada córnea. Na faixa etária entre 25 e 70 anos, a função imune da pele enfraquece, e o número de células dendríticas epidérmicas (células de Langerhans) diminui em 50%. Com o envelhecimento, o número total e a atividade dos linfócitos T e B na pele também diminuem. Em pessoas idosas, os processos de reparação na pele, como a remodelação do colágeno, a proliferação celular e o metabolismo dos fibroblastos, diminuem a velocidade.

Sob os efeitos da radiação UV (ultravioleta), a epiderme é dissolvida e as quantidades de proteína integrina B1 e mRNA nos queratinócitos da camada basal diminuem. A integrina B1 medeia a ligação dos queratinócitos da camada basal entre si e com a membrana basal.

A exposição permanente da pele à radiação UV também prejudica a junção dermoepidérmica. Nas camadas superiores da derme que está constantemente submetida à radiação UV, a expressão de fibrilina 1 e colágeno de tipo VII diminuem e este último é quem forma a fibrilas de ancoragem na junção dermoepidérmica. A senescência da pele induzida radiação UV é acompanhada do acúmulo de fibras elásticas nas camadas média e inferior da derme. Essas mudanças degenerativas são conhecidas como elastose solar. As fibras elásticas acumuladas com o foto envelhecimento podem substituir os componentes da matriz normal e alterar a composição do colágeno. A quantidade de colágeno de tipo I diminui com o envelhecimento. Experimentos in vitro e in vivo mostram que radiação UVA e UVB intensificam a degradação do colágeno por metaloproteinases e proteases da matriz. O sinal mais característico da senescência da pele induzida pela radiação é a super expressão da proteína p53. Verificou-se que a expressão das espécies ativas da p53

também aumenta com o envelhecimento fisiológico. Este fato está relacionado ao acúmulo de mutações nos queratinócitos e encurtamento dos telômeros. Assim, a p53 é essencial para a regulação da apoptose na pele e em outros tecidos. As aberrações na sua expressão, incluindo as induzidas pela radiação UV, podem causar a formação de células tumorais, determinados por cascatas moleculares envolvendo a p53. Essas cascatas são comuns em diferentes tipos de células, e sua consideração detalhada está além do escopo deste trabalho.

A ação da p53 no envelhecimento da pele é diversificada sendo capaz de influenciar alterações na espessura da derme, epiderme, na taxa de crescimento do cabelo e no processo de reparo de feridas. Além disso, afeta a função secretora das glândulas sebáceas da pele e diminuindo a quantidade de gordura subcutânea.

A ação da radiação de ondas longas (UVA) induz a intensa expressão de p53 na camada basal da epiderme, enquanto os comprimentos de onda mais curtos (UVB) fazem isso em células de todas as camadas de epiderme.

A detecção de Imunohistoquímica p53 pode ser aplicada para visualizar queratinócitos e aglomerados de clones epidérmicos de p53<sup>+</sup> espalhados na epiderme. Clusters de células p53<sup>+</sup> ocorrem na epiderme permanentemente fotodanificada e entre as células adjacentes aos queratinócitos de câncer de pele não melanoma. Verificou-se que 70% desses clones possuem espécies mutantes de p53.

Mutações que alteram a função de p53 são a causa de tumores malignos em 50% dos tipos de câncer. Apenas 5% dessas mutações ocorrem no domínio regulatório da p53 e 95% na região central que controla a ligação específica da p53 ao DNA. Em alguns tipos de câncer, como por exemplo tumor de cólon, as espécies

mutantes da p53 são observadas em estágios de malignidade avançada, enquanto que no câncer de pele, a p53 mutante aparece nos estágios de neoplasia precoce.

Como a p53 é multifuncional, a investigação de suas vias de sinalização e seu papel no envelhecimento da pele e na formação de tumores é um problema urgente na “gerontossomometria” moderna e na biologia molecular.

Por um lado, a baixa expressão de p53 reduz a apoptose nas células da pele e retarda o seu envelhecimento, em contrapartida, favorece o desenvolvimento de neoplasias cutâneas. A super expressão da p53 diminui o risco de câncer de pele, mas as células atingem rapidamente o limite de Hayflick e a senescência. Assim, o suporte do balanço fisiológico na expressão p53 é essencial para a gerontocosmetologia teórica e aplicada<sup>1</sup>.

Quadro 1: Implicações clínicas do envelhecimento da pele<sup>2</sup>.

<b>MUDANÇA FISIOLÓGICA</b>	<b>MUDANÇA PATOLÓGICA</b>	<b>SIGNIFICADO CLÍNICO</b>
Diluição da epiderme e derme	Maior vulnerabilidade ao trauma mecânico, especialmente cisalhamento e fricção	Maior incidência de linhas na pele
Aplainamento das papilas dérmicas	Maior risco de formação de bolhas	Aumento da suscetibilidade à infecção
Redução da velocidade na taxa de rotatividade da epiderme, diminuição da proporção de queratinócitos proliferativos para diferenciados	Retardo na migração e proliferação celular. Diminuição da contração da ferida	Aumento do tempo de repitelização, tempo de recuperação mais longo após lesão ou procedimento cirúrgico
Redução das fibras de elastina	Perda de elasticidade	Flacidez e rugas, com perda da autoestima e/ ou depressão
Diminuição da vascularização e apoio	Vasos sanguíneos frágeis e facilmente quebrados	Pele facilmente ferida (púrpura senil)
Estruturas na derme	Diminuição do crescimento capilar da ferida	Maior risco de deiscência da ferida
Diminuição do plexo vascular	Perda de capacidade termorreguladora	Hipotermia, calor, acidente vascular cerebral
Mudanças e perda de fibras de colágeno e elastina	Diminuição da resistência à tração, camadas inferiores mais suscetíveis a lesões Remodelação de colágeno atrasada	Risco aumentado de dano por pressão à pele do idoso, úlceras de decúbito, tempo de cura mais longo após lesão ou cirurgia
Resposta da imunidade imune	Resposta inflamatória prejudicada, reação de hipersensibilidade retardada	Cicatrização de feridas danificadas, risco aumentado de lesão grave causada por

	deteriorada, diminuição da produção de citocinas, diminuição do número de células de Langerhans	irritantes, função imunológica imune, aumento da suscetibilidade à fotocarcinogênese, testes de hipersensibilidade tardia falso negativo
Respostas neurológicas prejudicadas	Sensibilidade reduzida	Aumento do risco de danos térmicos ou acidentais
Diminuição da espessura da pele	Perda de amortecimento e suporte Diminuição da produção de precursores de vitamina D	Risco aumentado de dano de pressão, úlceras de decúbito Aumento da suscetibilidade à pele Lágrimas, hematomas, osteoporose e fraturas ósseas
Atrofia das glândulas sudoríparas	Diminuição da transpiração	Menor capacidade de termo regulação, hipotermia, pele seca, xerose
Lipídios reduzidos do estrato córneo	Diminuição da capacidade de reter água	Pele seca, xerose
Mudanças estruturais no estrato córneo	Função de barreira alterada	Resposta variável a medicamentos tópicos, alterada sensibilidade a irritantes
Redução do movimento da água da derme para a epiderme	Redução da hidratação epidérmica	Pele seca, xerose
Redução de melanócitos	Perda de capacidade de bronzear, maior susceptibilidade à radiação solar. Cabelos grisalhos	Neoplasmas cutâneos Perda de autoestima

Fonte: FARAGE et al. (2009)

A matriz extracelular do tecido conjuntivo desempenha um papel crítico no fornecimento das propriedades fisiológicas normais à pele e existem pelo menos quatro classes principais de macromoléculas da matriz extracelular que desempenham um papel na manutenção da homeostase cutânea. O componente mais abundante, as fibras de colágeno, representam 80% do peso seco total da derme e proporcionam propriedades de tração necessárias para permitir que a pele sirva como órgão protetor contra traumas externos.

Um componente menos abundante, consistindo de 2-4% da matriz extracelular na derme protegida do sol, é a rede de fibra elástica. A maior parte das fibras elásticas é constituída por elastina, uma proteína do tecido conjuntivo bem caracterizada, que é inicialmente sintetizada como polipeptídeo de 70 kDa, conhecido como tropoelastina. O núcleo de elastina é cercado por microfibrilas associadas à

elastina, que são uma família de proteínas. As microfibrilas foram postuladas como o primeiro componente a ser sintetizado durante a fibrilogênese de elastina durante o desenvolvimento ou o reparo, e essas microfibrilas formam uma sustentação na qual os polipeptídeos de elastina se alinham de modo a permitir o crescimento de uma fibra elástica funcional. Após a montagem da fibra, as moléculas individuais de elastina tornam-se reticuladas através da formação de reticulações covalentes altamente estáveis, conhecidas como desmosinas. Semelhante ao processamento de colágeno, a formação de desmosinas na elastina é iniciada pela lisil oxidase, uma enzima dependente de polímero.

A formação da reticulação na elastina envolve resíduos de lisina específicos caracteristicamente cercados por alaninas. Recentemente, desenvolveu-se um anticorpo específico que reconhece esta região de reticulação apenas em moléculas de elastina livres, não reticuladas, assim, a imunohistoquímica com este anticorpo permite a avaliação semiquantitativa da taxa de biossíntese de elastina.

O envelhecimento cutâneo está claramente associado à degeneração da matriz extracelular do tecido conjuntivo, particularmente as fibras colágenas e elásticas. Na pele jovem, há uma abundância de colágeno com resistência à tração, e a rede de fibra elástica está intacta, proporcionando elasticidade e recuo na pele jovem. Na pele envelhecida, há perda da reticulação do colágeno como resultado da degradação aumentada pelas colagenases. Ao mesmo tempo, a taxa de biossíntese de colágeno diminui com o avanço da idade, de modo que na pele de indivíduos idosos há pouquíssima capacidade biossintética para reparar a rede de colágeno, com perda concomitante da elasticidade e resiliência cutânea.

Uma série de estratégias foram propostas para prevenir ou reverter o envelhecimento cutâneo. Uma dessas abordagens implica a aplicação tópica de



compostos que restaurariam as fibras elásticas funcionais. Estudos recentes tem relatos os efeitos da aplicação tópica de um creme bimineral contendo malonato de zinco e cobre a 0,1%, na reconstrução de fibras elásticas e reparo da pele danificada, mensuradas pela síntese de moléculas de tropoelastina não reticuladas recém-sintetizadas por imunohistoquímica e por ensaio de desmosina como marcador de fibras elásticas reticuladas.

O complexo de malonato de zinco e cobre é formado a partir da neutralização do ácido malônico (que faz parte dos ácidos carboxílicos, encontrado em frutas como a maçã e a pêra). A função de quelação entre os constituintes de cobre e zinco, as proteínas e aminoácidos circundantes mostrou-se diminuir rugas em ensaios clínicos (ainda não publicados) sugerindo o reparo da rede de fibras elásticas e a regeneração das fibras perpendiculares que se estendem da derme papilar superior para a junção dermoepidérmica, cujas análises foram realizadas por meio de biópsias cutâneas e revelaram que a síntese de tropoelastinina é significativamente aumentada no lado da face tratada com o composto ativo, em comparação com o lado controle tratado com o veículo sozinho, quando aplicado duas vezes ao dia por seis semanas.

O aporte reforçado de fibras elásticas maduras foi confirmado por demonstração da concentração aumentada de desmosina, que é um composto de reticulação específico da elastina, podendo ser quantificado por meio de um radioimunoensaio altamente específico e sensível<sup>3</sup>.

O envelhecimento da pele provavelmente é causado por fatores intrínsecos (biológicos) e extrínsecos (ambientais). Clinicamente, as características da pele são muito afetadas pelo envelhecimento, com tendência a tornar-se áspera, flácida e enrugada. A principal característica histológica da pele fotodanificada é o acúmulo

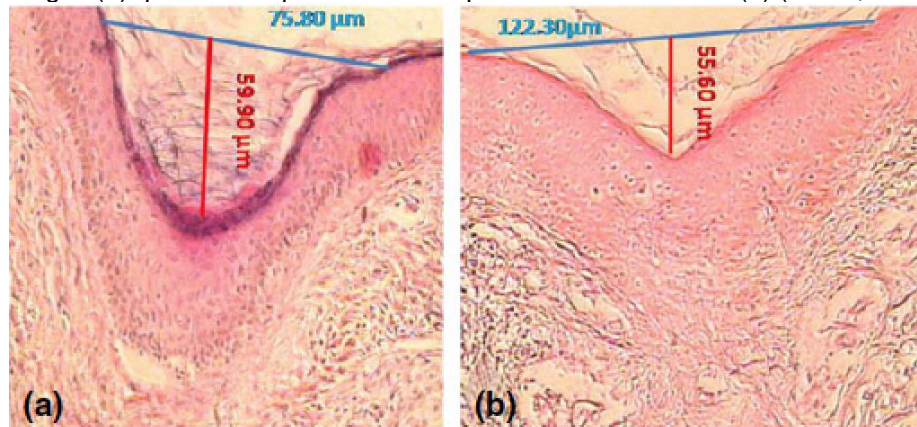
de material elastótico na derme e epiderme, um processo conhecido como elastose solar. Além disso, a pele fotoenvelhecida mostra uma rede de colágeno desorganizada com diminuição gradual em seu conteúdo, proveniente da degradação acelerada e/ou síntese diminuída. Essas mudanças contribuem para a flacidez e formação de rugas. Além do envelhecimento, existem fatores predisponentes secundários para rugas faciais, incluindo a alteração da gravidade, pressão de posição constante na pele (por exemplo, durante o sono) e movimentos faciais repetidos causados por contrações dos músculos miméticos da expressão facial. Cada tipo de ruga possui alterações microanatômicas características com resposta variável às modalidades de tratamento. Portanto, a toxina botulínica é uma modalidade de tratamento que pode ser útil. Apesar da expansão do uso mundial das aplicações de BoNTA para rugas faciais, ainda faltam publicações baseadas em evidências que discutam seu efeito no nível histológico.

Alterações histológicas e imunohistoquímicas das rugas, em resposta à aplicação de BoNTA, demonstraram causar paralisia flácida nos músculos, bloqueando a liberação de acetilcolina necessária para a contração muscular. Esta paralisia muscular melhora a aparência das rugas, principalmente pelo aumento da largura ao invés da diminuição da profundidade. A matriz dérmica é composta principalmente de colágeno [tipo I (80-85%) e tipo III (10-15%)], além de glicosaminoglicanos e fibras elásticas. Após 3 meses de injeção de BoNTA, os feixes de colágeno tornam-se mais compactos e organizados em torno da rugosidade, com aparência de fibras regulares e lisas. Entretanto, não há mudanças significativas nos níveis de colágeno I e III ou de elastina.

Estudos mostraram que a melhora clínica observada após a injeção de BoNTA foi refletida no nível histológico (Figura 1). A melhora da pele após as

aplicações não pode ser atribuída apenas à desnervação dos músculos faciais, mas também devido à remodelação dos tecidos sobrepostos. Além disso, esta observação histológica pode explicar a melhoria a longo prazo observada após injeções repetidas de BoNTA.

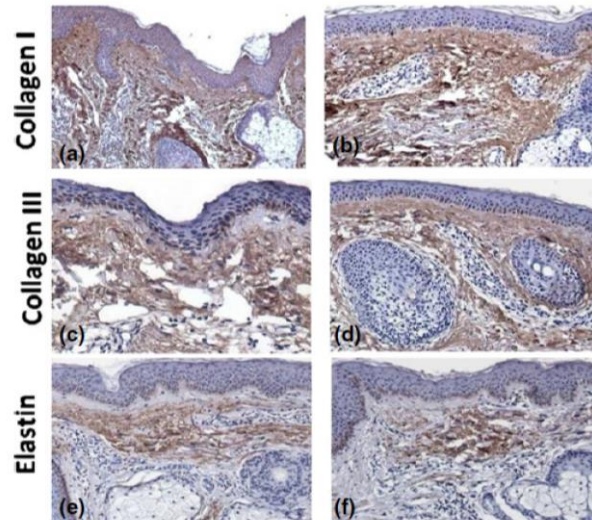
**Figura 1: Histometria de espécimes de biópsia cutânea antes e após 3 meses da aplicação de BTX-A.** mostrando aumento significativo na rugosidade Largura, em vez de diminuir a profundidade das rugas (b) quando comparado com biópsias de linha de base (a) (H & E; x 200).<sup>4</sup>



Fonte: El-Domyati et al. (2015)

Após a injeção de BoNTA para rugas, ocorre aumento da largura das rugas ao invés de diminuição da sua profundidade e aumento da espessura da camada celular granular, com melhor organização e orientação das fibras de colágeno (Figura 2). Essas mudanças podem ajudar a uma melhor compreensão dos diferentes mecanismos de ação da injeção de BoNTA para rugas faciais <sup>4</sup>.

**Figura 2: Colágeno dérmico e elastina antes e após 3 meses De BoNTA.** Coloração por imunoperoxidase de espécimes de biópsia cutânea para os tipos de colágeno I (a, b) e III (c, d) e elastina (e, f) mostrando nenhuma diferença significativa nos tipos de colágeno I e III e elastina Conteúdo entre as biópsias basais (a, c, e) e pós-tratadas (b, d, F), mas com melhor organização e fibras de colágeno mais compactas após a injeção BoNTA (b, d) (ampliação original; x 100).<sup>4</sup>



Fonte: El-Domyati et al. (2015)

Segundo estatísticas da *Sociedade Americana de Cirurgiões Plásticos* (*American Society of Plastic Surgeons - ASPS®*), em 2015 nos Estados Unidos, o procedimento não cirúrgico mais popular foram as aplicações de toxina botulínica tipo A, somando 6,7 milhões de procedimentos realizados, com aumento de 1% em relação ao ano de 2014. No ano de 2012 foram 3.257.913 aplicações de toxina botulínica, o que mostra um crescimento de mais de 100% em três anos<sup>5</sup>.

O envelhecimento da população brasileira também é um importante estimulador do desenvolvimento de novos procedimentos que ajudem a manter uma aparência jovem. Segundo o IBGE, a população idosa vai triplicar no País e passará de 19,6 milhões (10% da população brasileira), em 2010, para 66,5 milhões de pessoas, em 2050 (29,3%). As estimativas são de que a "virada" no perfil da população acontecerá em 2030, quando o número absoluto e o percentual de brasileiros com 60 anos ou mais de idade vão ultrapassar o de crianças de 0 a 14 anos<sup>6</sup>.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 ASPECTOS CLÍNICOS DA TOXINA BOTULÍNICA

A terapia com uso de BoNTA foi inventada pelo oftalmologista Alan B Scott de San Francisco, nos Estados Unidos. No início da década de 1970, ele estava selecionando substâncias capazes de paralisar os músculos oculares e extraoculares para corrigir o estrabismo em crianças. Inspirado pelo trabalho de Drachman (publicado entre 1964 e 1965), ele se interessou pela toxina botulínica. Apresentado por Drachman para Edward J. Schantz e Eric A. Johnson da Universidade de Wisconsin, surgiu uma colaboração que levou ao desenvolvimento de um tipo terapêutico de toxina botulínica. Após experimentos em animais, Scott começou a injetar em pacientes no final da década de 1970. O primeiro paciente injetado sofria de limitação na abdução ocular. O desvio do olho poderia ser corrigido de forma elegante por injeções de músculos oculares e extraoculares antagônicos, que produziram uma paresia iatrogênica que duraria até que a paralisia do nervo abducente se recuperasse. Mais tarde, crianças com estrabismo foram tratadas. Ele nomeou a sua preparação de toxina botulínica terapêutica Oculinum (do "alinhamento ocular"). Para dar continuidade aos estudos, Scott iniciou a Oculinum Company, que mais tarde vendeu para a Allergan, uma empresa especializada em cuidados oculares que renomeou produto com o nome Botox® (da "toxina botulínica"). Assistindo também a pacientes portadores de blefaroespasmos em sua prática oftalmológica, Scott começou a tratar pacientes com blefaroespasmos com uso de toxina botulínica no músculo orbicular dos olhos. A partir daí o neurologista de Nova York Stanley Fahn se interessou. Naquela época, Fahn e C David Marsden de Londres desenvolveram o conceito de distonia em que o

blefaroespasma e a distonia cervical foram as apresentações mais comuns. No grupo de Fahn, no Centro Médico presbiteriano de Colômbia, Mitchell F Brin, criou posteriormente seu próprio grupo de transtornos do movimento no Centro Médico Mount Sinai de Nova York e depois se juntou à Allergan. Andrew Blitzer foi pioneiro na terapia com toxina botulínica para a disфонia espasmódica e Christopher O'Brien iniciou um grupo de distúrbios do movimento em Denver antes de se juntar a Elan, fabricante do MyoBloc® / Neurobloc®, a primeira e única toxina botulínica tipo B. No Reino Unido, Marsden colaborou com o exército do Reino Unido em Porton Down, em Salisbury Plains. Lá, Peter Hambleton, Andy Pickett e Keith Foster desenvolveram a segunda fonte de terapia com toxina botulínica. Quando comercializada, recebeu o nome de Dysport (da “distonia e Porton Down”). Com as privatizações na era de Margaret Thatcher, os laboratórios do exército se tornaram, eventualmente, entidades comerciais sob vários nomes, como o Serviço de Laboratório de Saúde Pública (PHLS) e Speywood. Eventualmente, eles foram adquiridos pela Beaufor Ipsen da França. Mais tarde, a Foster iniciou sua própria empresa chamada Syntaxin, que posteriormente foi comprada pela Ipsen e agora atua como Ipsen Bioinnovations e Pickett para a Galderma da Suécia, onde naquele País está apoiando a Azzalure®, a marca estética da Dysport®.

