



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2014

**RAQUEL LEAL
MONTEIRO MANO DE
OLIVEIRA**

**EFEITOS CENTRAIS E PERIFÉRICOS DA TOXINA
BOTULÍNICA DO TIPO A:
APLICAÇÕES NA UROLOGIA**



**RAQUEL LEAL
MONTEIRO MANO DE
OLIVEIRA**

**EFEITOS CENTRAIS E PERIFÉRICOS DA TOXINA
BOTULÍNICA DO TIPO A:
APLICAÇÕES NA UROLOGIA**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção de grau de Mestre em Bioquímica, ramo de Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica do Doutor António Avelino Ferreira Saraiva da Silva, professor associado do Departamento de Biologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e da Doutora Rita Maria Pinho Ferreira, professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

o júri

presidente

Prof. Doutor Rui Miguel Pinheiro Vitorino
investigador auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof.^a Doutora Delminda Rosa Gamelas Neves Lopes de Magalhães
professora associada do Departamento de Biologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Prof. Doutor António Avelino Ferreira Saraiva da Silva
professor associado do Departamento de Biologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

agradecimentos

O meu percurso como aluna de mestrado foi marcado pela formação de excelência levada a cabo por profissionais dedicados e de enorme carácter. Esta dissertação surge como o culminar dessa etapa e constitui o resultado final de um projeto que não teria sido possível sem o contributo de vários, aos quais passo a manifestar os meus sinceros agradecimentos:

Ao Prof. Doutor António Avelino, pela oportunidade e confiança que tanto contribuíram para o meu progresso, pelo acompanhamento e orientação que conduziram todo o meu trabalho, pelos vastos conhecimentos partilhados e pela simpatia e consideração ao longo dos anos.

À Ana Coelho por todo o tempo dispensado a ensinar-me, pela ajuda incansável e pela disponibilidade total que sempre mostrou. Obrigada por me transmitires toda a determinação e empenho que tanto te caracterizam e pela amizade que construímos.

À Prof.^a Doutora Rita Ferreira pela completa disponibilidade e preocupação constante no esclarecimento das dúvidas que me foram surgindo durante a realização da presente tese.

Ao Prof. Doutor Francisco Cruz pelo interesse e entusiasmo que manifestou pelo meu trabalho e pelo enorme incentivo à minha formação científica. À Prof.^a Doutora Célia Cruz pela sabedoria que sempre me transmitiu, pela total disponibilidade e pela amizade transmitida. À Prof.^a Doutora Ana Charrua pela simpatia e pelo constante estímulo ao meu progresso.

Ao pessoal do departamento de biologia experimental pela boa disposição e prestabilidade que sempre manifestaram. Agradeço especialmente à D. Elisa Nova pelo acompanhamento durante os protocolos de microscopia eletrónica.

À Ana, à Rita, à Isabel, à Diana, à Gi, à Lígia, ao Zé e ao Sérgio agradeço os momentos de descontração, as gargalhadas constantes, a partilha de experiências, as conversas e todo o apoio prestado. Obrigada pela amizade.

Aos meus pais e irmã pelos incentivos constantes à minha progressão nas várias etapas da vida e pelo carinho e amor que estão sempre presentes. É um prazer crescer convosco.

Aos meus familiares pelo molde do meu carácter e personalidade que se reflete no meu sucesso pessoal e profissional.

Ao Hugo por todos os momentos partilhados, pela paciência e dedicação, pelo apoio incondicional e por teres vindo a percorrer comigo um longo caminho repleto de conquistas e felicidade.

Aos meus amigos pelo apoio na concretização dos meus sonhos e objetivos e por fazerem todo o esforço valer a pena.

“Aqueles que passam por nós não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós” – Antoine de Saint-Exupéry

palavras-chave

toxina botulínica do tipo A, neurotransmissão, transporte axonal, analgesia, trato urinário inferior, bexiga urinária, medula espinhal.

resumo

O serotipo A da toxina botulínica (BoNT/A), nomeadamente a formulação onabotulinumtoxinA (onabotA), tem vindo a ser amplamente utilizado na prática clínica. Este facto deve-se ao seu efeito proteolítico sobre a proteína associada ao sinaptossoma com 25 kDa (SNAP-25) e ao consequente bloqueio da exocitose e da neurotransmissão. É com base na sua ação que a toxina é indicada para o tratamento da incontinência urinária relacionada com a hiperatividade do músculo detrusor (DO) e com a dissinergia vesico-esfincteriana. Contudo, a sua aplicação tem vindo a ser alargada a outras patologias do trato urinário inferior caracterizadas por contrações musculares excessivas ou por dor.