Uma descoberta serendipitana do oftalmologista Jean Carruthers no final dos anos 1980 reconheceu as rugas faciais reduzidas em pacientes com blefaroespasma benigno essencial que foram tratados com toxina botulínica injetável. Isso foi relatado pela primeira vez na reunião anual da Sociedade Americana de Cirurgia Dermatológica em 1991. Inicialmente, foi noticiada como duvidosa, sendo assim, foi acompanhada de perto por dois ensaios clínicos que confirmaram sua segurança e eficácia. Em 2002, recebeu a aprovação nos Estados

Unidos pelo Food and Drug Administration (FDA) para "melhoria temporária na aparência de linhas glaberales moderada a grave, associadas à atividade do músculo corrugador e/ou procerus.

Posteriormente, houve uma rápida aceitação e uma investigação difundida sobre usos cosméticos e terapêuticos adicionais para esta toxina anteriormente "mortal" que acabou revolucionando a medicina<sup>7</sup>.

O oftalmologista Jean Carruthers, no final dos anos 1980, reconheceu as rugas faciais reduzidas em pacientes com blefaroespasma benigno essencial que foram tratados com toxina botulínica injetável. Isso foi relatado pela primeira vez na reunião anual da Sociedade Americana de Cirurgia Dermatológica em 1991. Inicialmente, foi noticiada como duvidosa, sendo assim, foi acompanhada de perto por dois ensaios clínicos que confirmaram sua segurança e eficácia. Em 2002, recebeu a aprovação nos Estados Unidos pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para "melhoria temporária na aparência de linhas glaberales moderada a grave, associadas à atividade do músculo corrugador e/ou procerus.

Posteriormente, houve uma rápida aceitação e uma investigação difundida sobre usos cosméticos e terapêuticos adicionais para esta toxina anteriormente "mortal" que acabou revolucionando a medicina<sup>8</sup>.

O uso de toxina botulínica como agente terapêutico foi iniciado por um oftalmologista há cerca de 30 anos para uso em estrabismo e blefaroespasma. Nas décadas seguintes, a toxina botulínica tornou-se o padrão de cuidados para uma série de transtornos do movimento e distúrbios do sistema nervoso autônomo que podem ser tratados com esta opção, e a região da cabeça e pescoço é um foco interdisciplinar neste campo<sup>9</sup>.

Embora não haja diferenças claras na eficácia entre as várias formulações, sua comparabilidade é intensamente debatida.

Os custos do tratamento de pacientes com lesões do neurônio motor superior e espasticidade são cerca de quatro vezes maiores do que aqueles sem espasticidade ou distonia. Este montante inclui os gastos do tratamento convencional, incluindo hospitalização, terapia de reabilitação e farmacoterapia.

O uso de BoNTA é considerado um tratamento farmacêutico antiespástico eficaz e potencialmente rentável como complemento do tratamento convencional<sup>10</sup>.

A injeção intramuscular de toxina botulínica tipo A bloqueia a transmissão neuromuscular e o efeito de bloqueio seletivo desaparece após 3-4 meses. Portanto, são necessárias aplicações repetidas para manter o efeito desejado, embora possam desencadear uma resposta imune e evocar resistência à toxina. É importante encontrar uma maneira de prolongar o efeito terapêutico da toxina botulínica tipo A.

A perda de inervação induz a brotamentos de terminais nervosos motores. Os novos brotos são as únicas estruturas sinápticas submetidas à exo-endocitose no início da recuperação de contrações musculares induzidas pelo nervo, o que também pode contribuir para a recuperação da placa motora original final, acelerando a reciclagem das vesículas sinápticas. Os brotamentos nervosos após a injeção de toxina botulínica são acompanhados pela expressão de algumas alterações de proteínas que são importantes para a regeneração do nervo periférico, incluindo a molécula de adesão celular neuronal (NCAM) e a quinase específica do músculo (MUSK). A NCAM está envolvida na regulação da adesão celular e no crescimento neurítico, bem como na regulação da plasticidade sináptica. Embora quase ausente nos tecidos adultos, o NCAM pode ser induzido pela desnervação



dos músculos através da injeção local de toxina botulínica, a fim de atuar no sarcolema na regulação da sinaptogênese. Além disso, NCAM desempenhou um papel importante no crescimento de brotos axonais induzidos por paralisia e o efeito foi reduzido pelo anticorpo policlonal NCAM (P-NCAM-Ab). Ainda não está claro se P-NCAM-Ab pode influenciar a contratilidade muscular e a duração da paralisia após a injeção de toxina botulínica<sup>11</sup>.

O enorme potencial terapêutico deste medicamento contribuiu para uma ampla série de aplicações, especialmente em doenças dermatológicas. Um grande número dessas indicações ainda não possui protocolos compartilhados aprovados para diluição, doses e tempo de acompanhamento e retratamento.

Vários estudos off-label com o uso de BoNTA tem sido realizado. A aplicação no tratamento de quelóides e cicatrizes hipertróficas têm sido realizados com intenção de induzir paralisia temporária do músculo subjacente a uma cicatriz durante uma cirurgia de revisão e minimizar a tensão nas bordas. Outras utilizações descritas incluem pênfigo familiar benigno, genodermatoses (epidermólise bolhosa simplex, doença de darier, pachyonychia congenita), hidradenite supurativa, alopecia areata e androgenética, psoríase, nostalgia parestésica, eritema facial, oleosidade da pele, fenômeno de raynaud, eczema disidrótico, cromidrose e bromidrose, neuralgia pós herpética<sup>12</sup>.

A toxina botulínica tipo A (BoNTA) inibe a liberação local de neuropeptídeos relacionados com a dor nos terminais colinérgicos e terminações livres, reduz a ativação central relacionada com a dor crônica e inibe a inflamação neurogênica pela atenuação da liberação dos neurotransmissores (Glutamato, Substância P e Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina-PRGC). Por esses mecanismos, tem sido utilizada para o tratamento de diversos transtornos relacionados à dor<sup>13</sup> como:

síndrome dolorosa miofascial, cefaléia tensional, cefaléia cervicogênica, dor lombar crônica, enxaqueca crônica, distúrbios da articulação temporomandibular, dor neuropática e fascíte plantar<sup>14, 15</sup>.

São diversas as situações onde é possível a utilização da toxina botulínica tipo A, como espasticidade secundária à várias condições como traumatismo craniano acidente vascular encefálico, paralisia cerebral, esclerose múltipla e lesão da medula espinal<sup>14</sup>. Outra importante condição refere-se aos transtornos de hiperatividade do músculo liso, que inclui dissinergia detrusor-esfincteriana, hipertrofia prostática benigna, acálasia, doença de hirschsprung, bexiga neurogênica, esfíncter de oddi, hemorróidas, fenômeno de raynaud e fissuras anais crônicas. Já as desordens de saliva, transpiração e alergia pode-se utilizar em casos de alergia nasal e rinite alérgica, hiperidrose axilar e palmar e Síndrome de Frey. Estrabismo foi a primeira indicação em bula acompanhado de distonias focais, com uma lista que inclui blefaroespasm, distonia cervical, distonia laríngea, distonia dos membros, distonia oromandibulares, distonia orolingual e distonia troncular. Em doenças não-distônicas de atividade muscular involuntária também é possível utilizar este poderoso medicamento como em casos de tremor, tiques, mioclonia, zumbido, trismo, bruxismo noturno e espasmo hemifacial<sup>14</sup>. Há mais a aprender sobre o mecanismo de ação da Toxina Botulínica e novas perspectivas podem levar à outras formas de maximizar os efeitos clínicos<sup>16</sup>.

Considerando todas as indicações citadas, alternativas para aumentar a duração do efeito da toxina botulínica tanto para fins estéticos quanto terapêuticos poderão ser úteis nos participantes que recebem aplicações trimestrais ou semestrais e com isso minimizar custos, dor e possível formação de anticorpos,

proporcionando possivelmente um impacto positivo na qualidade de vida e nas atividades diárias (laborativas, sociais, familiares e de lazer) desses participantes.

## 2.2 ESTRUTURA E MECANISMO DE AÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA

A aplicação de neurotoxina botulínica é um tratamento valioso para muitas indicações terapêuticas e revolucionaram o tratamento da espasticidade e da distonia. A toxina botulínica é produzida por fermentação anaeróbica da bactéria *Clostridium botulinum*. Foram identificadas várias cepas de *C. botulinum* diferentes com oito sorotipos imunologicamente distintos (tipo A-H) e consistem na neurotoxina botulínica complexadas com uma série de proteínas associadas.

Na natureza, a toxina botulínica tipo A é sintetizada como complexo de proteínas macromoleculares. Estes complexos de proteínas são referidos como toxinas progenitoras e consistem em proteínas acessórias não tóxicas (NAPs) ligadas à neurotoxina ativa de 150 kD. As toxinas progenitoras da toxina botulínica tipo A variam em peso molecular (300-900 kD), dependendo da composição dos NAPs (proteínas acessórias não tóxicas) e do processo de fabricação. A neurotoxina de 150 kD deve se dissociar das NAPs (proteínas acessórias não tóxicas) para exercer seus efeitos farmacológicos. A dissociação ocorre em condições de pH fisiológicos.

Embora não haja diferenças claras na eficácia entre as várias formulações, sua comparabilidade é intensamente debatida<sup>10</sup>.

O tipo A é o mais potente, juntamente com os sorotipos B e F. Os tipos A, B e E são causadores conhecidos de intoxicação alimentar, e os tipos C e D não parecem afetar o sistema nervoso humano. O tipo F está implicado na intoxicação alimentar com menos frequência e o tipo G não foi associado ao botulismo humano.

As neurotoxinas botulínicas são polipeptídios de 150 kDa que consistem em uma cadeia pesada de 100 kDa ligada a uma cadeia leve de 50 kDa, através de ligações dissulfeto sensíveis ao calor e forças não covalentes. Diferentes sorotipos de toxina são distinguidos por variações em suas cadeias leves. As toxinas podem ser complexadas com hemaglutinina (molécula não tóxica) e então dimerizadas para formar um composto maior: sendo de 900 kDa para toxina onabotulínica e 500 kDa para toxina abobotulínica. Já a Toxina Incobotulínica é livre de proteínas complexantes, pesando 150 kDa<sup>8</sup>.

A toxina botulínica tipo A resulta no botulismo mais grave e duradouro, que pode persistir por vários meses até mais de um ano. Devido a sua longa duração de ação e alta potência, o sorotipo A da toxina botulínica é também o mais utilizado para fins médicos. Graças aos avanços dos métodos genéticos e moleculares nas últimas duas décadas, a existência de muitas outras variantes da Toxina Botulínica tem sido demonstrada nos últimos anos<sup>17</sup>.

Existem quatro formulações comercialmente disponíveis de toxina botulínica: onabotulinumtoxina A, incobotulinumtoxina A, abobotulinumtoxina B e rimabotulinumtoxina B, destas, apenas a última não está disponível no Brasil. Cada formulação tem propriedades únicas, e os neuromoduladores não são intercambiáveis.

Além das citadas acima, existem mais outras duas apresentações, até o momento não liberadas no Brasil, que são a lanbotulinumtoxina (A/Lan) produzida pelo Instituto de Produtos Biológicos da China e a Chinbotulinumtoxina (A/Chin), que é um toxina botulínica recém-produzida sem proteína complexante.

Essas toxinas botulínicas são produzidas por diferentes métodos com características únicas, resultando em vários efeitos, pontos fortes e, possivelmente,

duração. Além disso, a discrepância de equivalência após a aplicação das toxinas também pode existir entre essas diferentes apresentações<sup>18</sup>.

A Onabotulinum recebeu indicações formais aprovadas nos Estados Unidos na década de 1990 e foi comprada pela Allergan em 1991, que cunhou o nome comumente usado, o Botox. A onabotulinumtoxina A é uma forma estéril e liofilizada de toxina botulínica tipo A produzida a partir das cepas de bactérias *Clostridium botulinum* e cultivadas em um meio particular contendo NZ amina e extrato de levedura. A liofilização ou liofilização, é o processo de congelação inicial de uma substância e, em seguida, baixa a pressão circundante para que a água congelada/sólida sublima para uma fase gasosa. O isolamento ocorre por uma série de preparações ácidas, formando um complexo cristalino, que consiste em toxina ativa e proteínas hemaglutininas. Esta preparação é então redissolvida em solução salina e albumina, esterilizada e seca à vácuo. O frasco de 100 unidades contém 0,5 mg de albumina humana e 0,9 mg de cloreto de sódio em uma forma estéril e sem vácuo, livre de conservantes. Inicialmente, os frascos foram armazenados no congelador antes da reconstituição devido às preocupações da labilidade ao calor da toxina. Contudo, as evidências sugerem que os frascos podem ser armazenados com segurança em temperaturas refrigeradas por 36 meses antes do uso. No entanto, após a reconstituição, recomenda-se que o produto seja armazenado na geladeira entre 2°C e 8°C.

A Abobotulinumtoxina A, mais comumente conhecida como Dysport (Galderma Laboratories, Fort Worth, TX) foi o segundo neuromodulador aprovado pelo FDA em 2009. A Abobotulinumtoxina A é fornecida em frascos de 300 ou 500 unidades e usa uma purificação baseada em coluna. O complexo purificado é dissolvido em uma solução de lactose contendo também albumina humana e

posteriormente esterilizado e liofilizado, com cada frasco contendo 0,125 mg de albumina de soro humano com 2,5 mg de lactose. A abobotulinumtoxina A é diferente da onabotulinumtoxina A em termos de unidades, propriedades químicas, atividade biológica e peso. Portanto, as duas formulações não são intercambiáveis e as recomendações de dosagem não podem ser baseadas em uma única razão de conversão.

Além disso, cada neuromodulador possui uma curva de resposta a dose não paralela, o que significa que seu desempenho é relativo. Uma determinada unidade de uma toxina não se compara em relação a unidade constante com outra toxina. Foi originalmente postulado que cada unidade de onabotulinumtoxina A é equivalente a aproximadamente 3 a 5 unidades de abobotulinumtoxina A. Evidências mais recentes sugerem que uma relação mais próxima de 2,5:1 (abobotulinumtoxina:onabotulinumtoxina)

Rimabotulinumtoxin B (Myobloc; Solstice Neurosciences Inc, Louisville, KY) é a única neurotoxina tipo B atualmente disponível nos Estados Unidos, com aprovação e uso clínico da FDA quase que exclusivamente no contexto de doença neuromuscular, incluindo distonia cervical. Foi utilizada com sucesso fora do rótulo “off label” para o tratamento de rugas dinâmicas. Ao contrário das apresentações do tipo A, esta preparação é uma formulação líquida não liofilizada e estável. Verificou-se que a Rimabotulinumtoxina B teve um início mais rápido, porém uma duração mais curta de ação (aproximadamente 2 meses) em comparação com os 3 ou 4 meses com toxinas de tipo A, e está associada a mais desconforto na aplicação, limitando seu uso cosmético.

Tanto as dosagens de 1:70 e 1:100 unidades (onabotulinumtoxina A: rimabotulinumtoxina B) produziram resultados efetivos no tratamento de linhas

frontais sem diferença significativa. Não existe reatividade cruzada com o tipo A e pode efetivamente ser usada em pacientes que recebem grandes doses de toxina e não respondem ou desenvolveram anticorpos neutralizantes de toxinas de tipo A.

As diferentes formulações de toxinas botulínicas são mais parecidas que distintas. No entanto, elas não são bioidênticas e, portanto, é imperativo que o profissional entenda bem as propriedades e o desempenho clínico de cada produto, a fim de alcançar um uso efetivo e seguro.

A Incobotulinumtoxina A é a única que mantém sua estabilidade no armazenamento à temperatura ambiente e pode ser armazenada à essa condição por 36 meses antes da reconstituição. A purificação da toxina incobotulínica envolve a separação da neurotoxina das proteínas complexantes, produzindo um produto final de 150 kDa, liofilizado e contendo apenas o ingrediente ativo, 1 mg de albumina humana e 4,7 mg de sacarose.

É, portanto, teoricamente menos imunogênico. Tradicionalmente, a reconstituição de todas elas é feita com solução salina bacteriostática, que reduz o desconforto durante a aplicação<sup>8</sup>.

As formas ativas da BoNTA atuam no sistema nervoso periférico para inibir a liberação de acetilcolina da junção neuromuscular. O local de ação mais comum é o terminal pré-sináptico. No entanto, a ligação aos gânglios colinérgicos autonômicos com efeitos resultantes foi relatada em doses muito grandes. Uma vez injetada, ela se liga irreversivelmente a um receptor no terminal pré-sináptico da junção neuromuscular, denominado sinaptotagmin. Através da endocitose mediada pelo receptor, ocorre a internalização do complexo toxina-receptor, e a ligação dissulfeto que liga as cadeias pesada e leve é clivada. A cadeia leve então transloca-se ao citoplasma, se funde com uma isoforma de proteína específica de toxina, um

receptor de proteína sensível ao n-etilmaleimide (NSF) – SNARE - e cliva a isoforma de proteína utilizando uma endopeptidase dependente de zinco.

O complexo de fusão sináptica é composto por três principais proteínas SNARE: sinaptobrevina, syntaxina e SNAP-25. As toxinas botulínicas de tipo A, mais comumente usadas, eliminam a proteína associada à SNAP-25, enquanto que as toxinas do tipo B catalisam a degradação da sinaptobrevina.

Isso interrompe o encaixe, a fusão e a liberação de vesículas de acetilcolina na junção neuromuscular, inibindo assim a formação da contração muscular.

Também foi sugerido que a atividade da acetilcolinesterase é alterada com a toxina botulínica. Embora tipicamente confinado à junção neuromuscular, padrões de coloração nos músculos tratados demonstraram atividade da acetilcolinesterase na maioria dos casos de Sarcolema (nome que se dá à membrana plasmática das células do tecido muscular estriado)<sup>8</sup>.

A Toxina Botulínica Tipo A (BoNTA) é a mais efetiva entre as oito neurotoxinas produzidas por *Clostridium botulinum*. BoNTA causa relaxamento muscular e este conceito hoje em dia é amplamente utilizado no tratamento cosmético das rugas. Em 2005 e 2008, alguns pesquisadores descobriram um efeito face-lifting de uma injeção intradérmica de BoNTA para o terço médio e inferior da face. Para descobrir se a BoNTA poderia afetar diretamente os fibroblastos dérmicos humanos, em 2012, pesquisadores estudaram os efeitos in vitro da BoNTA em fibroblastos dérmicos humanos normais e descobriram que a BoNTA tem um efeito notável no aumento do nível de produção de colágeno e na redução da sua degradação. O colágeno é o elemento básico mais abundante dos componentes fibrosos na derme e é responsável por manter a integridade estrutural da pele unindo as células e a matriz extracelular (ECM). Estes estudos não só mostraram os



efeitos positivos do BoNTA em fibroblastos dérmicos humanos para remodelação da pele, mas também implicaram a importância dos mesmos. Em 2016, foi comprovado que a aplicação de BoNTA tópica poderia otimizar o efeito do rejuvenescedor do laser de CO<sub>2</sub> fracionado, indicando ainda que a BoNTA pode restaurar a textura da pele através da melhoria da atividade de fibroblastos dérmicos humanos. Mas até agora, os mecanismos moleculares através dos quais a BoNTA pode afetar HDFs ainda (lncRNA) são um grupo de RNA que são transcritos, mas não codificam cadeias polipeptídicas, que possuem mais de 200 nucleotídeos. Em comparação com os genes de modificação de proteínas, os cRNA (RNA complementar) têm potencial de codificação limitado e apresenta pouca conservação evolutiva em sua sequência. Além disso, alguns pesquisadores detectaram que a expressão dos lncRNAs é específica de cada tecido e em níveis aparentemente mais baixos. Os lncRNAs parecem desempenhar algumas funções, como a regulação da expressão gênica à níveis epigenéticos, transcricionais e pós-transcricionais, participando de algumas funções biológicas, como a impressão genômica (imprinting), modificação cromossômica, transporte intranuclear, ativação transcricional e interferência. Portanto, a compreensão dos processos celulares em condições fisiológicas não poderá ser completa sem analisar as contribuições dos lncRNAs. Até agora, não há informações disponíveis sobre o efeito da BoNTA sobre a expressão das lncRNAs em fibroblastos dérmicos humanos.

Embora a função precisa dos lncRNAs alterados em fibroblastos dérmicos humanos tratados com BoNTA ainda não esteja clara, os RNAs não-codificantes (ncRNA) foram considerados como reguladores vitais da expressão gênica e possuem várias biofunções. Há um grande número de evidências que demonstram que os lncRNAs podem regular a expressão gênica por meio de interações RNA-

proteína, RNA-RNA, DNA-RNA e proteína-DNA. Embora não tenha sido encontrada relação direta entre a alteração da expressão de RNAs mensageiros, alguns autores estão convencidos de que as alterações nos lncRNAs (RP11-517C16.2-001, FR271872, LOC283352, RP11-401E9.3, FGFR3P e XXbac-BPG16N22.5) em fibroblastos dérmicos humanos são em resposta a toxina botulínica e estão relacionados às mudanças de RNA de codificação de proteínas.

O aumento do gene FOS induzido pela BoNTA mostrou a regulação da proliferação, que também está envolvida no processo de senescência celular dos fibroblastos dérmicos humanos. A expressão de BIRC5 foi relacionada na participação da modulação de diversos processos celulares, como proliferação, adesão, apoptose, migração e invasão durante o crescimento, desenvolvimento, reparo, manutenção e regressão de uma ampla variedade de tecidos mesenquimais. A baixa regulação do BIRC5 induzida pela toxina botulínica indica uma diminuição da apoptose em fibroblastos dérmicos humanos. O PLAC8 (Placenta Specific 8 - é um gene de codificação de proteínas) e demonstrou regular o ciclo celular e participar da regulação da apoptose e da divisão celular.

Foi relatado que a BoNTA pode regular o processo de replicação do ciclo celular e do DNA por outros pesquisadores. Alguns autores descobriram que BoNTA regula a expressão de genes relacionados ao ciclo celular, tais como RhoA, Rac1 e Cdc42 de uma maneira dependente da dose.

A BoNTA pode regular a proliferação celular e a síntese de colágeno. Os mecanismos podem desempenhar papéis importantes nos efeitos do rejuvenescimento da pele tratada com toxina botulínica.

O tratamento com BoNTA regula dinamicamente a expressão de COL19A1 (colágeno tipo 19 de cadeia alfa-1) e FGFR3P nos fibroblastos dérmicos humanos.

Mais estudos são necessários para descobrir os mecanismos por trás das mudanças dinâmicas que a BoNTA induz o COL19A1 e FGFR3P<sup>19</sup>.

A absorção da toxina botulínica também é dependente da temperatura. A temperatura do músculo é geralmente controlada homeostaticamente. Às vezes, o resfriamento da pele é usado para reduzir a dor superficial da injeção. Na medida em que isso reduza a temperatura muscular, ele deve reduzir a absorção e reduzir o efeito da injeção<sup>16</sup>.

O uso da BoNTA vai muito além dos tratamentos cosméticos, pois ela também funciona como analgésico. Os mecanismos subjacentes aos efeitos analgésicos de BoNTA ainda não são completamente compreendidos. No entanto, muitos estudos pré-clínicos mostraram que tais efeitos podem ser atribuídos não apenas ao relaxamento muscular, mas também à inibição da liberação de neurotransmissores das fibras aferentes sensoriais primárias. A BoNTA pode influenciar a micróglia e os monócitos. Portanto, o envolvimento dessas células não neuronais no efeito analgésico da BoNTA também deve ser considerado como um aspecto importante do seu mecanismo de ação. Além disso, a injeção de BoNTA aumentam simultaneamente os níveis das interleucinas antinociceptivas IL-1RA e IL-10 no DRG (Downregulation of voltage-gate) de camundongos expostos à lesão pela constrição crônica (CCI - Chronic constriction injury) em comparação com a injeção do veículo.

Curiosamente, a administração de minociclina impediu a regulação positiva de fatores pró-nociceptivos na medula espinhal (IL-1 $\beta$ ) e / ou DRG (IL-18) e aumentou os níveis anti-nociceptivos da interleucina IL-10 na medula espinhal. Maiores efeitos analgésicos foram obtidos após co-administração de minociclina e BoNTA.

Os efeitos analgésicos da BoNTA estão relacionados à ativação microglial; Como consequência, a BoNTA influencia os níveis de citocinas importantes para a transmissão de sinais nociceptivos.

A administração de BoNTA não só alivia os comportamentos neuropáticos relacionados à dor, mas também restaura o equilíbrio neuroimune. A BoNTA reduz os níveis de IL-1 $\beta$  e IL-18 na medula espinhal e / ou DRG, que são regulados após lesão e, em paralelo, o BoNTA aumenta os níveis das citocinas antinociceptivas IL-10 e IL-1RA. Esta evidência sugere que a BoNTA, além de alterar a função neuronal, pode influenciar células não neuronais, particularmente a microglia<sup>20</sup>.

Quando administrado em doses baixas, a toxina botulínica tipo A é um tratamento vital usado para tratar uma variedade de condições caracterizadas por espasmos musculares incontroláveis, como blefaroespasma (fechamento do espasmodismo) e disfonia (espasmos da dobra vocal). Por outro lado, toxina botulínica tipo A é considerada uma ameaça bioterrorista importante pela sua alta potência e relativa facilidade de produção em massa e armação. A toxina é produzida naturalmente durante a esporulação pelo *Clostridium botulinum*, uma bactéria anaeróbia e Gram-positiva. Se cultivado em quantidades suficientes, *C. botulinum* pode ser disseminado em suprimentos de alimentos ou adsorvido em partículas finas por aerossolização. Um ataque bioterrorista real de toxina botulínica tipo A na população humana resultaria em paralisia flácida aguda, generalizada e paralisia bulbar (resultando em dificuldade em falar, engolir e mastigar). Embora nenhum ataque de bioterrorista que envolvesse a toxina botulínica tipo A tenha sido executado com sucesso, muitos países como o Irã, o Iraque, a Coreia do Norte e a Síria desenvolveram e/ou armazenaram armas contendo toxina botulínica.

Infelizmente, nenhum composto conhecido possui uma eficácia in vivo digna de nota na melhoria da toxicidade induzida pela toxina botulínica tipo A; Portanto, a descoberta de novos inibidores da cadeia leve da toxina botulínica continua sendo um esforço de pesquisa importante<sup>21</sup>.

A dose letal para uma pessoa, se ingerida pela via oral é estimada em 30 ng, pela via inalatória de 800 a 900 ng, e pela via intravenosa 90 a 150 ng.

As quantidades de toxina botulínica tipo A por frasco de 100 unidades nas apresentações de toxina onabotulínica, incobotulínica e abobotulínica são em média 0,73 ng, 0,44 ng e 0,65 ng.

Para ter uma idéia, 0,09 µg via endovenosa de toxina botulínica equivaleria à cerca de 204 frascos de Incobotulium toxina tipo A aplicadas diretamente via intravenosa<sup>22</sup>.

Quadro 2: Apresentações da toxina botulínica disponíveis no Brasil<sup>10</sup>.

Apresentação	Conteúdo de proteína de 150 kd (ng)	Conteúdo total de proteína (150 kd e nap) (ng)	Unidades equivalentes de dose
Onabotulinumtoxina A	0.73	5.00	1
Incobotulinumtoxina A	0.44	0.44	1
Abobotulinumtoxina A	0.65	0.87	2-3

Fonte: Adaptado de Scaglione (2016).

### 2.3 UTILIZAÇÃO DO ZINCO COMO AGENTE POTENCIALIZADOR DO EFEITO DE DURAÇÃO DA TOXINA BOTULÍNICA

A toxina botulínica tipo A inibe a liberação de acetilcolina nas sinapses e atua como um neurotransmissor para a inervação dos músculos. É uma endoprotease dependente do zinco que age sobre as células vulneráveis para separar os polipeptídeos, que são essenciais para a exocitose. Quando o cátion Zinco (Zn<sup>2+</sup>) exógeno é adicionado à toxina que foi removida por quelantes solúveis, a molécula

reveste o cátion e recupera a atividade de bloqueio catalítico e neuromuscular. O  $Zn^{2+}$  exógeno pode restaurar a atividade da toxina, quer quando a toxina é livre em solução no exterior da célula ou quando internalizada no citosol<sup>23</sup>.

O alvo primário do sorotipo A da toxina botulínica é o terminal nervoso colinérgico da junção neuromuscular, que se dá através de uma série de eventos que incluem ligação ao receptor, internalização produtiva e translocação para o citosol.

Para ocorrer a paralisia, deve haver a ligação da toxina botulínica aos receptores específicos no final do nervo. Cada sorotipo de Toxina botulínica possui um receptor diferente. SNAP-25 é o receptor responsável pela toxina botulínica tipo A e passa por um processo de endocitose mediada pelo receptor, translocação dependente do pH e presença de zinco.

A toxina botulínica A promove a clivagem do SNAP-25 e isso leva à paralisia na junção neuromuscular.

A toxina botulínica é uma metaloprotease de zinco. A quelação do zinco antagoniza a clivagem do SNAP-25 nos tecidos não alvo e inibe a ação da toxina no diafragma de camundongos<sup>24</sup>.

A estrutura cristalina da toxina botulínica compreende duas cadeias de aminoácidos ligadas por uma ligação de dissulfeto. A cadeia leve (50 kDa) que é uma endopeptidase dependente de zinco relacionada às proteínas neuronais, que são responsáveis pela liberação de acetilcolina e a cadeia pesada (100 kDa) que medeia a ligação seletiva para as células neuronais através de gangliósidos específicos e transloca a cadeia leve ao citosol após a endocitose mediada pelo receptor de toda a molécula<sup>25</sup>.

De modo intracelular, a cadeia leve cliva o receptor solúvel de fixação de fatores sensíveis a N-ETILMALEIMIDA (proteínas SNARE) que é responsável pelo transporte da vesícula da acetilcolina do retículo endoplasmático da célula na fenda sináptica, bloqueando assim o sinal da transmissão neuromuscular<sup>26</sup>.

No terminal pré-sináptico, as cadeias leves separadas da toxina botulínica destroem enzimaticamente as proteínas SNARE, porém, estas últimas são constantemente ressintetizadas. Logo, a duração da paralisia depende de quanto tempo o dano à SNARE (pela toxina botulínica) será suficiente para interferir na liberação sináptica. Haverá fraqueza muscular, desde que exista toxina botulínica residual no terminal nervoso. A toxina parece permanecer no terminal por uma questão de meses, e isso determina a duração da ação<sup>16</sup>.

A toxina botulínica produzida pelo *Clostridium botulinum* é a toxina mais potente da natureza, sendo uma protease dependente do zinco. A toxina botulínica entra no terminal nervoso pré-sináptico mediada por endocitose do receptor, onde ela cliva locais específicos da proteína alvo envolvida na liberação de neurotransmissores, através de suas atividades proteolíticas dependentes do zinco<sup>27</sup>.

Os níveis de zinco podem ser aumentados por meio da ingestão de alimentos que contém esse metal, entretanto, sua deficiência não é incomum considerando que os próprios alimentos ricos em zinco podem ter sua absorção bloqueada pelos fitatos, e estes possuem capacidade de impedir a absorção de zinco na parede intestinal<sup>28</sup>.

O perfil de segurança da BoNTA está bem estabelecido e os pacientes toleram bem as injeções. Os limites da ampla aplicação são restritos substancialmente pelo alto custo do produto<sup>12</sup>.

Por serem proteases dependentes de zinco, surgiu a questão de saber se a concentração de zinco intracelular poderia influenciar na ação da toxina. É difícil encontrar informações claras sobre este ponto<sup>14</sup>.

Em 2012, um estudo conduzido por Charles Soparkar no Hospital Metodista de Houston, Estados Unidos, provocou um grande “falatório” em todo o mundo com o lançamento de uma fórmula com a possibilidade de permitir melhor a absorção do zinco e possivelmente aumentar o efeito da toxina botulínica. Charles Soparkar utilizou uma formulação de citrato de zinco 50 mg e fitase 3.000 PU por quatro dias antes da aplicação da toxina botulínica e no dia da aplicação. Foram avaliados 44 participantes que receberam aplicações com Onabotulinium toxina A, Abobotulinium toxina A e Rimabotulinium toxina B. De todos participantes testados, 41 ou seja, 93%, apresentaram aumento da eficácia e duração do efeito da toxina botulínica com o uso do suplemento oral<sup>29</sup>. *Após a publicação*, centenas de milhares de médicos passaram a prescrever tal medicação (e ainda prescrevem) na tentativa de obter mais êxitos em suas aplicações.

A distribuição de zinco no organismo não é clara. É possível que o zinco muscular esteja normal mesmo se houver deficiência sérica ou vice-versa de zinco<sup>16</sup>. O zinco é encontrado em todos os tipos de tecido e representa 0,005% do peso corporal total. A pele contém aproximadamente 6% do zinco total do corpo, seguido do tecido muscular e ósseo<sup>30</sup>.

A parte ativa da molécula da Toxina Botulínica Tipo A (BoNTA) pesa 150 kDa e é formada de duas porções: cadeia leve com atividade catalítica (50 kDa), e cadeia pesada (100 kDa). A cadeia pesada é responsável pela ligação aos receptores extracelulares e internalização na célula nervosa, além de ajudar a translocação da cadeia leve para o citoplasma do neurônio. Já o zinco presente no sítio ativo da



cadeia leve é quem impede a liberação dos neurotransmissores, nas vesículas sinápticas. Enquanto houver toxina botulínica residual para fragmentar as proteínas SNARE (Soluble NSF Attachment Receptor), haverá relaxamento muscular, visto que estas proteínas, quando “danificadas” pela aplicação da BoNTA, as vesículas de acetilcolina são impedidas de ligar-se à membrana pré-sináptica, ou seja, há impedimento da contração muscular. Este “impedimento” pode durar de três a quatro meses, visto que as proteínas SNARE são constantemente produzidas<sup>31</sup>.

### 3 HIPÓTESES

H0 – O efeito da injeção da toxina botulínica diluída em solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% possui a mesma duração do que a injeção da toxina botulínica diluída em gluconato de zinco 0,02% no músculo frontal.

H1 – O efeito da injeção da toxina botulínica diluída em gluconato de zinco 0,02% tem maior duração do que a injeção da toxina botulínica diluída somente em solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% no músculo frontal.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito e duração do uso da toxina botulínica tipo A diluída em solução de gluconato de zinco 0,02% comparando com a toxina botulínica tipo A na diluição com solução fisiológica 0,9% aplicado no músculo frontal de mulheres acima de 50 anos de idade.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Comparar as características clínicas das participantes que receberam a toxina botulínica diluída em solução de gluconato de zinco 0,02% com as que receberam a toxina botulínica na diluição com cloreto de sódio 0,9%;
- b) Descrever as alterações observadas em cada grupo conforme escala de validada de linhas frontais, segundo a percepção das participantes e observador nos diferentes períodos de observação;
- c) Verificar o tempo de duração do efeito relaxante do músculo frontal na aplicação de toxina botulínica solubilizada no diluente clássico (cloreto de sódio 0,9%) e da aplicação da associação com o zinco.

## 5 MÉTODOS

### 5.1 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi realizado após apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS. Esta pesquisa segue os princípios éticos estabelecidos de acordo com o capítulo XIV, art. 94-99, das Normas de Pesquisa em Saúde da PUCRS e as recomendações éticas conforme a Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

### 5.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA

Trata-se de um estudo prospectivo, duplo-cego, sendo que tanto os participantes, como o pesquisador, não sabiam a ordem em que as substâncias seriam administradas. A amostra foi composta por 48 participantes do sexo feminino, acima de 50 anos de idade e dividida em dois grupos. Essa idade foi escolhida visto que, por volta dos 50 anos de idade, devido a distúrbios endocrinológicos, ocorre aumento da perda de água transepidermica, o que provoca a formação de rugas estáticas<sup>32</sup>. As participantes foram submetidas a aplicação de toxina botulínica no terço superior da face, especificamente no músculo frontal, sendo que em 24 participantes a diluição da Toxina Botulínica foi com solução de Gluconato de Zinco 0,02% (Grupo Caso) e 24 participantes com diluição da Toxina Botulínica em solução Fisiológica 0,9% (Grupo Controle). Todas elas receberam doses que variam de 8 a 25 unidades no músculo frontal, conforme recomendações de aplicação nesta região<sup>33</sup>. As participantes foram recrutadas e tratadas na clínica privada da FAPECS - Instituto de Pesquisa em Ciências da Saúde EPP, localizada na região metropolitana de Vitória, no Estado do Espírito Santo. A FAPECS tem sede

estabelecida à Avenida João Palácios, nº 300, Salas 409, 410, 411 e 412 – Bloco 2A – Bairro: Eurico Salles, Centro Empresarial Shopping Mestre Álvares, Serra/ES, CEP: 29.160-161.

O examinador e os participantes foram cegados, isto é, não sabiam qual o tratamento que estariam recebendo. Um médico devidamente qualificado realizou o preparo das diluições da toxina botulínica tipo A para evitar interferência na análise pelo examinador. Por meio de análises dietéticas, verificamos a quantidade de ingesta semanal de zinco que cada paciente ingeria, à fim de comparar se esta variável poderia influenciar no resultado. Após a concordância em participar da pesquisa, todos as pacientes responderam ao questionário com questões sociodemográficas e saúde, em que a percepção do paciente de sua qualidade de vida foi avaliada através do questionário validado WHOQOL-Bref (ANEXO C) antes e após a aplicação.

### **5.2.1 Critérios de inclusão**

Todas as participantes do sexo feminino, a partir de 50 anos de idade, que concordaram com a pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, sem história de doença crônica gastrointestinal (diarreia, doença intestinal inflamatória, ou celíaco) portadoras de rugas frontais à contração muscular (dinâmicas), que estejam há pelo menos 6 meses sem receber aplicação de toxina botulínica para qualquer indicação, ou participantes que nunca submeteram-se à este tratamento foram incluídas no estudo.

### 5.2.2 Critérios de exclusão

Indivíduos do gênero masculino, e indivíduos do gênero feminino com idade inferior a 50 anos de idade, que não concordaram com a pesquisa e não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, com história de doença crônica gastrointestinal (diarreia, doença intestinal inflamatória, ou celíaco), portadoras de diabetes, com ausência de rugas frontais à contração muscular (dinâmicas ou estáticas), e que tenham realizado tratamento com toxina botulínica há menos de 6 meses para qualquer indicação não foram incluídas no estudo.

### 5.3 MÉTODOS DE RECONSTITUIÇÃO DAS DIFERENTES APRESENTAÇÕES DE TOXINA BOTULÍNICA

Para o estudo, foram utilizados dez frascos de toxina botulínica tipo A. Por se tratar de uma de uma toxina livre de complexo de proteínas e com custo menor, foi escolhido a apresentação Incobotulinum toxina A (representado pela marca Xeomin® do laboratório do laboratório Merz Pharmaceuticals). As participantes incluídas no grupo controle receberam a toxina botulínica diluída em solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%, como amplamente empregado na clínica. Cinco frascos de Incobotulinum toxina A (100 U) foram diluídos em 2 mL de solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% cada, fornecendo uma concentração final de 50 U/mL. Os outros cinco frascos, destinados às participantes incluídas no grupo caso, foram diluídos com 2 mL de uma solução de gluconato de zinco 0,02% com pH de 6,7 (50 U/mL) fornecida pelo Laboratório Pineda, localizado na Cidade de São Paulo, à Rua Monte Alegre, 1142 - Perdizes, São Paulo - SP, 05014-001.

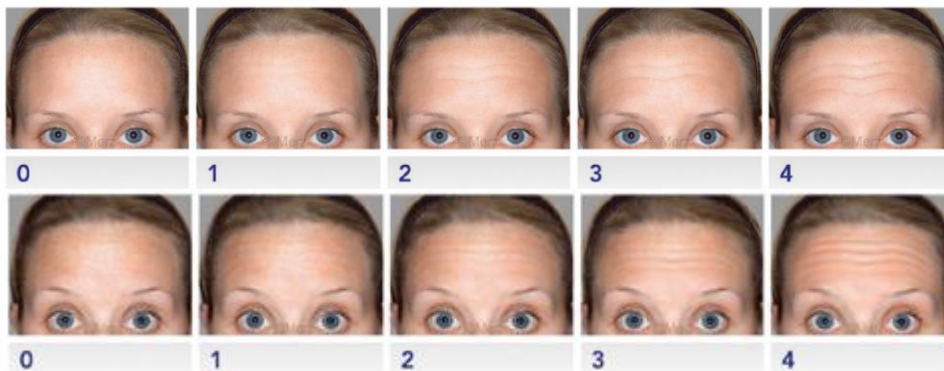
A Seringa BD MicroFine™ 1 mL 31 G e 6 mm foi utilizada para a aplicação das preparações de toxina botulínica nas participantes. Essa seringa por ser mais fina, é menos dolorosa.

#### 5.4 ESTRATÉGIAS DE AVALIAÇÃO DAS PARTICIPANTES ANTES E APÓS O TRATAMENTO

O acompanhamento das participantes foi realizado por meio da escala validada Merz-Aesthetics<sup>34,35</sup> (Fig. 3) de linhas frontais em repouso e em movimento e documentado por meio de fotografia digital a qual possui grande valor na dermatologia. Estudos científicos na área da dermatologia cosmética utilizam esse recurso com grande frequência, com a finalidade de demonstrar resultados de tratamentos. Muitas vezes, esse é o único método de aferição dos resultados, embora apresente um caráter de subjetividade na interpretação dos resultados.

As participantes foram fotografadas a uma distância de 1 m com uma câmera iSight iPhone 6S Plus, de 12 megapixels, sem flash em condições de iluminação semelhantes, sem qualquer maquiagem, antes do tratamento, nas semanas 0, 2, 4 e 14 após o procedimento.

Figura 3: Escala Validada Merz-Aesthetics de Linhas Frontais<sup>34</sup>



0 – Ausência de Linhas  
1 – Linhas suaves  
2 – Linhas moderadas

3 – Linhas severas  
4 – Linhas muito severas

Fonte: Merz Aesthetics, 2016.

## 5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho da amostra foi de 48 indivíduos, e foi calculado com a utilização do programa G-Power para verificar a associação entre variáveis. Para tanto utilizou-se um efeito de 0,5, um poder do teste de 80% e um nível de confiança de 95%.

Para caracterizar os grupos foram utilizados métodos da estatística descritiva como frequências e percentuais para variáveis categóricas e mediana, mínimo e máximo para as quantitativas.

A verificação da homogeneidade dos grupos em relação as variáveis clínicas foram realizadas pelo teste qui-quadrado (etilismo, tabagismo, uso de protetor solar e raça branca) e Manny-Whitney (idade e ingesta de zinco).

A concordância entre o médico e cada paciente foi analisada pelo índice de concordância Kappa afim de garantir a fidedignidade dos resultados.

Os resultados obtidos pela escala de Merz-Aesthetics<sup>34,35</sup> de linhas frontais foram analisados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon para comparar as linhas frontais antes e depois da aplicação. A comparação entre os grupos, toxina botulínica diluída em gluconato de zinco 0,02% e toxina botulínica diluída em cloreto de sódio 0,9% foi realizado pelo teste de Mann-Whitney. A escolha pelo teste não paramétrico ocorreu devido as variáveis não apresentarem distribuição normal (Kolmogorov-Smirnov  $p > 0,05$ ). Os diversos momentos foram comparados pelo teste Kruskall-Wallis.

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o programa estatístico SPSS versão 23 e todo estudo inferencial foi realizado considerando um nível de significância de 5%.



## 6 RESULTADOS

A Tabela 1 compara as características clínicas das participantes que receberam a toxina botulínica diluída em solução de gluconato de zinco 0,02% com as que receberam a toxina botulínica na diluição com cloreto de sódio 0,9%. O resultado do teste qui-quadrado indicou que não existe associação entre raça, etilismo, tabagismo e uso de protetor solar com os grupos em estudo. Para as variáveis idade e quantidade ingesta de zinco semanal o resultado do teste Mann-Whitney indicou que não existe diferença significativa entre os grupos, valor-p > 0,05. Os dois grupos são similares em relação as características clínicas.

Tabela 1: Comparação das características clínicas das pacientes entre os grupos

Característica	Toxina botulínica	Toxina botulínica + gluconato de zinco	p
	Nº de pacientes (%)		
Etilismo	12 (50.0%)	14 (58.3%)	0.772
Tabagismo	01 (4.2%)	04 (16.7%)	0.348
Uso diário de protetor solar	14 (58.3%)	12 (50.0%)	0.562
Raça Branca	17 (70.8%)	11 (45.8%)	0.079
	Mediana (Min-Max)		
Idade (anos)	58 (50 - 70)	57 (50 - 70)	0.642
Quantidade ingesta de Zinco semanal (mg/sem)	61 (33 - 109)	66 (29 - 115)	0.599

p= Teste qui-quadrado e Teste Mann-Whitney

Fonte: O autor.

A comparação de variáveis prognósticas como capacidade em aceitar a aparência física, satisfação consigo mesma e satisfação pessoal foram analisadas antes e após aplicação da toxina botulínica, Tabela 2, sendo que o resultado do teste indicou que não existe diferença significativa das variáveis antes e após aplicação ( $p^a > 0,05$ ). Também foi realizada a comparação das variáveis entre os

grupos em cada momento (antes e após), o resultado desta comparação também não indicou diferença significativa, ( $p^b > 0,05$ ).

Tabela 2: Comparação das variáveis prognósticas antes e após a aplicação da toxina e comparação entre os grupos em cada momento

Prognóstico	Momento	Mediana (Min-Max)	$p^a$	Toxina botulínica	Toxina botulínica + gluconato de zinco	$p^b$
				Mediana (Min-Max)		
Capacidade em aceitar aparência física	Antes	3 (1 - 5)	1.000	3 (2 - 5)	4 (1 - 5)	0.355
	Após	3 (1 - 5)		3 (2 - 5)	4 (1 - 5)	
Satisfação consigo mesma	Antes	4 (1 - 5)	1.000	4 (2 - 5)	4 (1 - 5)	0.407
	Após	4 (1 - 5)		4 (2 - 5)	4 (1 - 5)	
Satisfação com a vida sexual	Antes	3 (1 - 5)	1.000	3 (1 - 5)	3 (1 - 5)	0.394
	Após	3 (1 - 5)		3 (1 - 5)	3 (1 - 5)	

Teste não paramétrico de Wilcoxon e Teste Kruskal-Wallis  
 $p^a$  = Comparação antes e pós;  $p^b$  = Comparação entre grupos.  
 Fonte: O autor

Para verificar o tempo de duração do efeito relaxante do músculo frontal na aplicação de toxina botulínica solubilizada com cloreto de sódio 0,9% e com o gluconato de zinco 0,02%, foi considerado a visão da paciente e do médico. O resultado obtido pelo índice de concordância Kappa, Tabela 3, indicou que a concordância entre eles é significativa, valor  $p < 0,05$ , assim foi feita a opção de verificar diferenças entre os grupos somente na visão do médico.

Em nenhum momento (do inicial à 14ª semana) ocorreu diferença significativa da duração do efeito entre os grupos ( $p^a > 0,05$ ) tanto para a observação realizada em repouso como em movimento, conforme a Tabela 4. Foi verificada diferença significativa entre os momentos tanto para as pacientes que receberam a toxina botulínica na diluição com cloreto de sódio 0,9% como para as que receberam toxina botulínica diluída em solução de gluconato de zinco 0,02% ( $p^b < 0,000$ ) considerando movimento e repouso.

Tabela 3: Grau de concordância entre as avaliações das pacientes e do médico

Médico versus pacientes		Kappa	p
Semana 0	Repouso	0.498	0.000
	Movimento	0.252	0.008
2 <sup>a</sup>	Repouso	0.879	0.000
	Movimento	0.963	0.000
4 <sup>a</sup>	Repouso	0.84	0.000
	Movimento	0.885	0.000
14 <sup>a</sup>	Repouso	0.821	0.000
	Movimento	0.831	0.000

p= Índice de concordância Kappa  
 Fonte: O autor

As figuras 4, 5, 6 e 7 correspondem à algumas das pacientes que foram submetidas ao estudo. Todas elas, fazem referência às semanas zero, quatro e quatorze após a aplicação de toxina botulínica. Nas imagens, as pacientes foram fotografadas com o músculo frontal em repouso e em movimento.

Figura 4: Fotografias obtidas com as pacientes em repouso e em movimento nas semanas 0, 4 e 14.

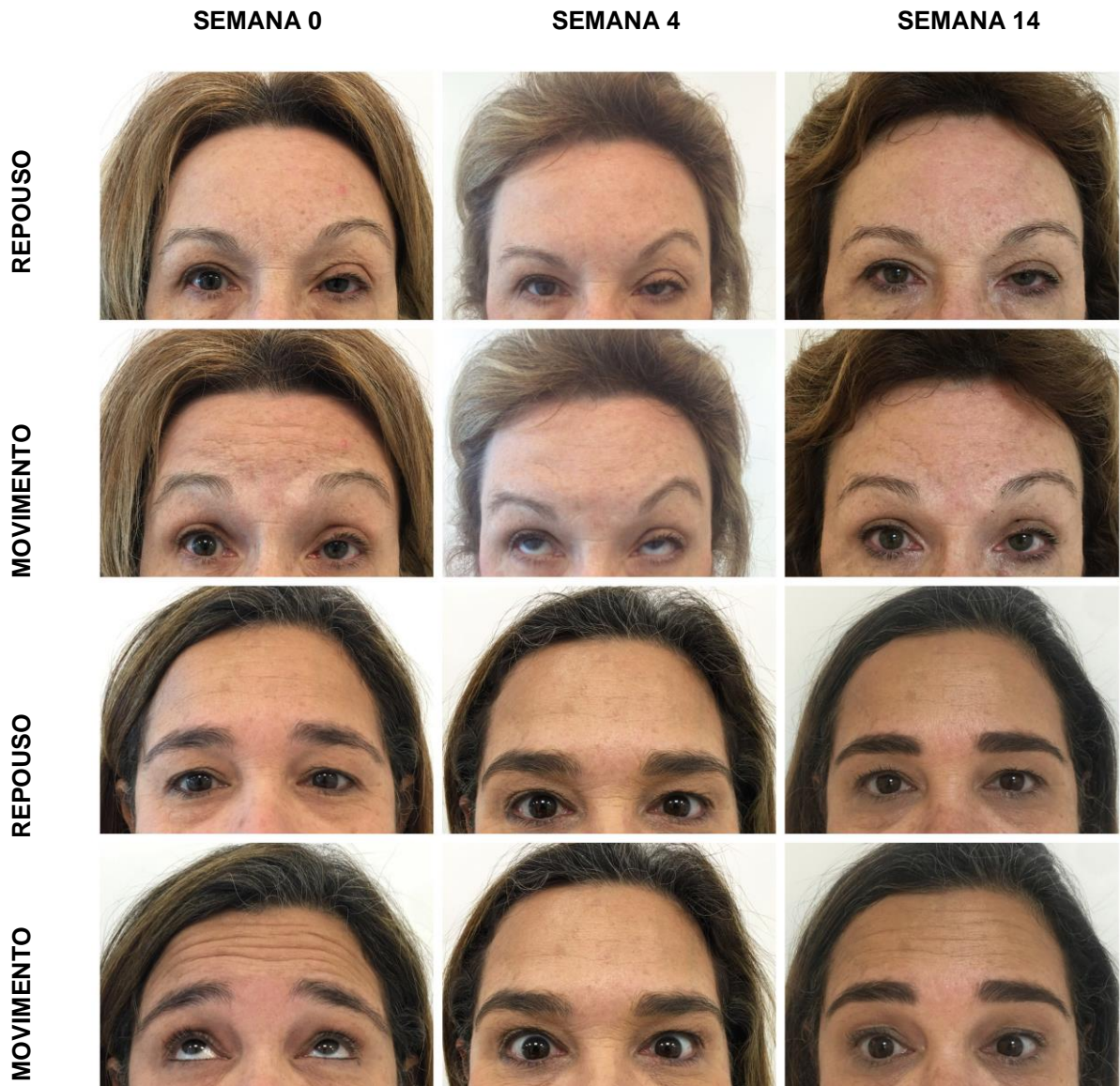


Fonte: O autor

As duas pacientes da figura 4 receberam toxina botulínica solubilizada em cloreto de sódio 0,9%. A primeira paciente, conforme a Escala Validada Merz-Aesthetics de Linhas Frontais<sup>34</sup>, encontra-se na semana 0 com o grau 3 de rugas em repouso sendo que, na semana 4 apresentou-se com o grau 1 e na semana 14 ao grau 2. Na linha 2, a mesma paciente, porém com o músculo frontal em movimento, achava-se na semana 0 com o grau 4, na semana 4 com grau 1 e na semana 14 correspondia-se ao grau 2.

Já a segunda paciente (correspondente às linhas 3 e 4), a qual também recebeu toxina botulínica solubilizada com cloreto de sódio 0,9%, na semana 0 com o músculo frontal em repouso correspondia ao grau 2 de rugas e, em movimento, ao grau 3 sendo que, na semana 4 apresentou-se com o grau 0 em repouso e grau 1 em movimento. Na décima quarta semana, em repouso a mesma paciente já se apresenta com o grau 2 e em movimento ao grau 2.

Figura 5: Fotografias obtidas com as pacientes em repouso e em movimento nas semanas 0, 4 e 14.



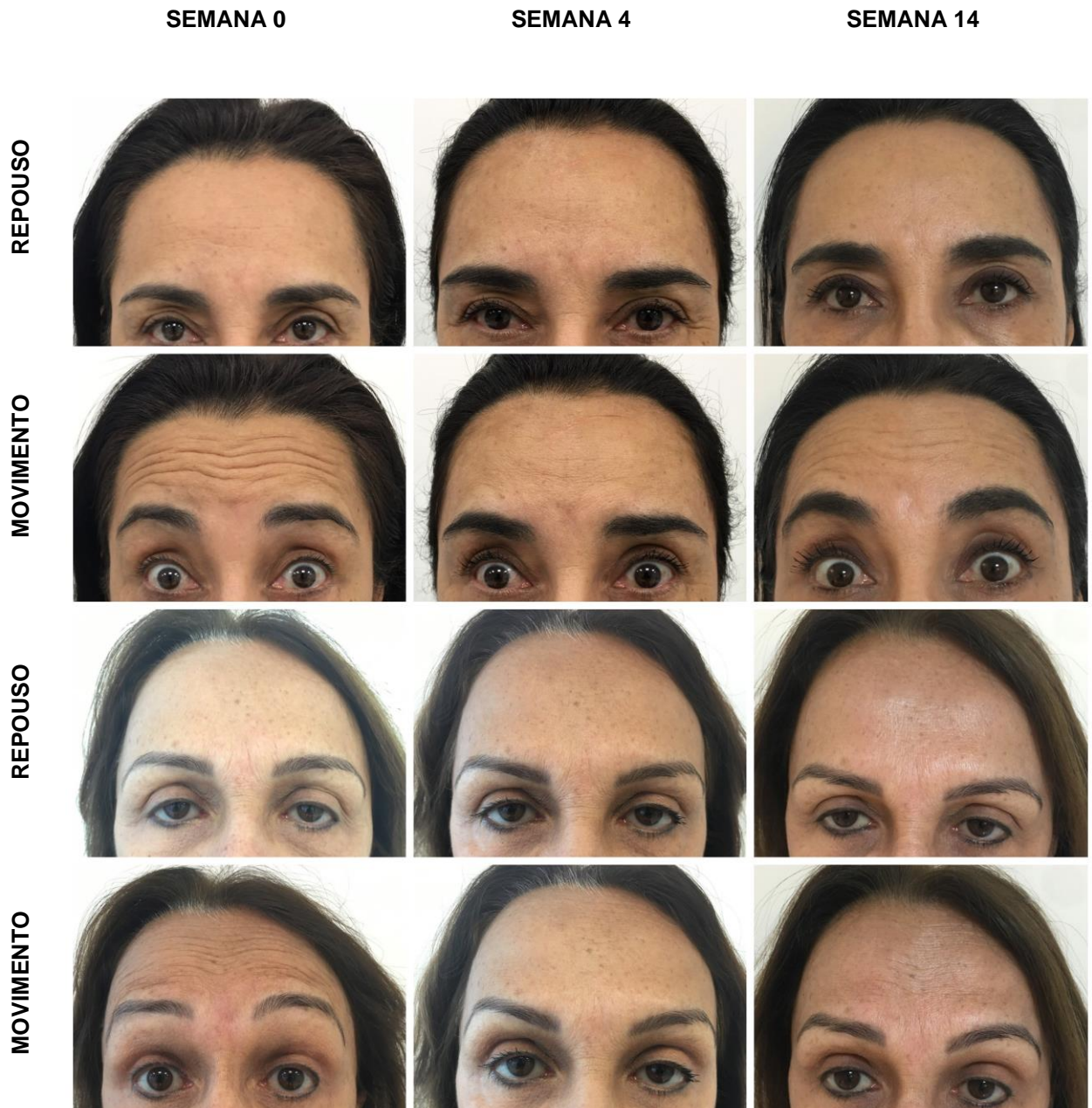
Fonte: O autor

A figura 5 demonstra duas pacientes, ambas receberam toxina botulínica solubilizada com gluconato de zinco 0,02%. A paciente da linha 1 e 2 apresenta poucas rugas, tanto em repouso como em movimento. Segundo a Escala Validada Merz-Aesthetics de Linhas Frontais<sup>34</sup> na semana 0 com o músculo frontal em repouso apresentava grau 1 e em movimento ao grau 2. Quatro semanas após a aplicação da toxina botulínica diluída em solução de gluconato de zinco 0,02%, foi para o grau 0 de rugas, tanto em repouso como em movimento e manteve-se nesta

condição até a semana 14. A segunda paciente desta figura, que era tabagista, deu entrada com grau 2 de rugas em repouso e grau 4 em movimento, porém, quatro semanas após a aplicação, evoluiu favoravelmente para o grau 0 em ambas imagens (repouso e movimento) sendo que, na semana 14 apresentou-se com o grau 1, tanto em repouso quanto em movimento.



Figura 6: Fotografias obtidas com as pacientes em repouso e em movimento nas semanas 0, 4 e 14.



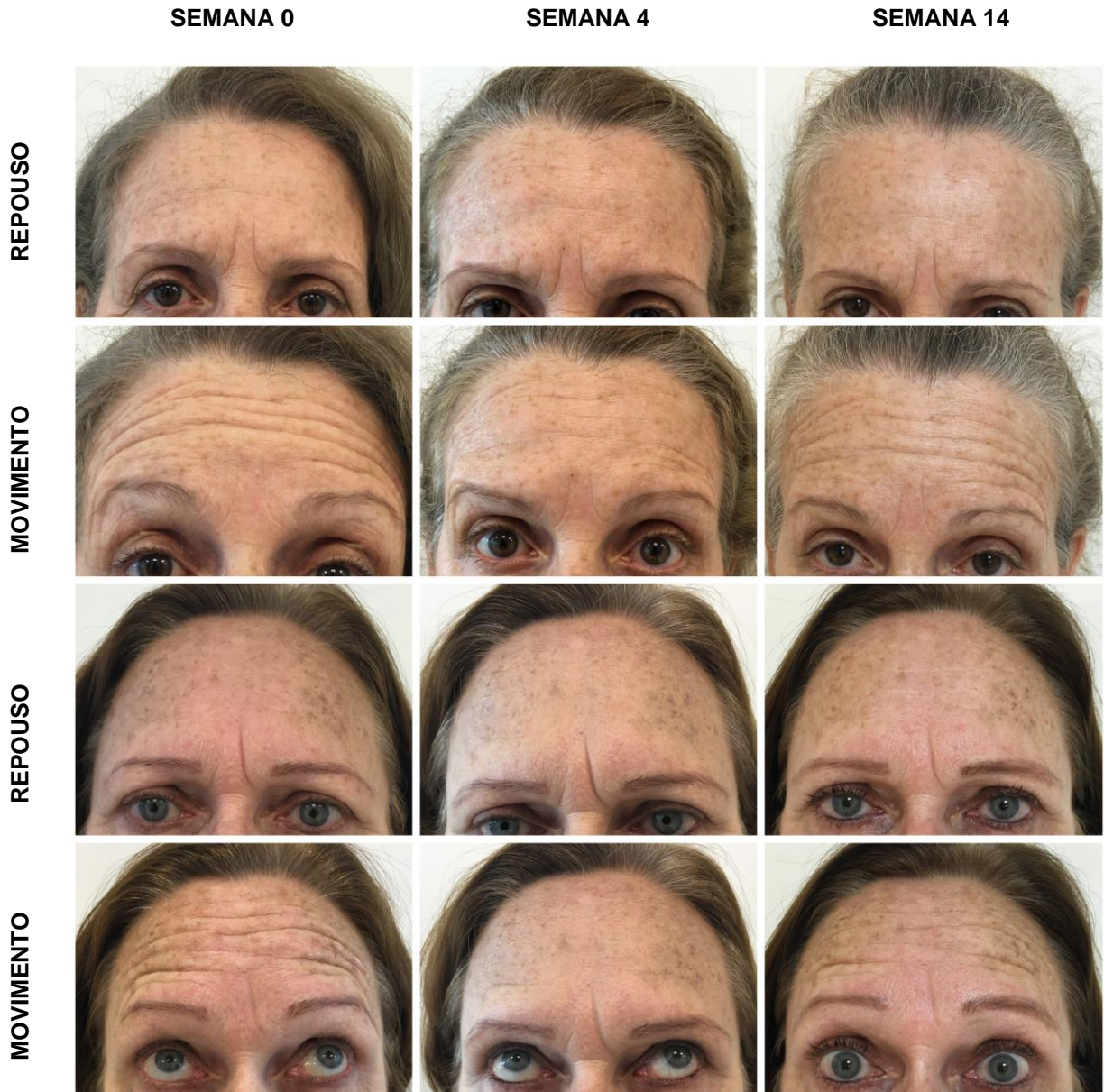
Fonte: O autor

A figura 6 representa duas pacientes em que ambas receberam toxina botulínica solubilizada em gluconato de zinco sendo que, a primeira fazia uso diário de protetor solar e tinha uma dieta rica em zinco, ingerindo 115 mg do mineral semanalmente. Já a segunda participante desta figura, não possuía o hábito de uso de protetor solar e tinha uma ingestão pobre em zinco, com cerca de 29 mg do mineral semanalmente.



Tanto a primeira como a segunda paciente na semana 0 apresentavam-se com o grau 1 de linhas frontais em repouso e grau 3 de linhas frontais em movimento. Quatro semanas após a aplicação, as duas pacientes evoluíram para o grau 0 de linhas frontais em repouso e em movimento. Já após 14 semanas, ambas encontram-se no grau 1 de linhas frontais, tanto em repouso como em movimento.

Figura 7: Fotografias obtidas com as pacientes em repouso e em movimento nas semanas 0, 4 e 14.



Fonte: O autor

A figura 7 representa duas pacientes em que ambas receberam toxina botulínica solubilizada em cloreto de sódio 0,9% sendo que, a primeira não era etilista e possuía uma baixa ingestão semanal de zinco, com cerca de 33 mg do mineral por semana. Entretanto, a segunda participante desta figura, era etilista e porém, tinha uma ingestão rica em zinco, com cerca de 109 mg do mineral semanalmente.

Tanto a primeira como a segunda paciente na semana 0 apresentavam-se com o grau 2 de linhas frontais em repouso e grau 4 de linhas frontais em movimento. Quatro semanas após a aplicação, as duas pacientes evoluíram para o grau 1 de linhas frontais em repouso e grau 1 em movimento. Já após 14 semanas, ambas encontram-se no grau 3 de linhas frontais, tanto em repouso como em movimento.

Tabela 4: Comparação da duração do efeito relaxante do músculo frontal entre os momentos e entre os grupos em cada momento

Momento	Toxina botulínica + gluconato de zinco		p <sup>a</sup>
	Toxina botulínica	Mediana (Min-Max)	
Semana 0	3 (1 - 4)	2 (1 - 4)	0.727
2 <sup>a</sup>	0 (0 - 2)	0 (0 - 2)	0.576
4 <sup>a</sup>	1 (0 - 3)	1 (0 - 3)	0.859
14 <sup>a</sup>	2 (0 - 3)	2 (0 - 3)	0.695
	p <sup>b</sup>	0.000	0.000
Semana 0	4 (2 - 4)	4 (2 - 4)	0.289
2 <sup>a</sup>	1 (0 - 3)	1 (0 - 2)	0.926
4 <sup>a</sup>	1 (0 - 3)	1 (0 - 4)	0.778
14 <sup>a</sup>	3 (1 - 4)	3 (1 - 4)	0.410
	p <sup>b</sup>	0.000	0.000

Teste não paramétrico de Wilcoxon e Teste Kruskal-Wallis

p<sup>a</sup>= Comparação entre grupos; p<sup>b</sup>= Comparação entre os momentos.

Fonte: O autor.

Nas Tabelas de 5 a 8 tem-se a comparação da duração do efeito dentro do grupo em relação a exposição a fatores como etilismo, tabagismo, uso de protetor solar e raça considerando repouso e movimento do músculo frontal.

O resultado mostrado na Tabela 5 indica que o grupo que usou toxina botulínica com diluição usual a duração do efeito não diferiu na presença do etilismo no repouso e no movimento ( $p^a > 0,05$ ) em nenhum dos momentos considerados. Já no grupo que usou toxina botulínica diluída em solução de gluconato de zinco ocorreu diferença significativa no momento inicial em repouso e na quarta semana, observa-se a mediana maior no grupo de pessoas que usam álcool. Quando observado a duração em movimento tem-se uma diferença significativa na segunda semana,  $p^a < 0,05$ .

Tabela 5: Comparação da duração do efeito em relação a presença de etilismo

Momento	Etilismo - Repouso	Toxina botulínica		Toxina botulínica + gluconato de zinco	
		Mediana (Min-Max)	p <sup>a</sup>	Mediana (Min-Max)	p <sup>b</sup>
Semana 0	Não	3 (1 - 4)	0.755	2 (1 - 3)	0.042
	Sim	3 (1 - 3)		3 (1 - 4)	
2 <sup>a</sup>	Não	0 (0 - 2)	0.932	0 (0 - 2)	0.212
	Sim	0 (0 - 1)		1 (0 - 1)	
4 <sup>a</sup>	Não	1 (0 - 2)	0.410	0 (0 - 2)	0.031
	Sim	1 (0 - 3)		1 (0 - 3)	
14 <sup>a</sup>	Não	2 (0 - 3)	0.410	2 (0 - 3)	0.192
	Sim	2 (1 - 3)		2 (1 - 3)	
Etilismo - Movimento					
inicial	Não	4 (3 - 4)	0.887	4 (2 - 4)	0.371
	Sim	4 (2 - 4)		4 (2 - 4)	
2 <sup>a</sup>	Não	1 (0 - 3)	0.799	0 (0 - 1)	0.005
	Sim	1 (0 - 2)		1 (0 - 2)	
4 <sup>a</sup>	Não	1 (0 - 3)	0.443	1 (0 - 2)	0.108
	Sim	2 (1 - 3)		2 (0 - 4)	
14 <sup>a</sup>	Não	3 (2 - 4)	0.887	2 (1 - 4)	0.096
	Sim	3 (1 - 4)		3 (1 - 4)	

p= Teste qui-quadrado, teste Mann-Whitney e Teste Kruskal-Wallis

Fonte: O autor

Na Tabela 6 foi realizada a comparação da duração do efeito dentro do grupo em relação a exposição ao tabagismo. Não foram detectadas diferenças na duração do efeito para nenhum grupo e em nenhum momento, tanto no repouso como movimento ( $p^a$  e  $p^b > 0,05$ ).

Tabela 6: Comparação da duração do efeito em relação a presença de tabagismo

Momento	Tabagismo - Repouso	Toxina botulínica		Toxina botulínica + gluconato de zinco	
		Mediana (Min-Max)	p <sup>a</sup>	Mediana (Min-Max)	p <sup>b</sup>
Semana 0	Não	3 (1 - 4)	0.583	3 (1 - 4)	0.157
	Sim	3 (3 - 3)		2 (1 - 2)	
2 <sup>a</sup>	Não	0 (0 - 2)	0.417	0 (0 - 2)	0.525
	Sim	1 (1 - 1)		0 (0 - 1)	
4 <sup>a</sup>	Não	1 (0 - 2)	0.083	1 (0 - 3)	0.794
	Sim	3 (3 - 3)		1 (0 - 3)	
14 <sup>a</sup>	Não	2 (0 - 3)	0.167	2 (0 - 3)	0.970
	Sim	3 (3 - 3)		2 (1 - 3)	
Tabagismo - Movimento					
Semana 0	Não	4 (2 - 4)	0.750	4 (2 - 4)	0.135
	Sim	4 (4 - 4)		3 (2 - 4)	
2 <sup>a</sup>	Não	1 (0 - 3)	0.667	1 (0 - 2)	0.737
	Sim	1 (1 - 1)		1 (0 - 1)	
4 <sup>a</sup>	Não	1 (0 - 3)	0.167	1 (0 - 4)	0.309
	Sim	3 (3 - 3)		1 (0 - 3)	
14 <sup>a</sup>	Não	3 (1 - 4)	0.250	3 (1 - 4)	0.682
	Sim	4 (4 - 4)		2 (1 - 4)	

p= Teste qui-quadrado, teste Mann-Whitney e Teste Kruskal-Wallis

Fonte: O autor.

Na Tabela 7 foi realizada a comparação da duração do efeito dentro do grupo em relação ao uso de protetor solar. Não foram detectadas diferenças na duração do efeito para nenhum grupo e em nenhum momento, tanto no repouso como movimento ( $p^a$  e  $p^b > 0,05$ ).

Tabela 7: Comparação da duração do efeito em relação ao uso de protetor solar

Tempo	Uso de protetor solar	Toxina botulínica		Toxina botulínica + gluconato de zinco	
		Mediana (Min-Max)	p <sup>a</sup>	Mediana (Min-Max)	p <sup>b</sup>
Semana 0	Não	3 (2 - 4)	0.341	3 (2 - 4)	0.219
	Sim	3 (1 - 3)		2 (1 - 4)	
2 <sup>a</sup>	Não	0 (0 - 2)	0.585	1 (0 - 2)	0.443
	Sim	0 (0 - 1)		0 (0 - 1)	
4 <sup>a</sup>	Não	1 (0 - 3)	0.437	1 (0 - 3)	0.630
	Sim	1 (0 - 2)		1 (0 - 3)	
14 <sup>a</sup>	Não	2 (0 - 3)	0.437	2 (0 - 3)	0.378
	Sim	2 (0 - 3)		1 (0 - 3)	
Uso de protetor solar Movimento					
Semana 0	Não	4 (2 - 4)	0.752	4 (3 - 4)	0.143
	Sim	4 (2 - 4)		4 (2 - 4)	
2 <sup>a</sup>	Não	1 (0 - 3)	0.437	1 (0 - 1)	0.843
	Sim	1 (0 - 1)		1 (0 - 2)	
4 <sup>a</sup>	Não	2 (1 - 3)	0.437	2 (1 - 3)	0.242
	Sim	1 (0 - 3)		1 (0 - 4)	
14 <sup>a</sup>	Não	3 (2 - 4)	0.371	3 (1 - 4)	0.347
	Sim	3 (1 - 4)		2 (1 - 4)	

p= Teste qui-quadrado Teste não paramétrico de Wilcoxon e Teste Kruskal-Wallis

Fonte: O autor.

A comparação realizada na Tabela 8 indicou que não foram detectadas diferenças na duração do efeito  $p^a$  e  $p^b > 0,05$ , ou seja, ser da raça branca (fototipo 1, 2 e 3) não interfere significativamente na duração do efeito tanto no grupo que fez aplicação de toxina botulínica solubilizada com cloreto de sódio como com gluconato de zinco.

Tabela 8: Comparação da duração do efeito na raça

Momento	Raça - Repouso	Toxina botulínica		Toxina botulínica + gluconato de zinco	
		Mediana (Min-Max)	p <sup>a</sup>	Mediana (Min-Max)	p <sup>b</sup>
Semana 0	Branca	2 (1 - 4)	0.576	2 (1 - 4)	0.865
	Não Branca	3 (1 - 3)		2 (1 - 4)	
2 <sup>a</sup>	Branca	0 (0 - 2)	0.260	0 (0 - 1)	0.252
	Não Branca	1 (0 - 1)		1 (0 - 2)	
4 <sup>a</sup>	Branca	1 (0 - 3)	0.147	1 (0 - 3)	0.649
	Não Branca	1 (1 - 3)		1 (0 - 3)	
14 <sup>a</sup>	Branca	2 (0 - 3)	0.087	2 (0 - 3)	0.303
	Não Branca	2 (1 - 3)		1 (0 - 3)	
Raça - Movimento					
Semana 0	Branca	4 (2 - 4)	0.804	4 (2 - 4)	0.691
	Não Branca	4 (2 - 4)		4 (2 - 4)	
2 <sup>a</sup>	Branca	1 (0 - 3)	0.951	0 (0 - 1)	0.277
	Não Branca	1 (0 - 1)		1 (0 - 2)	
4 <sup>a</sup>	Branca	1 (0 - 3)	0.494	1 (0 - 3)	0.865
	Não Branca	2 (1 - 3)		1 (0 - 4)	
14 <sup>a</sup>	Branca	3 (2 - 4)	0.951	2 (1 - 4)	0.649
	Não Branca	3 (1 - 4)		3 (1 - 4)	

p= Teste qui-quadrado - Teste não paramétrico de Wilcoxon e Teste Kruskal-Wallis

Fonte: O autor.



## 7 DISCUSSÃO

Neste estudo as participantes foram categorizadas conforme os critérios estabelecidos por meio de uma escala validada<sup>34,35</sup> de linhas frontais em repouso e em movimento e submetidas a aplicação da toxina botulínica diluída em solução de gluconato de zinco 0,02% e toxina botulínica diluída com cloreto de sódio 0,9%. Os resultados obtidos mostraram que não há relação entre raça, etilismo, tabagismo e uso de protetor solar com o efeito da toxina nos dois grupos em estudo. Para as variáveis idade e quantidade ingesta de zinco semanal o resultado do teste Mann-Whitney indicou que não existe diferença significativa entre os grupos, valor-p > 0,05. Estas observações também foram descritas em outro estudo<sup>29</sup>. Embora a toxina botulínica do tipo A seja efetiva e segura para reduzir as rugas faciais, poucos estudos avaliaram a qualidade de vida dos pacientes após o tratamento<sup>36</sup> e o resultado desta comparação no presente estudo, não indicou diferença significativa, divergindo do único trabalho encontrado<sup>36</sup> que utilizou testes de qualidade de vida em pacientes submetidos a aplicações estéticas de toxina botulínica. Este resultado é importante pois é alta a proporção de indivíduos que são submetidos à tratamentos cosméticos na tentativa de "corrigir" defeitos percebidos na sua aparência física. Uma literatura emergente<sup>37</sup> sugere que a maioria dos indivíduos especialmente com transtorno dismórfico corporal têm resultados ruins após intervenções cosméticas. Estudos longitudinais cuidadosamente conduzidos com populações de pacientes bem caracterizadas são necessários para melhor avaliar essa questão. Antes de verificar o tempo de duração do efeito relaxante do músculo frontal na aplicação de toxina botulínica solubilizada com cloreto de sódio 0,9% e com o gluconato de zinco 0,02%, foram consideradas as visões individualizadas das pacientes e do médico examinador com relação à que grau de rugas das linhas frontais<sup>34</sup> que cada

participante se encontrava anteriormente ao tratamento. O resultado indicou que houve concordância entre as pacientes e o médico, ou seja, quando a participante se olhava para o espelho e comparava com a escala das linhas frontais o médico também encontrou resultados semelhantes. Em um outro estudo<sup>38</sup> que também utilizou a mesma escala de linhas frontais para verificar a duração de três tipos de toxina botulínica tipo A em 180 pacientes (incobotulinumtoxina A, onabotulinumtoxina A, e abobotulinumtoxina A) considerou somente a opinião das participantes e não comparou o ponto de vista do médico. O início do efeito do tratamento foi definido como o décimo quarto dia (ou segunda semana) após a execução da aplicação, visto que o efeito da toxina botulínica, segundo a literatura<sup>39</sup> se completa em duas semanas, tempo suficiente para que o observador e paciente constatassem a diminuição na atividade do músculo frontal em comparação com fotografias de duas semanas antes do tratamento. A apuração ainda contemplou o vigésimo oitavo dia e por fim o nonagésimo oitavo dia (ou 14<sup>a</sup> semana) após a aplicação. Todos os pacientes foram avaliados com o músculo frontal em repouso e em movimento. No grupo de pacientes que receberam incobotulinumtoxina A solubilizada em cloreto de sódio, em 14 semanas da aplicação houve redução de 66% dos efeitos nos pacientes com as rugas do frontal em repouso. Já os pacientes que foram solicitados que movimentassem o músculo frontal (movimento) houve redução de 75% do efeito desejado com 98 dias da aplicação. As rugas em movimento parecem tender a retornar ao momento inicial mais precocemente se comparado às rugas em repouso. Os resultados deste estudo são consistentes com pesquisas anteriores<sup>40</sup> que demonstram que o tratamento intramuscular com toxina botulínica tipo A melhora a aparência de linhas em repouso e qualidade geral da pele. Uma possível explicação para esse efeito é que o enfraquecimento muscular

elimina a dobra repetitiva da pele e alivia o estresse crônico aplicado à pele sobreposta, o que faz com que a elastina e o colágeno se fortaleçam nesses locais ao longo do tempo<sup>41</sup>. No grupo de pacientes que receberam incobotulinumtoxina A solubilizada em gluconato de zinco, após 14 semanas da aplicação houve redução de 100% dos efeitos nos pacientes com as rugas do frontal em repouso. Já os pacientes que foram solicitados que movimentassem o músculo frontal também houve redução de 75% do efeito desejado com 98 dias da aplicação, corroborando com um estudo<sup>27</sup> que comparou duas apresentações de Toxina Botulínica Tipo A (onabotulinum toxina A e incobotulinum toxina A). Existem muitos mitos que envolvem o manejo da toxina botulínica, muitos médicos à utilizam somente se forem reconstituídas no dia da aplicação, porém, um estudo<sup>42</sup> confirmou que a Toxina Botulínica Tipo A é uma molécula extremamente estável, e a agitação vigorosa não prejudica sua potência, mesmo após 6 semanas de diluída. Os resultados do presente estudo também mostraram que os indivíduos que consomem mais alimentos ricos em zinco, independente se foram tratados com incobotulinumtoxina A diluída em cloreto de sódio ou gluconato de zinco, não tiveram efeito mais duradouro. Esta variante não foi avaliada pelo autor que descreveu o uso oral do zinco para aumentar a duração dos efeitos da toxina botulínica<sup>29</sup>. Este estudo avaliou se alguns fatores como etilismo, tabagismo, uso de protetor solar e raça poderiam influenciar nos resultados, considerando as rugas frontais em repouso e movimento. Sabe-se que as rugas também estão associadas ao envelhecimento, estado hormonal, tabagismo e doenças intercorrentes<sup>43</sup> e que há uma ligação entre rugas periorais e tabagismo e que fumar é um fator de risco para o envelhecimento prematuro da pele. Estudos propuseram que a exposição ao cigarro aumenta a atividade da metaloproteinase da matriz-1 e 3 e diminui a

produção de pro-colágeno na pele, possivelmente pela produção de radicais livres induzidos pelo tabaco<sup>13</sup>, entretanto, este estudo não demonstrou sucesso terapêutico ou duração inferior nos pacientes tabagistas atuais que receberam aplicações de toxina botulínica com as duas diluições.

## 8 CONCLUSÕES

Com base neste estudo, verifica-se que diversos pesquisadores estão empenhados na geração de conhecimento, no sentido de descobrir novas utilizações da Toxina Botulínica nas diferentes áreas da medicina.

Os dados identificam que os hábitos de vida das pacientes não influenciam no resultado final do procedimento, e que a duração do efeito não está ligado à diluição do produto com substância diferente da diluição clássica com solução fisiológica. Contudo, o estudo demonstrou que os pacientes que ingerem bebida alcoólica que utilizaram a toxina botulínica diluída em gluconato de zinco 0,02% parecem ter uma melhor eficácia. Os resultados apresentados neste estudo não mostram melhorias na qualidade de vida dos pacientes durante o pico de ação do tratamento com BoNTA, em relação ao aspecto físico. Outra descoberta foi a de que o hábito de não usar protetor solar não influenciou no efeito da duração da Toxina Botulínica. Pacientes com fototipos baixos ou elevados possuem a mesma duração de efeito da toxina botulínica.

Pela segurança do medicamento e pela necessidade de estudar meios que modifiquem desfechos superiores com a Toxina Botulínica, o autor conclui que é possível realizar estudos com esta formulação de gluconato de zinco entre as demais apresentações de Toxina Botulínica tipo A com toda segurança e que a padronização do diluente mais eficaz deve ser atingida, objetivando a elaboração de protocolos voltadas a maximizar os resultados, visto que a toxina botulínica é um medicamento ainda com elevado custo e alta demanda entre as mais diversas patologias e não só a estética.

O presente estudo não se destinava a ser uma análise sistemática da eficácia e segurança de várias preparações. Em vez disso, nos concentramos em um tipo de

Toxina Botulínica Tipo A. Em particular, examinamos as possibilidades de problemas clínicos em razão da sua diluição com zinco, bem como questões relacionadas à fatores externos, para fornecer informações sobre o uso combinado de BoNTA reconstituída em gluconato de zinco, na prática clínica.

## REFERÊNCIAS

1. GRITSENKO, D. A. et al. Transcription factor p53 and skin aging. **Adv Gerontol**, v. 30, n. 1, p. 10-16, 2017. PubMed PMID: 28557384.
2. FARAGE, M. A. et al. Clinical implications of aging skin: cutaneous disorders in the elderly. **Am J Clin Dermatol**, v. 10, n. 2, p. 73-86, 2009.
3. MAHONEY, M. G. et al. Extracellular matrix in cutaneous ageing: the effects of 0.1% copper-zinc malonate-containing cream on elastin biosynthesis. **Exp Dermatol**, v. 18, n. 3, p. 205-11, Mar. 2009.
4. EI-DOMYATI M. et al. The use of Botulinum toxin-a injection for facial wrinkles: a histological and immunohistochemical evaluation. **J Cosmet Dermatol**, v. 14 n. 2, p. 140-4, Jun. 2015. Epub 2015 Apr 27.
5. AMERICAN SOCIETY OF PLASTIC SURGEONS – ASPS. **Plastic Surgery statistics: report. 2015.** Disponível em: <<https://d2wirczt3b6wjm.cloudfront.net/News/Statistics/2015/plastic-surgery-statistics-full-report-2015.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2017.
6. LEAL, L. N. População idosa vai triplicar entre 2010 e 2050, aponta publicação do IBGE. **O Estado de S. Paulo**, ago. 2016. Disponível em: <<http://brasil.estadao.com.br/noticias/geral,populacao-idosa-vai-triplicar-entre-2010-e-2050-aponta-publicacao-do-ibge,10000072724>>. Acesso em: 23 jan. 2017.
7. DRESSLER, D.; ROGGENKAEMPER, P. A brief history of neurological botulinum toxin therapy in Germany. **J Neural Transm** (Vienna). Jul. 21, 2017.
8. GIORDANO, C. N.; MATARASSO, S. L.; OZOG, D. M. Injectable and topical neurotoxins in dermatology: Indications, adverse events, and controversies. **J Am Acad Dermatol**, v. 76, n. 6, p. 1027-1042. Jun. 2017. doi: 10.1016/j.jaad.2016.11.012.
9. POULAIN, B. et al. Clinical equivalence of conventional OnabotulinumtoxinA (900 KDa) and IncobotulinumtoxinA (neurotoxin free from complexing proteins - 150 KDa): 2012 multidisciplinary French consensus in aesthetics. **J Drugs Dermatology**, v. 12, n. 12, p. 1434-46, Dec. 2013).
10. SCAGLIONE, F. Conversion Ratio between Botox®, Dysport®, and Xeomin® in Clinical Practice. **Toxins** (Basel), v. 8, n. 3, p. 17-28, Mar. 2016.
11. GUO, Y et al. Polyclonal neural cell adhesion molecule antibody prolongs the effective duration time of botulinum toxin in decreasing muscle strength. **Neurol Sci**. v. 36, n. 11, p. 2019-25, Nov. 2015.

12. CAMPANATI, A. et al. Botulinum toxin off-label use in dermatology: a Review. **Skin Appendage Disord**, v. 3, n. 1, p. 39-56, Mar. 2017. doi: 10.1159/000452341.
13. CHIEN, A. L. et al. Perioral wrinkles are associated with female gender, aging, and smoking: development of a gender-specific photonumeric scale. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 5, p. 924-930, May 2016.
14. PATIL, S. Botulinum toxin: pharmacology and therapeutic roles in pain states. **Current Pain and Headache Reports**, v. 20, n. 3, Mar. 2016. 37
15. ASSAD, S. et al. Novel and conservative approaches towards effective management of plantar fasciitis. **Cureus**, v. 8, n. 12, p. e913, Dec. 2016.
16. HALLETT, M. Explanation of timing of botulinum neurotoxin effects, onset and duration, and clinical ways of influencing them. **Toxicon**, v. 107, pt. A, p. 64-67, Dec. 2015. 24 e 33
17. PELLETT, S. In vivo onset and duration of action varies for botulinum neurotoxin A subtypes 1-5. **Toxicon**. v. 107, p. 37-42, Dec 2015. doi: 10.1016/j.toxicon.2015.06.021.
18. FENG, Y. Comparison of neurotoxic potency between a novel chinbotulinumtoxinA with onabotulinumtoxinA, incobotulinumtoxinA and lanbotulinumtoxinA in rats. **Drug Des Devel Ther**, v. 11, p. 1927-1939, Jun. 2017.
19. MIAO, Y. Y. The effect of botulinum toxin type a on expression profiling of long noncoding RNAs in human dermal fibroblasts. **Biomed Res Int**, 2017. doi: 10.1155/2017/2957941.
20. ZYCHOWSKA, M. Participation of pro- and anti-nociceptive interleukins in botulinum toxin A-induced analgesia in a rat model of neuropathic pain. **Eur J Pharmacol**. v. 791, p. 377-388, Nov. 2016.
21. BREMER, P. T.; HIXON, M. S.; JANDA, K. D. Benzoquinones as inhibitors of botulinum neurotoxin serotype A. **Bioorg Med Chem**, v. 22, n. 15, p. 3971-81, Aug 2014. doi: 10.1016/j.bmc.2014.06.004. Epub 2014 Jun 16.
22. DHAKED, R. K. Botulinum toxin: bioweapon & magic drug. **The Indian Journal of Medical Research**. v. 132, n. 5, p. 489-503, 2010.
23. SIMPSON, LL. et al. The role of zinc binding in the biological activity of botulinum toxin. **J Biol Chem**, v. 20, n. 29, p 27034-41, Jul. 2001.



24. KALANDAKANOND, S.; COFFIELD, J. A. Cleavage of SNAP-25 by botulinum toxin type A requires receptor-mediated endocytosis, pH-dependent translocation, and zinc. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 296, n. 3, p. 980-6, Mar. 2001.
25. PARK, J. G. Serotype-selective, small-molecule inhibitors of the zinc endopeptidase of botulinum neurotoxin serotype A. **Bioorg Med Chem**, v. 14, n. 2, p. 395-408, Jan. 2006.
26. DRESSLER, D. Five-year experience with incobotulinumtoxinA (Xeomin®): the first botulinum toxin drug free of complexing proteins. **Eur J Neurol**, v. 19, n. 3, p. 385-9, Mar. 2012. doi: 10.1111/j.1468-1331.2011.03559.x.
27. INUI, K. Toxic and nontoxic components of botulinum neurotoxin complex are evolved from a common ancestral zinc protein. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 419, n. 3, p. 500-4, Mar. 2012.
28. MATTE, J. et al. Intestinal fate of dietary zinc and copper: Postprandial net fluxes of these trace elements in portal vein of pigs. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 44, p. 65-70, Jun 2017.
29. KOSHY, J. C. et al. Effect of dietary zinc and phytase supplementation on botulinum toxin treatments. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 11, n. 4, p. 507-512, Apr. 2012.
30. BAGHERANI, N.; YAGHOOBI, R.; OMIDIAN, M. Hypothesis: zinc can be effective in treatment of vitiligo. **Indian Journal of Dermatology**, v. 56, n. 5, p. 480-484, Sept./Oct. 2011.
31. SPOSITO, M. M. M. Toxina botulínica do Tipo A: mecanismo de ação. **Acta Fisiátrica**, v. 16, n. 1, p. 25-37, mar. 2009.
32. HERMAN J, ROST-ROSZKOWSKA M, SKOTNICKA-GRACA U. Skin care during the menopause period: noninvasive procedures of beauty studies. **Postepy Dermatol Alergol**, v. 30, n. 6, p. 388-95, Dec. 2013.
33. SUNDARAM, H. 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, Mar. 2016.
34. MERZ AESTHETICS. **Upper face**. 2016. Disponível em: <<https://www.merzaesthetics.com/products/scales/upper-face/>>. Acesso em: 21 jun. 2016.
35. CARRUTHERS, A. et al. A validated grading scale for forehead lines. **Dermatologic Surgery**, v. 34, suppl. 2, p. S155-160, Nov. 2008.

36. HEXSEL, D. Quality of life and satisfaction of patients after full-face injections of abobotulinum toxin type A: a randomized, phase IV clinical trial. **J Drugs Dermatol**, v. 12, n. 12, p. 1363-7, Dec. 2013.
37. BOWYER, L. A critical review of cosmetic treatment outcomes in body dysmorphic disorder. **Body Image**, v. 19, p. 1-8, Dec., 2016. doi: 10.1016/j.bodyim.2016.07.001.
38. RAPPL, T. et al. Onset and duration of effect of incobotulinumtoxinA, onabotulinumtoxinA, and abobotulinumtoxinA in the treatment of glabellar frown lines: a randomized, double-blind study. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 24, n. 6, p. 211-9, Sept. 2013.
39. CHEN, J. J.; DASHTIPOUR, K. Abo-, inco-, ona-, and rima-botulinum toxins in clinical therapy: a primer. **Pharmacotherapy**, v. 33, n. 3, p. 304-18, Mar. 2013.
40. CARRUTHERS, A. Repeated OnabotulinumtoxinA treatment of glabellar lines at rest over three treatment cycles. **Dermatol Surg**, v. 42, n. 9, p. 1094-101, Sep. 2016.
41. YEILDING, R. H.; FEZZA, J. P. A Prospective, split-face, randomized, double-blind study comparing OnabotulinumtoxinA to IncobotulinumtoxinA for upper face wrinkles. **Plast Reconstr Surg**. v. 135, n. 5, p. 1328-35, May 2015.
42. SHOME, D. et al. Botulinum toxin A: is it really that fragile a molecule? **Dermatologic Surgery**, v. 36, suppl. 4, p. 2106-2110, Dec. 2010.
43. MANRÍQUEZ, J. J. et al. Wrinkles. **BMJ Clin Evid**. Dec 2014.

## ANEXO A – PUBLICAÇÃO DE ARTIGO (QUALIS B3 - INTERDISCIPLINAR)

VOLUME 12 - Nº 142 - Outubro/ 2017  
ISSN - 1809-3957

### Área: Interdisciplinar

9-5	<p><b>ESTRATÉGIAS DE ENSINO-APRENDIZAGEM PARA O DESENVOLVIMENTO DA SUSTENTABILIDADE NA ESCOLA</b></p> <p><b>STRATEGIES OF TEACHING-LEARNING FOR SUSTAINABILITY DEVELOPMENT IN SCHOOL</b></p> <p>Jasqueson Alves De Oliveira</p>
9-5	<p><b>INCOBOTULINUMTOXINA A DILUÍDA EM SOLUÇÃO DE GLUCONATO DE ZINCO PARA RUGAS FACIAIS: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO DE UM MEDICAMENTO CADA DIA MAIS INTERDISCIPLINAR</b></p> <p><b>INCOBOTULINUMTOXIN A DILUTED IN ZINC GLUCONATE SOLUTION FOR FACIAL ROOTS: RANDOMIZED CLINICAL TESTING OF A MEDICINAL PRODUCT EACH DAY MORE INTERDISCIPLINARY</b></p> <p>Leonardo Oliveira Ferreira; Denise Cantarelli Machado</p>



**INCOBOTULINUMTOXINA A DILUÍDA EM SOLUÇÃO DE GLUCONATO DE ZINCO PARA RUGAS FACIAIS: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO DE UM MEDICAMENTO CADA DIA MAIS INTERDISCIPLINAR**

***INCOBOTULINUMTOXIN A DILUTED IN ZINC GLUCONATE SOLUTION FOR FACIAL ROOTS: RANDOMIZED CLINICAL TESTING OF A MEDICINAL PRODUCT EACH DAY MORE INTERDISCIPLINARY***

LEONARDO OLIVEIRA FERREIRA ; DENISE CANTARELLI MACHADO<sup>2</sup>  
1, 2 – PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL (PUCRS)  
*leonardoferreira@doctor.com; dcm@puers.br*

*Resumo - Este estudo propôs analisar se a aplicação de gluconato de zinco combinado à toxina botulínica, pode afetar, em grupos de diferentes características clínicas, a eficácia, duração e influenciar na qualidade de vida de pacientes tratados. Em um estudo piloto duplo-cego, examinamos uma amostra composta por 48 participantes do sexo feminino, acima de 50 anos de idade e dividida em um grupo submetido à aplicação de toxina botulínica diluída com solução de Gluconato de Zinco 0,02% e o outro submetido à aplicação de toxina botulínica diluída em solução Fisiológica 0,9%. O resultado do teste qui-quadrado indicou que não existe associação entre raça, etilismo, tabagismo e uso de protetor solar com os grupos em estudo. Para as variáveis idade e quantidade ingesta de zinco semanal o resultado do teste Manny-Whitney indicou que não existe diferença significativa entre os grupos. Para verificar o tempo de duração do efeito relaxante no músculo frontal, foi considerada a visão da paciente e do médico. Em nenhum momento ocorreu diferença significativa da duração do efeito entre os grupos. Este estudo sugere que os hábitos de vida das pacientes não influenciam no resultado final do procedimento, e que a duração do efeito não está ligada à diluição do produto com substância diferente da diluição clássica com solução fisiológica.*

**Palavras-chave:** Zinco. Toxinas Botulínicas Tipo A. Músculos Faciais. Interações de Medicamentos.

*Abstract - This study provides an application of zinc gluconate combined with botulinum toxin, which can affect, in groups of different clinical characteristics, an efficacy, duration and influence on the quality of life of treated patients. In a double-blind pilot study, a sample composed of 48 female participants, over 50 years of age and divided into a group submitted to the application of botulinum toxin diluted with 0.02% Zinc Gluconate solution and the other submitted in the application of botulinum toxin diluted in physiological solution 0.9%. The result of the chi-square test indicated that there is no association between race, ethnicity, smoking and use of sunscreen with the groups under study. For as variables age and amount weekly zinc intake the Manny-Whitney test result indicated that there is no significant difference between the groups. To check the duration of the relaxing effect on the frontal muscle, have a look at the patient and the doctor. At no time is there a significant difference in duration of effect between groups. This study suggests that patient life habits do not influence the final outcome of the procedure and that the duration of the effect is not linked to the dilution of the product with a substance other than the classical dilution with physiological solution.*

**Keywords:** Zinc. Botulinum Toxins Type A. Facial Muscles. Drug Interactions.

I. INTRODUÇÃO

O uso de toxina botulínica como agente terapêutico foi iniciado por um oftalmologista há cerca de 30 anos para uso em estrabismo e blefarospasmo. Nas décadas seguintes, a toxina botulínica tornou-se o padrão de cuidados para uma série de transtornos do movimento e distúrbios do sistema nervoso autônomo que podem ser tratados com esta opção, e a região da cabeça e pescoço é um foco interdisciplinar neste campo. (POULAIN *et al.*, 2013).

Existem quatro formulações comercialmente disponíveis de toxina botulínica: onabotulinumtoxina, incobotulinumtoxina, abobotulinumtoxina e rimabotulinumtoxina, destas, apenas a última não está disponível no Brasil. Cada formulação tem propriedades únicas, e os neuromoduladores não são intercambiáveis. A Incobotulinumtoxina A é a única que mantém sua estabilidade no armazenamento à temperatura ambiente e pode ser armazenada à essa condição por 36 meses antes da reconstituição. A Incobotulinumtoxina A (Xeomin, Merz Pharmaceuticals GmbH, Frankfurt, Alemanha) é a mais nova neurotoxina tipo A e sua purificação envolve a separação da neurotoxina das proteínas complexantes, produzindo um produto final de 150 kDa liofilizado contendo apenas o ingrediente ativo, 1 mg de albumina humana e 4,7 mg de sacarose. É, portanto, teoricamente menos imunogênico. Tradicionalmente, a reconstituição de todas elas é feita com solução salina bacteriostática, que reduz o desconforto durante a aplicação (GIORDANO; MATARASSO; OZOG, 2017).

A toxina botulínica tipo A inibe a liberação de acetilcolina nas sinapses e atua como um neurotransmissor para a inervação dos músculos (FREVERT, 2015). É uma endoprotease dependente do zinco que age sobre as células vulneráveis para separar os polipeptídeos, que são essenciais para a exocitose. Quando o cátion Zinco (Zn<sup>2+</sup>) exógeno é adicionado à toxina que foi removida por quelantes solúveis, a molécula reveste o cátion e recupera a atividade de bloqueio catalítico e neuromuscular. O Zn<sup>2+</sup> exógeno pode restaurar a atividade da toxina, quer quando a toxina é livre em solução no exterior da célula ou quando internalizada e está no citossol (SIMPSON, 2001).

Os níveis de zinco podem ser aumentados por meio da ingestão de alimentos que contém esse metal, entretanto, sua deficiência não é incomum considerando que os próprios alimentos ricos em zinco podem ter sua absorção bloqueada pelos fitatos, e estes possuem capacidade de impedir a absorção de zinco na parede intestinal (MATTE *et al.*, 2017).

Por serem proteases dependentes de zinco, surgiu a questão de saber se a concentração de zinco intracelular poderia influenciar na ação da toxina. É difícil encontrar informações claras sobre este ponto (PATIL *et al.*, 2016).

Até o momento, não há comparação publicada dos efeitos da toxina botulínica reconstituída com solução fisiológica de gluconato de zinco em comparação com a solução salina.

## II. OBJETIVO

Investigar o efeito e duração do uso da toxina botulínica tipo A diluída em solução de gluconato de zinco 0,02% comparando com a toxina botulínica tipo A na diluição com solução fisiológica 0,9% aplicado no músculo frontal de mulheres acima de 50 anos de idade.

## III. MÉTODOS

O estudo foi realizado após apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Esta pesquisa segue os princípios éticos estabelecidos de acordo com o capítulo XIV, art. 94-99, das Normas de Pesquisa em Saúde da PUCRS e as recomendações éticas conforme a Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

Trata-se de um estudo prospectivo, duplo-cego, sendo que tanto os participantes, como o pesquisador, não sabiam a ordem em que as substâncias seriam administradas. A amostra foi composta por 48 participantes do sexo feminino, acima de 50 anos de idade e dividida em dois grupos. As participantes foram submetidas a aplicação de toxina botulínica no terço superior da face, especificamente no músculo frontal, sendo que em 24 participantes a diluição da toxina botulínica foi com solução de Gluconato de Zinco 0,02% (Grupo Caso) e 24 participantes com diluição da toxina botulínica em solução Fisiológica 0,9% (Grupo Controle). Todas elas receberam doses que variam de 8 a 25 unidades no músculo frontal, conforme recomendações de aplicação nesta região. As participantes foram recrutadas e tratadas na clínica privada do FAPECS - Instituto de Pesquisa em Ciências da Saúde EPP, localizada na região metropolitana de Vitória, no Estado do Espírito Santo. O examinador e os participantes foram cegados, isto é, não sabiam qual o tratamento que estariam recebendo. Um médico devidamente qualificado realizou o preparo das diluições da toxina botulínica tipo A para evitar interferência na análise pelo examinador. Por meio de análises dietéticas, verificamos a quantidade de ingestão semanal de zinco que cada paciente ingeria, à fim de comparar se esta variável poderia influenciar no resultado. Após a concordância em participar da pesquisa, todos os pacientes responderam ao questionário com questões sociodemográficas e saúde, em que a percepção do paciente de sua qualidade de vida foi avaliada por meio do questionário validado World Health Organization Quality of Life (WHOQOL)-Bref antes e após a aplicação.

O tamanho da amostra foi de 48 indivíduos, e foi calculado com a utilização do programa G-Power para verificar a associação entre variáveis. Para tanto utilizou-se um efeito de 0,5, um poder do teste de 80% e um nível de confiança de 95%.

Para caracterizar os grupos foram utilizados métodos da estatística descritiva como frequências e percentuais para variáveis categóricas e mediana, mínimo e máximo para as quantitativas.

A verificação da homogeneidade dos grupos em relação as variáveis clínicas foram realizadas pelo teste qui-quadrado (etilismo, tabagismo, uso de protetor solar e raça branca) e Manny-Whitney (idade e ingestão de zinco).

A concordância entre o médico e cada paciente foi analisada pelo índice de concordância Kappa afim de garantir a fidedignidade dos resultados.

Os resultados obtidos pela escala de Merz-Aesthetics de linhas frontais foram analisados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon para comparar as linhas frontais antes e depois da aplicação. A comparação entre os grupos, toxina botulínica diluída em gluconato de zinco 0,02% e toxina botulínica diluída em cloreto de sódio 0,9% foi realizado pelo teste de Mann-Whitney. A escolha pelo teste não paramétrico ocorreu devido as variáveis não apresentarem distribuição normal (Kolmogorov-Smirnov  $P > 0,05$ ). Os diversos momentos foram comparados pelo teste Kruskal-Wallis.

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o programa estatístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 23 e todo estudo inferencial foi realizado considerando um nível de significância de 5%.

## IV. RESULTADOS

A Tabela 1 compara as características clínicas das participantes que receberam a toxina botulínica diluída em solução de gluconato de zinco 0,02% com as que receberam a toxina botulínica na diluição com cloreto de sódio 0,9%. O resultado do teste qui-quadrado indicou que não existe associação entre raça, etilismo, tabagismo e uso de protetor solar com os grupos em estudo. Para as variáveis idade e quantidade ingerida de zinco semanal o resultado do teste Manny-Whitney indicou que não existe diferença significativa entre os grupos, valor- $P > 0,05$ . Os dois grupos são similares em relação as características clínicas.

Tabela 1 - Comparação das características clínicas das pacientes entre os grupos

Característica	toxina botulínica	toxina botulínica gluconato de zinco	+ p
	Nº de pacientes (%)		
Etilismo	12 (50,0%)	14 (58,3%)	0,772
Tabagismo	01 (4,2%)	04 (16,7%)	0,348
Uso diário de protetor solar	14 (58,3%)	12 (50,0%)	0,562
Raça Branca	17 (70,8%)	11 (45,8%)	0,079
	Mediana (Min-Max)		
Idade (anos)	58 (50-70)	57 (50-70)	0,642
Quantidade ingerida de Zinco semanal (mg/sem)	61 (33-109)	66 (29-115)	0,599

Fonte: O autor.

A comparação de variáveis prognósticas como capacidade em aceitar a aparência física, satisfação consigo mesma e satisfação pessoal foram analisadas antes e após aplicação da toxina botulínica (Tabela 2), sendo que o resultado do teste indicou que não existe diferença significativa das variáveis antes e após aplicação ( $P^a > 0,05$ ). Também foi realizada a comparação das variáveis entre os grupos em cada

momento (antes e após), o resultado desta comparação também não indicou diferença significativa ( $P^b > 0,05$ ).

Tabela 2 - Comparação de variáveis prognósticas antes e após aplicação da toxina e comparação entre os grupos em cada momento

Prognóstico	Momento	Mediana (min-max)	$P^a$	Toxina botulínica	Toxina botulínica + gluconato de zinco	$P^b$
				Mediana (min-max)	Mediana (min-max)	
Capacidade em aceitar aparência física	Antes	3 (1-5)	1,000	3 (2-5)	4 (1-5)	0,355
	Após	3 (1-5)		3 (2-5)	4 (1-5)	
Satisfação consigo mesma	Antes	4 (1-5)	1,000	4 (2-5)	4 (1-5)	0,407
	Após	4 (1-5)		4 (2-5)	4 (1-5)	
Satisfação com a vida sexual	Antes	3 (1-5)	1,000	3 (1-5)	3 (1-5)	0,394
	Após	3 (1-5)		3 (1-5)	3 (1-5)	

min = mínimo; max = máximo;  $P^a$  = comparação antes e pós;  $P^b$  = comparação entre grupos.

Fonte: O autor.

Para verificar o tempo de duração do efeito relaxante do músculo frontal na aplicação de toxina botulínica solubilizada com cloreto de sódio 0,9% e com o gluconato de zinco 0,02%, foi considerada a visão da paciente e do médico. O resultado obtido pelo índice de concordância Kappa (Tabela 3), indicou que a concordância entre eles é significativa, valor- $P < 0,05$ , assim foi feita a opção de verificar diferenças entre os grupos somente na visão do médico.

Tabela 3 - Concordância entre paciente e médico

Médico versus pacientes		Kappa	P
Semana 0	Repouso	0,498	0,000
	Movimento	0,252	0,008
2ª	Repouso	0,879	0,000
	Movimento	0,963	0,000
4ª	Repouso	0,84	0,000
	Movimento	0,885	0,000
14ª	Repouso	0,821	0,000
	Movimento	0,831	0,000

Fonte: O autor.

Em nenhum momento (do inicial à 14ª semana) ocorreu diferença significativa da duração do efeito entre os grupos ( $P^a > 0,05$ ) tanto para a observação realizada em repouso como em movimento, conforme a Tabela 4. Foi verificada diferença significativa entre os momentos tanto para as pacientes que receberam a toxina botulínica na diluição com cloreto de sódio 0,9% como para as receberam toxina botulínica diluída em solução de gluconato de zinco 0,02% ( $P^b < 0,000$ ) considerando movimento e repouso.

Tabela 4 - Comparação da duração do efeito relaxante do músculo frontal entre os momentos e entre os grupos em cada momento

Momento		Toxina botulínica	Toxina botulínica + gluconato de zinco	$P^a$
		Mediana (min-max)	Mediana (min-max)	
Semana 0		3 (1-4)	2 (1-4)	0,727
		0 (0-2)	0 (0-2)	
2ª	Repouso	1 (0-3)	1 (0-3)	0,859
		2 (0-3)	2 (0-3)	
14ª	$P^b$	0,000	0,000	0,695
		4 (2-4)	4 (2-4)	
Semana 0		4 (2-4)	4 (2-4)	0,289
		1 (0-3)	1 (0-2)	
2ª	Movimento	1 (0-3)	1 (0-4)	0,778
		3 (1-4)	3 (1-4)	
14ª	$P^b$	0,000	0,000	0,410

min = mínimo; max = máximo;  $P^a$  = comparação entre grupos;  $P^b$  = comparação entre os momentos.

Fonte: O autor.

Nas Tabelas 5 a 8 têm-se a comparação da duração do efeito dentro do grupo em relação a exposição a fatores como etilismo, tabagismo, uso de protetor solar e raça considerando repouso e movimento do músculo frontal.

O resultado mostrado na Tabela 5 indica que o grupo que usou toxina botulínica com diluição usual a duração do efeito não diferiu na presença do etilismo no repouso e no movimento ( $P^a > 0,05$ ) em nenhum dos momentos considerados. Já no grupo que usou toxina botulínica diluída em solução de gluconato de zinco ocorreu diferença significativa no momento inicial em repouso e na quarta semana, observa-se a mediana maior no grupo de pessoas que usam álcool. Quando observada a duração em movimento tem-se uma diferença significativa na segunda semana,  $P^a < 0,05$ .

Tabela 5 - Comparação da duração do efeito em relação a presença de etilismo

Momento	Etilismo - repouso	Toxina botulínica	Toxina botulínica + gluconato de zinco	$P^b$
		Mediana (min-max)	Mediana (min-max)	
Semana 0	Não	3 (1-4)	2 (1-3)	0,042
	Sim	3 (1-3)	3 (1-4)	
2ª	Não	0 (0-2)	0 (0-2)	0,212
	Sim	0 (0-1)	1 (0-1)	
4ª	Não	1 (0-2)	0 (0-2)	0,031
	Sim	1 (0-3)	1 (0-3)	
14ª	Não	2 (0-3)	2 (0-3)	0,192
	Sim	2 (1-3)	2 (1-3)	
<b>Etilismo - movimento</b>				
Inicial	Não	4 (3-4)	4 (2-4)	0,371
	Sim	4 (2-4)	4 (2-4)	
2ª	Não	1 (0-3)	0 (0-1)	0,005
	Sim	1 (0-2)	1 (0-2)	
4ª	Não	1 (0-3)	1 (0-2)	0,108
	Sim	2 (1-3)	2 (0-4)	
14ª	Não	3 (2-4)	2 (1-4)	0,096
	Sim	3 (1-4)	3 (1-4)	

min = mínimo; max = máximo;  $P^a$  = comparação entre grupos;  $P^b$  = comparação entre os momentos.

Fonte: O autor.

Na Tabela 6 foi realizada a comparação da duração do efeito dentro do grupo em relação a exposição ao tabagismo. Não foram detectadas diferenças na duração do efeito para nenhum grupo e em nenhum momento, tanto no repouso como movimento ( $P^a$  e  $P^b > 0,05$ ).

Tabela 6 - Comparação da duração do efeito em relação a presença de tabagismo

Momento	Tabagismo - repouso	Toxina botulínica	Toxina botulínica + gluconato de zinco	$P^b$
		Mediana (min-max)	Mediana (min-max)	
Semana 0	Não	3 (1-4)	3 (1-4)	0,157
	Sim	3 (3-3)	2 (1-2)	
2ª	Não	0 (0-2)	0 (0-2)	0,525
	Sim	1 (1-1)	0 (0-1)	
4ª	Não	1 (0-2)	1 (0-3)	0,794
	Sim	3 (3-3)	1 (0-3)	
14ª	Não	2 (0-3)	2 (0-3)	0,970
	Sim	3 (3-3)	2 (1-3)	
<b>Tabagismo - movimento</b>				
Semana 0	Não	4 (2-4)	4 (2-4)	0,135
	Sim	4 (4-4)	3 (2-4)	
2ª	Não	1 (0-3)	1 (0-2)	0,737
	Sim	1 (1-1)	1 (0-1)	
4ª	Não	1 (0-3)	1 (0-4)	0,309
	Sim	3 (3-3)	1 (0-3)	
14ª	Não	3 (1-4)	3 (1-4)	0,682
	Sim	4 (4-4)	2 (1-4)	

min = mínimo; max = máximo;  $P^a$  = comparação entre grupos;  $P^b$  = comparação entre os momentos.

Fonte: O autor.



Na *Tabela 7* foi realizada a comparação da duração do efeito dentro do grupo em relação ao uso de protetor solar. Não foram detectadas diferenças na duração do efeito para nenhum grupo e em nenhum momento, tanto no repouso como movimento ( $P^a$  e  $P^b > 0,05$ ).

Tabela 7 - Comparação da duração do efeito em relação ao uso de protetor solar

Tempo	Uso de protetor solar	Toxina botulínica		Toxina botulínica + gluconato de zinco		
		Mediana (min-max)	$P^a$	Mediana (min-max)	$P^b$	
Semana 0	Repouso	Não	3 (2-4)	0,341	3 (2-4)	0,219
		Sim	3 (1-3)			
	2 <sup>a</sup>	Não	0 (0-2)	0,585	1 (0-2)	0,443
		Sim	0 (0-1)			
	4 <sup>a</sup>	Não	1 (0-3)	0,437	1 (0-3)	0,630
		Sim	1 (0-2)			
14 <sup>a</sup>	Não	2 (0-3)	0,437	2 (0-3)	0,378	
	Sim	2 (0-3)				
Semana 0	Movimento	Não	4 (2-4)	0,752	4 (3-4)	0,143
		Sim	4 (2-4)			
	2 <sup>a</sup>	Não	1 (0-3)	0,437	1 (0-1)	0,843
		Sim	1 (0-1)			
	4 <sup>a</sup>	Não	2 (1-3)	0,437	2 (1-3)	0,242
		Sim	1 (0-3)			
14 <sup>a</sup>	Não	3 (2-4)	0,371	3 (1-4)	0,347	
	Sim	3 (1-4)				

min = mínimo; max = máximo;  $P^a$  = comparação entre grupos;  $P^b$  = comparação entre os momentos.

Fonte: O autor.

A comparação realizada na *Tabela 8* indicou que não foram detectadas diferenças na duração do efeito  $P^a$  e  $P^b > 0,05$ , ou seja, ser da raça branca (fototipo 1, 2 e 3) não interfere significativamente na duração do efeito tanto no grupo que fez aplicação de toxina botulínica solubilizada com cloreto de sódio como com gluconato de zinco.

Tabela 8 - Comparação da duração do efeito na raça

Momento	Raça - repouso	Toxina botulínica		Toxina botulínica + gluconato de zinco		
		Mediana (min-max)	$P^a$	Mediana (min-max)	$P^b$	
Semana 0	Branca	2 (1-4)	0,576	2 (1-4)	0,865	
		3 (1-3)				
	2 <sup>a</sup>	Branca	0 (0-2)	0,260	0 (0-1)	0,252
		Não Branca	1 (0-1)			
	4 <sup>a</sup>	Branca	1 (0-3)	0,147	1 (0-3)	0,649
		Não Branca	1 (1-3)			
14 <sup>a</sup>	Branca	2 (0-3)	0,087	2 (0-3)	0,303	
	Não Branca	2 (1-3)				
Semana 0	Movimento	Branca	0,804	4 (2-4)	0,691	
		Não Branca				4 (2-4)
	2 <sup>a</sup>	Branca	0,951	0 (0-1)	0 (0-1)	0,277
		Não Branca				
	4 <sup>a</sup>	Branca	0,494	1 (0-3)	1 (0-3)	0,865
		Não Branca				
14 <sup>a</sup>	Branca	0,951	2 (1-4)	1 (0-4)	0,649	
	Não Branca					3 (1-4)

min = mínimo; max = máximo;  $P^a$  = comparação entre grupos;  $P^b$  = comparação entre os momentos.

Fonte: O autor.

## V. DISCUSSÃO

Este estudo foi desenvolvido a partir da obtenção das características de um tipo de toxina botulínica tipo A aplicadas em 48 mulheres. Por meio do emprego de metodologias descritas na literatura e adaptadas as condições de cada paciente, foi possível observar se há diferenças na ação da incobotulinumtoxina tipo A diluída em solução de gluconato de zinco no tratamento de rugas

frontais de mulheres acima de 50 anos de idade em quantidades suficientes para o prosseguimento das análises. As pacientes foram categorizadas conforme os critérios estabelecidos por meio de uma escala validada (ASSAD *et al.*, 2016; HALLET, 2015) de linhas frontais em repouso e em movimento. Tanto o grupo que recebeu a toxina botulínica diluída em solução de gluconato de zinco 0,02% quanto o que recebeu a toxina botulínica na diluição com cloreto de sódio 0,9% possuíam características clínicas similares, conforme resultado do teste qui-quadrado, que demonstrou que não existe associação entre raça, etilismo, tabagismo e uso de protetor solar com os dois grupos em estudo. Para as variáveis idade e quantidade ingesta de zinco semanal o resultado do teste Mann-Whitney indicou que não existe diferença significativa entre os grupos, valor- $P > 0,05$ . Estas observações também foram descritas em outro trabalho (KOSHY *et al.*, 2012). Embora a toxina botulínica do tipo A seja efetiva e segura para reduzir as rugas faciais, poucos estudos avaliaram a qualidade de vida dos pacientes após o tratamento (MERZ AESTHETICS, 2016) e o resultado desta comparação em nosso estudo, não indicou diferença significativa, divergindo do único trabalho encontrado 24 que utilizou testes de qualidade vida em pacientes submetidos a aplicações estéticas de toxina botulínica. Este resultado é importante pois é alta proporção de indivíduos que são submetidos a tratamentos cosméticos na tentativa de "corrigir" defeitos percebidos na sua aparência física. Uma literatura emergente (CARRUTHERS *et al.*, 2008) sugere que a maioria dos indivíduos especialmente com transtorno dismórfico corporal tem resultados ruins após intervenções cosméticas; estudos longitudinais cuidadosamente conduzidos com populações de pacientes bem caracterizadas são necessários para melhor avaliar essa questão. Antes de verificar o tempo de duração do efeito relaxante do músculo frontal na aplicação de toxina botulínica solubilizada com cloreto de sódio 0,9% e com o gluconato de zinco 0,02%, foram consideradas as visões individualizadas das pacientes e do médico examinador com relação à que grau de rugas das linhas frontais (SHOME *et al.*, 2010) que cada participante se encontrava anteriormente ao tratamento. O resultado indicou que houve concordância entre as pacientes e o médico, ou seja, quando a participante se olhava para o espelho e comparava com a escala das linhas frontais o médico também encontrou resultados semelhantes. Em um outro estudo (BOWYER *et al.*, 2016) que também utilizou a mesma escala de linhas frontais para verificar a duração de três tipos de toxina botulínica tipo A em 180 pacientes (incobotulinumtoxina A, onabotulinumtoxina A, e abobotulinumtoxina A) considerou somente a opinião das participantes e não comparou o ponto de vista do médico. O início do efeito do tratamento foi definido como o décimo quarto dia (ou segunda semana) após a execução da aplicação, visto que o efeito da toxina botulínica, segundo a literatura (MANRÍQUEZ *et al.*, 2014) se completa em duas semanas, tempo suficiente para que o observador e paciente constatassem a diminuição na atividade do músculo frontal em comparação com fotografias de duas semanas antes do tratamento. A apuração ainda contemplou o vigésimo oitavo dia e por fim o nonagésimo oitavo dia (ou 14a semana) após a aplicação. Todos os pacientes foram avaliados com o músculo frontal em repouso e em movimento. No grupo de pacientes que receberam incobotulinumtoxina A solubilizada em cloreto de sódio, em 14 semanas da

aplicação houve redução de 66% dos efeitos nos pacientes com as rugas do frontal em repouso. Já os pacientes que foram solicitados que movimentassem o músculo frontal (movimento) houve redução de 75% do efeito desejado com 98 dias da aplicação. As rugas em movimento parecem tender a retornar ao momento inicial mais precocemente se comparado às rugas em repouso. Os resultados deste estudo são consistentes com pesquisas anteriores (MERZ AESTHETICS, 2016) que demonstram que o tratamento intramuscular com toxina botulínica tipo A melhora a aparência de linhas em repouso e qualidade geral da pele. Uma possível explicação para esse efeito é que o enfraquecimento muscular elimina a dobra repetitiva da pele e alivia o estresse crônico aplicado à pele sobreposta, o que faz com que a elastina e o colágeno se fortaleçam nesses locais ao longo do tempo. No grupo de pacientes que receberam incobotulinumtoxina A solubilizada em gluconato de zinco, após 14 semanas da aplicação houve redução de 100% dos efeitos nos pacientes com as rugas do frontal em repouso. Já os pacientes que foram solicitados que movimentassem o músculo frontal também houve redução de 75% do efeito desejado com 98 dias da aplicação, corroborando com um estudo (MERZ AESTHETICS, 2016) que comparou duas apresentações de toxina botulínica tipo A (onabotulinum toxina A e incobotulinum toxina A). Existem muitos mitos que envolvem o manejo da toxina botulínica, muitos médicos a utilizam somente se forem reconstituídas no dia da aplicação, porém, um estudo (ASSAD *et al.*, 2016) confirmou que a toxina botulínica tipo A é uma molécula extremamente estável, e a agitação vigorosa não prejudica sua potência, mesmo após 6 semanas de diluída. Os resultados do presente estudo também mostraram que os indivíduos que consomem mais alimentos ricos em zinco, independente se foram tratados com incobotulinumtoxina A diluída em cloreto de sódio ou gluconato de zinco, não tiveram efeito mais duradouro. Esta variante não foi avaliada pelo autor que descreveu o uso oral do zinco para aumentar a duração dos efeitos da toxina botulínica (PATIL *et al.*, 2016). Este estudo avaliou se alguns fatores como etilismo, tabagismo, uso de protetor solar e raça poderiam influenciar nos resultados, considerando as rugas frontais em repouso e movimento. Sabe-se que as rugas também estão associadas ao envelhecimento, estado hormonal, tabagismo e doenças intercorrentes (KOSHY *et al.*, 2012) e que há ligação entre rugas periorais e tabagismo e que fumar é um fator de risco para o envelhecimento prematuro da pele. Estudos propuseram que a exposição ao cigarro aumenta a atividade da metaloproteinase da matriz-1 e 3 e diminui a produção de pro-colágeno na pele, possivelmente pela produção de radicais livres induzidos pelo tabaco (FREVERT, 2015) entretanto, este estudo não demonstrou sucesso terapêutico ou duração inferior nos pacientes tabagistas atuais que receberam aplicações de toxina botulínica com as duas diluições.

## VI. CONCLUSÃO

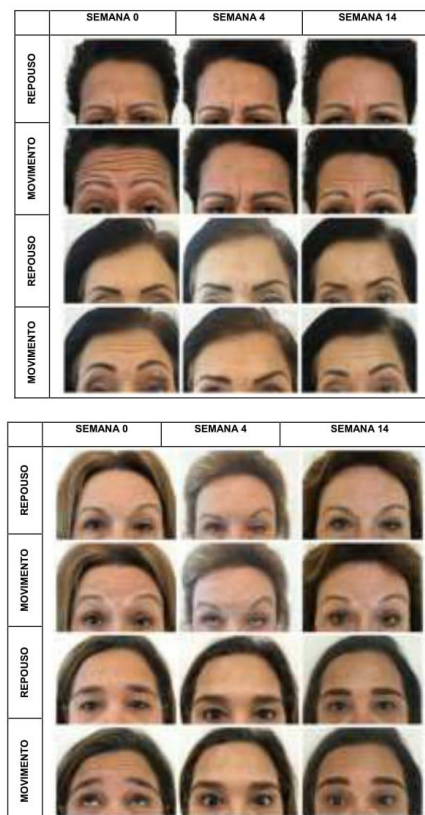
Com base neste estudo, verifica-se que diversos pesquisadores estão empenhados na geração de conhecimento, no sentido de descobrir novas utilizações da toxina botulínica nas diferentes áreas da medicina.

Os dados identificam que os hábitos de vida dos pacientes não influenciam no resultado final do

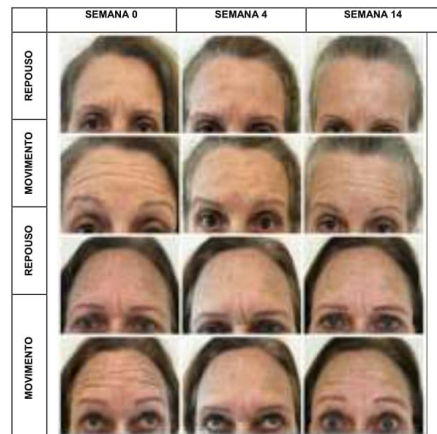
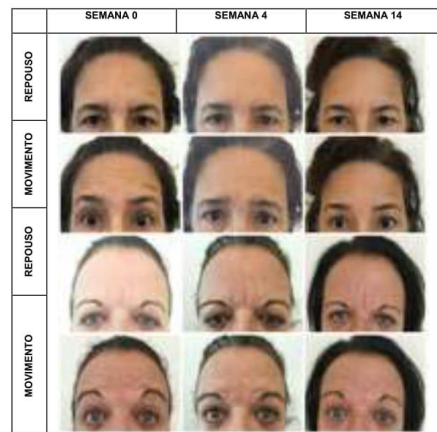
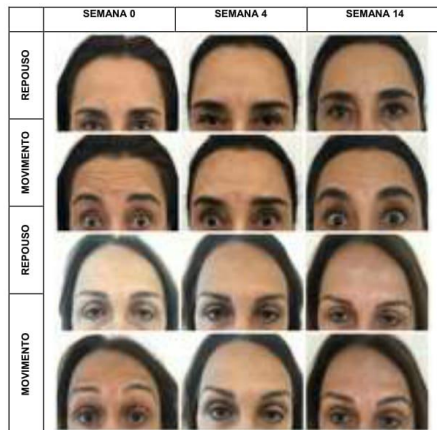
procedimento, e que a duração do efeito não está ligada à diluição do produto com substância diferente da diluição clássica com solução fisiológica. Contudo, o estudo demonstrou que os pacientes que ingerem bebida alcoólica que utilizaram a toxina botulínica diluída em gluconato de zinco 0,02% parecem ter uma melhor eficácia. Os resultados apresentados neste estudo não mostram melhorias na qualidade de vida dos pacientes durante o pico de ação do tratamento com BoNTA, em relação ao aspecto físico. Outra descoberta foi a de que o hábito de não usar protetor solar não influenciou no efeito da duração da toxina botulínica. Pacientes com fototipos baixos ou elevados possuem a mesma duração de efeito da toxina botulínica.

Pela segurança do medicamento e pela necessidade de estudar meios que modiquem desfechos superiores com a toxina botulínica, concluímos que é possível realizar estudos com esta formulação de gluconato de zinco entre as demais apresentações de toxina botulínica tipo A com toda segurança e que a padronização do diluente mais eficaz deve ser atingida, objetivando a elaboração de protocolos voltadas a maximizar os resultados, visto que a toxina botulínica é um medicamento ainda com elevado custo e alta demanda entre as mais diversas patologias e não só a estética.

Fotos dos pacientes antes, durante e após a aplicação







## VII. REFERÊNCIAS

ASSAD, S. *et al.* Novel and conservative approaches towards effective management of plantar fasciitis. **Cureus**, v. 8, n. 12, p. e913, Dec. 2016.

BOWYER, L. *et al.* A critical review of cosmetic treatment outcomes in body dysmorphic disorder. **Body Image**, v. 19, p. 1-8, Dec. 2016.

CARRUTHERS, A. *et al.* A validated grading scale for forehead lines. **Dermatologic Surgery**, v. 34, suppl. 2, p. S155-160, Nov. 2008.

FREVERT, J. Pharmaceutical, biological, and clinical properties of botulinum neurotoxin type A products. **Drugs in R&D**, v. 15, n. 1, p. 1-9, Mar. 2015.

GIORDANO, CN; MATARASSO, SL, OZOG, DM. Injectable and topical neurotoxins in dermatology: Basic science, anatomy, and therapeutic agents. **J Am Acad Dermatol**, v. 76, n. 6, p. 1013-1024, Jun 2017.

HALLETT, M. Explanation of timing of botulinum neurotoxin effects, onset and duration, and clinical ways of influencing them. **Toxicon**, v. 107, pt. A, p. 64-67, Dec. 2015.

MATTE, J. *et al.* Intestinal fate of dietary zinc and copper: Postprandial net fluxes of these trace elements in portal vein of pigs. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 44, p. 65-70, Jun 2017.

KOSHY, J. C. *et al.* Effect of dietary zinc and phytase supplementation on botulinum toxin treatments. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 11, n. 4, p. 507-512, Apr. 2012.

MANRÍQUEZ, J. J. *et al.* **Wrinkles**. *BMJ Clin Evid*, p. 1711-1748. Dec. 2014.

MERZ AESTHETICS. **Upper face**. 2016. Disponível em: <<https://www.merzaesthetics.com/products/scales/upper-face/>>. Acesso em: 21 jun. 2016.

PATIL, S. Botulinum toxin: pharmacology and therapeutic roles in pain states. **Current Pain and Headache Reports**, v. 20, n. 3, Mar. 2016.

POULAIN, B. *et al.* Clinical equivalence of conventional OnabotulinumtoxinA (900 KDa) and IncobotulinumtoxinA (neurotoxin free from complexing proteins - 150 KDa): 2012 multidisciplinary French consensus in aesthetics. **J Drugs Dermatology**, v. 12, n. 12, p. 1434-46, Dec. 2013.

SHOME, D. *et al.* Botulinum toxin A: is it really that fragile a molecule? **Dermatologic Surgery**, v. 36, suppl. 4, p. 2106-2110, Dec. 2010.

SIMPSON, LL. *et al.* The role of zinc binding in the biological activity of botulinum toxin. **J Biol Chem**, v. 20, n. 29, p 27034-41, Jul. 2001.

## VIII. COPYRIGHT

Todos os direitos reservados aos autores deste artigo.

Submetido em: 19/07/2017  
Aprovado em: 09/08/2017

## ANEXO B – DECLARAÇÃO DE ARTIGO SUBMETIDO (QUALIS B1)



Anais Brasileiros de Dermatologia (Brazilian  
Annals of Dermatology)

Av. Rio Branco, 39 17. and.  
Rio de Janeiro - RJ - Brasil  
CEP 20090-003 Tel./Fax: +55 21 2253-  
6747

Rio de Janeiro, domingo, 13 de agosto de 2017

Ilmo(a) Sr.(a)  
Prof(a), Dr(a) Leonardo Oliveira Ferreira

Referente ao código de fluxo: 7534  
Seção: Caso Clínico

Informamos que recebemos o manuscrito EDEMA PALPEBRAL SUPERIOR APÓS INJEÇÃO DE TOXINA BOTULÍNICA TIPO A: RELATO DE CASO e será enviado para apreciação dos revisores para possível publicação/participação na(o) Anais Brasileiros de Dermatologia (Brazilian Annals of Dermatology). Por favor, para qualquer comunicação futura sobre o referido manuscrito cite o número do código de fluxo apresentado acima.

**O(s) autor(es) declara(m) que o presente trabalho é original, sendo que o seu conteúdo não foi nem está sendo considerado para publicação em outro periódico, brasileiro ou do Exterior, seja no formato impresso ou eletrônico.**

Obrigado por submeter seu trabalho para a(o) Anais Brasileiros de Dermatologia (Brazilian Annals of Dermatology).

Atenciosamente,

Dr. Sinésio Talhari  
Editor Científico dos Anais Brasileiros de Dermatologia

Dr. Bernardo Gontijo  
Editor Associado

Dr. Silvio Alencar Marques  
Editor Associado

Dr. Everton Carlos S. do Vale  
Editor Associado

««« Favor não responder esta mensagem pois ela foi gerada automaticamente pelo SGP »»»

## ANEXO C – QUESTIONÁRIO VALIDADO WHOQOL-BREF

### ANÁLISE DO WHOQOL-BREF

O módulo WHOQOL-BREF é constituído de 26 perguntas (sendo a pergunta numero 1 e 2 sobre a qualidade de vida geral), as respostas seguem uma escala de Likert (de 1 a 5, quanto maior a pontuação melhor a qualidade de vida). Fora essas duas questões (1 e 2), o instrumento tem 24 facetas as quais compõem 4 domínios que são: FÍSICO, PSICOLÓGICO, RELAÇÕES SOCIAIS e MEIO AMBIENTE.

É UM POUCO DIFERENTE DO WHOQOL-OLD. NESTE INSTRUMENTO TERÁ QUE APARECER O RESULTADO SOMENTE EM MÉDIA (1 A 5) POR DOMÍNIO E POR FACETA.

ATENÇÃO!!!

NESTE INSTRUMENTO É NECESSÁRIO TAMBÉM RECODIFICAR O VALOR DAS QUESTÕES 3, 4, 26 (1=5) (2=4) (3=3) (4=2) (5=1)

AS PERGUNTAS 1 E 2 DEVERÃO APARECER DA SEGUINTE FORMA.

1 – PERCEPÇÃO DA QUALIDADE DE VIDA ( RESULTADO EM MÉDIA 1 A 5);

2 – SATISFAÇÃO COM A SAÚDE ( RESULTADO EM MÉDIA 1 A 5)

**CADA FACETA É SÓ SOMAR OS VALORES DA ENTREVISTA (DE 1 A 5) E DIVIDIR PELO NUMERO DE PARTICIPANTES. FAZER UMA MÉDIA ONDE O RESULTADO VAI SER DE 1 ATÉ 5.**

**ABAIXO ESTÃO OS DOMÍNIOS E SUAS FACETAS CORRESPONDENTES CADA FACETA COM UM NUMERO IDENTIFICADOR CONFORME O QUESTIONARIO JÁ ENVIADO.**

**Domínios e facetas do WHOQOL-bref.**

Domínio 1 - **Domínio físico**

3. Dor e desconforto **AQUI DO LADO VAI APARECER A MÉDIA (RESULTADO) EM CADA FACETA.**

4. Energia e fadiga

10. Sono e repouso

15. Mobilidade

16. Atividades da vida cotidiana

17. Dependência de medicação ou de tratamentos

18. Capacidade de trabalho

**PARA CALCULAR O DOMÍNIO FÍSICO É SÓ SOMAR OS VALORES DAS FACETAS E DIVIDIR POR 7. (Q3,Q4,Q10,Q15,Q16,Q17,Q18)/7.**

MESMO FORMATO DEVE SER FEITO NOS DEMAIS DOMÍNIOS.

Domínio 2 - **Domínio psicológico**

5. Sentimentos positivos

6. Pensar, aprender, memória e concentração

7. Auto-estima

11. Imagem corporal e aparência

19. Sentimentos negativos

26. Espiritualidade/religião/crenças pessoais

**PARA CALCULAR O DOMÍNIO PSICOLOGICO É SÓ SOMAR OS VALORES DAS FACETAS E DIVIDIR POR 6. (Q5,Q6,Q7,Q11,Q19,Q26)/6**

Domínio 3 - **Relações sociais**

20. Relações pessoais

21. Suporte (Apoio) social

22. Atividade sexual

**PARA CALCULAR O DOMÍNIO RELAÇÕES SOCIAIS É SÓ SOMAR OS VALORES DAS FACETAS E DIVIDIR POR 3. (Q20,Q21,Q22)/3**

Domínio 4 - **Meio ambiente**

- 8. Segurança física e proteção
- 9. Ambiente no lar
- 12. Recursos financeiros
- 13. Cuidados de saúde e sociais: disponibilidade e qualidade
- 14. Oportunidades de adquirir novas informações e habilidades
- 23. Participação em, e oportunidades de recreação/lazer
- 24. Ambiente físico: (poluição/ruído/trânsito/clima)
- 25. Transporte

**PARA CALCULAR O DOMINIO MEIO AMBIENTE É SÓ SOMAR OS VALORES DAS FACETAS E DIVIDIR POR 8. (Q8,Q9,Q12,Q13,Q14,Q23,Q24,Q25)/8**

TODOS OS RESULTADOS VÃO SER EM MÉDIA TANTO NO DOMINIO QUANTO NAS FACETAS. QUANTO AOS RELATORIOS MESMO FORMATO DO WHOQOL-OLD. OPÇÃO PARA IMPRIMIR PARA ALUNOS O RELATORIO COMPLETO (COM DOMINIO, AS FACETAS, AS PERGUNTAS UM E DOIS E A CLASSIFICAÇÃO **necessita melhorar (quando for 1 até 2,9); regular (3 até 3,9); boa (4 até 4,9) e muito boa (5)** ) E RESUMIDO COM OS RESULTADOS DAS QUESTOES UM E DOIS **necessita melhorar (quando for 1 até 2,9); regular (3 até 3,9); boa (4 até 4,9) e muito boa (5).** OS DADOS TABULADOS DEVEM SER COMPATIVELIS PARA IMPORTAÇÃO PARA O EXCEL, CASO SEJA NECESSÁRIO.

WHOQOL – ABREVIADO (FLECK et al, 2000) - Versão em Português

**Instruções**

Este questionário é sobre como você se sente a respeito de sua qualidade de vida, saúde e outras áreas de sua vida. **Por favor responda a todas as questões.** Se você não tem certeza sobre que resposta dar em uma questão, por favor, escolha entre as alternativas a que lhe parece mais apropriada. Esta, muitas vezes, poderá ser sua primeira escolha. Por favor, tenha em mente seus valores, aspirações, prazeres e preocupações. Nós estamos perguntando o que você acha de sua vida, tomando como referência as **duas últimas semanas**. Por exemplo, pensando nas últimas duas semanas, uma questão poderia ser:

	nada	Muito pouco	médio	muito	completamente
Você recebe dos outros o apoio de que necessita?	1	2	3	4	5

Você deve circular o número que melhor corresponde ao quanto você recebe dos outros o apoio de que necessita nestas últimas duas semanas. Portanto, você deve circular o número 4 se você recebeu "muito" apoio como abaixo.

	nada	Muito pouco	médio	muito	completamente
Você recebe dos outros o apoio de que necessita?	1	2	3	-	5

Você deve circular o número 1 se você não recebeu "nada" de apoio.

**Por favor, leia cada questão, veja o que você acha e circule no número e lhe parece a melhor resposta.**

		muito ruim	Ruim	nem ruim nem boa	boa	muito boa
1	Como você avaliaria sua qualidade de vida?	1	2	3	4	5
		muito insatisfeito	Insatisfeito	nem satisfeito nem insatisfeito	satisfeito	muito satisfeito
2	Quão satisfeito(a) você está com a sua saúde?	1	2	3	4	5

As questões seguintes são sobre **o quanto** você tem sentido algumas coisas nas últimas duas semanas.

		nada	muito pouco	mais ou menos	bastante	extremamente
3	Em que medida você acha que sua dor (física) impede você de fazer o que você precisa?	1	2	3	4	5
4	O quanto você precisa de algum tratamento médico para levar sua vida diária?	1	2	3	4	5
5	O quanto você aproveita a vida?	1	2	3	4	5
6	Em que medida você acha que a sua vida tem sentido?	1	2	3	4	5
7	O quanto você consegue se concentrar?	1	2	3	4	5
8	Quão seguro(a) você se sente em sua vida diária?	1	2	3	4	5
9	Quão saudável é o seu ambiente físico (clima, barulho, poluição, atrativos)?	1	2	3	4	5

As questões seguintes perguntam sobre **quão completamente** você tem sentido ou é capaz de fazer



certas coisas nestas últimas duas semanas.						
		nada	um pouco	um pouco	muito	completamente
10	Você tem energia suficiente para seu dia-a-dia?	1	2	3	4	5
11	Você é capaz de aceitar sua aparência física?	1	2	3	4	5
12	Você tem dinheiro suficiente para satisfazer suas necessidades?	1	2	3	4	5
13	Quão disponíveis para você estão as informações que precisa no seu dia-a-dia?	1	2	3	4	5
14	Em que medida você tem oportunidades de atividade de lazer?	1	2	3	4	5

As questões seguintes perguntam sobre <b>quão bem ou satisfeito</b> você se sentiu a respeito de vários aspectos de sua vida nas últimas duas semanas.						
		muito ruim	ruim	nem ruim nem bom	bom	muito bom
15	Quão bem você é capaz de se locomover?	1	2	3	4	5
		muito insatisfeito	Insatisfeito	nem satisfeito nem insatisfeito	satisfeito	Muito satisfeito
16	Quão satisfeito(a) você está com o seu sono?	1	2	3	4	5
17	Quão satisfeito(a) você está com sua capacidade de desempenhar as atividades do seu dia-a-dia?	1	2	3	4	5
18	Quão satisfeito(a) você está com sua capacidade para o trabalho?	1	2	3	4	5
19	Quão satisfeito(a) você está consigo mesmo?	1	2	3	4	5

20	Quão satisfeito(a) você está com suas relações pessoais (amigos, parentes, conhecidos, colegas)?	1	2	3	4	5
21	Quão satisfeito(a) você está com sua vida sexual?	1	2	3	4	5
22	Quão satisfeito(a) você está com o apoio que você recebe de seus amigos?	1	2	3	4	5
23	Quão satisfeito(a) você está com as condições do local onde mora?	1	2	3	4	5
24	Quão satisfeito(a) você está com o seu acesso aos serviços de saúde?	1	2	3	4	5
25	Quão satisfeito(a) você está com o seu meio de transporte?	1	2	3	4	5

As questões seguintes referem-se a **com que frequência** você sentiu ou experimentou certas coisas nas últimas duas semanas.

		nunca	Algumas vezes	freqüentemente	muito freqüentemente	sempre
26	Com que frequência você tem sentimentos negativos tais como mau humor, desespero, ansiedade, depressão?	1	2	3	4	5

Alguém lhe ajudou a preencher este questionário?

.....

Quanto tempo você levou para preencher este questionário?

.....

### Referencias

The Whoqol Group: The word Health Organization Quality of Life Assessment (WHOQOL): Position paper from the Health Organization. Soc. Sci. Med, 1995, 41(10):1403-1409.

Fleck MPA, Louzada S, Xavier M, Chamovich E, Vieira G, Santos L, Pinzon V. Aplicação da versão em português do instrumento abreviado de avaliação da qualidade de vida "WHOQOL-bref". Revista de saúde pública, 2000, 34(2):178-183

**STEPS FOR CHECKING AND CLEANING DATA AND COMPUTING  
DOMAIN SCORES FOR THE WHOQOL-BREF**

(prepared by Alison Harper and Mick Power on behalf of the WHOQOL Group)

**Steps SPSS syntax for carrying out data checking, cleaning and  
computing total scores**

Check all  
26 items

from  
assessment  
have a

range of 1-5

RECODE Q1 Q2 Q3 Q4 Q5 Q6 Q7 Q8 Q9 Q10 Q11 Q12 Q13  
Q14 Q15 Q16 Q17 Q18 Q19 Q20 Q21 Q22 Q23 Q24 Q25 Q26  
(1=1) (2=2) (3=3) (4=4) (5=5) (ELSE=SYSMIS).

(This recodes all data outside the range 1-5 to system missing)

Reverse 3

negatively

phrased

items

RECODE Q3 Q4 Q26 (1=5) (2=4) (3=3) (4=2) (5=1)

(This transforms negatively framed questions to positively framed questions)

Compute

domain

scores

COMPUTE PHYS= MEAN.6(Q3,Q4,Q10,Q15,Q16,Q17,Q18)\*4.

COMPUTE PSYCH= MEAN.5(Q5,Q6,Q7,Q11,Q19,Q26)\*4.

COMPUTE SOCIAL=MEAN.2(Q20,Q21,Q22)\*4.

COMPUTE ENVIR=MEAN.6(Q8,Q9,Q12,Q13,Q14,Q23,Q24,Q25)\*4.

(These equations calculate the domain scores. All scores are multiplied by 4 so as to be directly comparable with scores derived from the WHOQOL-100. The ".6" in "MEAN.6" specifies that 6 items must be endorsed for the domain score to be calculated.)

Transform

scores to

0-100 scale

COMPUTE PHYS=(PHYS-4)\*(100/16).

COMPUTE PSYCH=(PSYCH-4)\*(100/16).

COMPUTE SOCIAL=(SOCIAL-4)\*(100/16).

COMPUTE ENVIR=(ENVIR-4)\*(100/16)

Delete cases

with > 20%

missing

data

COUNT TOTAL=Q1 TO Q26 (1 THRU 5)

(This command creates a new column "total". "Total" contains a count of the WHOQOL-BREF items with values 1-5 that have been endorsed by each subject. The "Q1 TO Q26" means that consecutive columns from "Q1", the first item, to "Q26", the last item, are included in the count. It therefore assumes that data is entered in the order given in the assessment.)

SELECT IF (TOTAL>21).

EXECUTE

(This second command selects only those cases where "total", the "total number" of



items completed, is greater than or equal to 80%. It deletes the remaining cases from the dataset.)

Tabela para apresentação dos resultados de qualidade de vida do WHOQOL Breve

<b>Data</b>	<b>Domínio Físico</b>	<b>Domínio Psicológico</b>	<b>Domínio Relações sociais</b>	<b>Domínio Meio Ambiente</b>

Resultados em % de 0 a 100

Quanto maior a porcentagem (mais perto de 100%) melhor a qualidade de vida.

## ANEXO D – APROVAÇÃO DO CEP-PUCRS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE  
CATÓLICA DO RIO GRANDE  
DO SUL - PUC/RS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** DURAÇÃO E EFICÁCIA DA TOXINA BOTULÍNICA RECONSTITUÍDA EM SORO GLICOSADO E GLUCONATO DE ZINCO.

**Pesquisador:** Denise Cantarelli Machado

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 38928214.1.0000.5336

**Instituição Proponente:** UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 903.330

**Data da Relatoria:** 20/12/2014

#### Apresentação do Projeto:

A toxina botulínica é um produto do *Clostridium botulinum*, uma espécie de bactéria anaeróbica. Após a introdução no organismo humano, a toxina botulínica dirige-se até a junção neuromuscular, essa funcionalidade bloqueia a liberação de acetilcolina, causando a paralisia neuromuscular temporária através de denervação química. Além do relaxamento muscular temporário, a Toxina botulínica Tipo A possui efeito antinociceptivo sobre a dor. A toxina botulínica é indicada para o tratamento de estrabismo, blefarospasmo, distonia cervical, espasmo hemifacial, espasticidade muscular, linhas faciais hiperkinéticas ("rugas"), hiperidrose focal palmar e axilar, incontinência urinária e enxaqueca crônica. O efeito neurotóxico na junção neuromuscular é sempre temporário. Os resultados do procedimento iniciam-se a partir de 1 a 3 dias após a aplicação, sendo que o efeito máximo é visto em aproximadamente 2 semanas após a aplicação e, em seguida, começa a declinar gradualmente após cerca de 3 meses. Portanto, alternativas para aumentar a duração do efeito da toxina botulínica tanto para fins estéticos quanto terapêuticos poderão ser úteis nos pacientes que recebem aplicações trimestrais ou semestrais. Este trabalho visa investigar o efeito e duração do uso da toxina botulínica tipo A diluída em solução de gluconato de zinco 0,020% e soro glicosado 0,25% comparando com a diluição usual com solução fisiológica 0,9%.

**Endereço:** Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505  
**Bairro:** Partenon **CEP:** 90.619-900  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3320-3345 **Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@pucrs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE  
CATÓLICA DO RIO GRANDE  
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 903.330

**Objetivo da Pesquisa:**

Investigar o efeito e duração do uso da toxina botulínica tipo A diluída em solução de gluconato de zinco 0,020 % e soro glicosado 0,25 % comparando com a diluição usual com solução fisiológica 0,9 %.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Todos reversíveis e temporários. Equimose, assimetria, dor à aplicação, edema, ineficácia da aplicação.

Benefícios:

Atenuação das rugas dinâmicas em terço superior da face, incluindo músculo frontal e corrugadores.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto está muito bem escrito, todos os aspectos éticos e metodológicos pertinentes são observados.

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

Todos os termos são apresentados e estão de acordo.

**Recomendações:**

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

Não há pendências ou inadequações.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Endereço:** Av.Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505  
**Bairro:** Partenon **CEP:** 90.619-900  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3320-3345 **Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@pucls.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE  
CATÓLICA DO RIO GRANDE  
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 903.330

PORTO ALEGRE, 09 de Dezembro de 2014

---

**Assinado por:**  
**Rodolfo Herberto Schneider**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505  
**Bairro:** Partenon **CEP:** 90.619-900  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3320-3345 **Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@pucrs.br



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Pró-Reitoria Acadêmica  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º andar  
Porto Alegre - RS - Brasil  
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564  
E-mail: [proacad@pucrs.br](mailto:proacad@pucrs.br)  
Site: [www.pucrs.br/proacad](http://www.pucrs.br/proacad)