O mecanismo pelo qual a toxina exerce um efeito antinociceptivo carece de fundamentação científica, pelo que vários estudos têm vindo a ser desenvolvidos com o objetivo de clarificar a sua ação em nociceptores periféricos e centrais. Surgiram então como objetivos da presente tese avaliar a possibilidade da toxina sofrer transporte axonal para a região da medula espinhal que recebe aferentes primários provenientes da bexiga e estudar o seu efeito direto no sistema nervoso central. Adicionalmente, pretendeu-se determinar uma taxa de conversão de doses correspondente às formulações onabotulinumtoxinA e a abobotulinumtoxinA (abobotA) para utilização clínica na área da urologia.

Após administração de onabotA na parede da bexiga e no espaço intratecal detetou-se a presença de SNAP-25 clivada (cSNAP-25) maioritariamente nas lâminas superficiais do corno dorsal do segmento medular L6, que recebe aferentes primários provenientes da bexiga. A expressão de cSNAP-25 foi bastante marcada na medula espinhal de animais tratados com a toxina e apenas num pequeno número de fibras foi detetada colocação com marcadores de terminais colinérgicos. Não foi detetada colocação com marcadores de fibras sensitivas peptidérgicas, e com marcadores estruturais de neurónios e de células da glia. Através da análise ultraestrutural detetou-se a presença de um elevado número de vesículas sinápticas adjacentes à membrana pré-sináptica e de uma quantidade excessiva de mitocôndrias nos terminais neuronais, nos animais que receberam onabotA. A análise global dos resultados permitiu concluir que a toxina atua maioritariamente na região dos aferentes primários do segmento L6 da medula espinhal e que o seu efeito é observado num grande número de fibras cujo conteúdo neuroquímico não foi possível definir por imunofluorescência. O estudo da ultraestrutura permitiu detetar alterações nos neurónios do segmento L6 de animais tratados com a toxina que podem estar associadas à ausência de colocação da cSNAP-25 com os diversos marcadores testados.

Adicionalmente, procedeu-se à injeção única da mesma dose unitária de onabotA ou abobotA na zona superior da cúpula e as fibras imunorreativas contra a cSNAP-25 detetadas na bexiga foram contabilizadas. A comparação entre o número médio de fibras correspondente a cada um dos grupos experimentais sugere que a onabotA é 1,7 vezes mais potente do que a abobotA. Assim, no caso específico da aplicação no detrusor deve ser considerada a razão de 1:1,7 para conversão das doses de onabotA e abobotA, respetivamente.

keywords

botulinum toxin type A, neurotransmission, axonal transport, analgesy, lower urinary tract, urinary bladder, spinal cord.

abstract

Botulinum toxin type A (BoNT/A), mainly the onabotulinumtoxinA (onabotA) formulation, has been extensively used in clinical practice. This fact is due to its proteolytic effect on the synaptosomal-associated protein of 25 kDa (SNAP-25) and to the consequent blockade of exocytosis and neurotransmission. Based on its mechanism of action, the toxin has been indicated for the treatment of urinary incontinence related to detrusor overactivity (DO) or to vesico sphincter dyssynergia. However, the toxin utility has been expanded to other lower urinary tract disorders characterized by excessive muscular contractions or pain.

The mechanism by which the toxin exerts an antinociceptive effect needs scientific background. So, many studies have been developed in order to clarify its activity in peripheral and central nociceptors. Therefore, the main goals of this thesis were to evaluate the possibility of the toxin undergo through axonal transport for the spinal cord region that receives primary afferents from the urinary bladder and to study its direct effect in the central nervous system. Additionally, we intend to determine a dose conversion ratio of onabotulinumtoxinA and abobotulinumtoxinA (abobotA) for use in clinical urology.

After onabotA administration in the bladder wall and in the intrathecal space it was detected the presence of cleaved SNAP-25 (cSNAP-25) mainly at the superficial lamina of the dorsal horn of the L6 spinal segment, which receives bladder primary afferents. The expression of cSNAP-25 was markedly observed in the spinal cord and only a small number of immunoreactive fibers presented colocalization with markers of cholinergic terminals. It was not observed colocalization with markers of peptidergic sensitive fibers and with neuron or glial specific markers. By the ultrastructural analysis it was detected the presence of a high number of synaptic vesicles adjacent to the pre-synaptic membrane and an excessive number of mitochondria inside the neurons of animals that received onabotA. The global analysis of the results allowed us to conclude that the toxin acts mainly at the primary afferents region of the L6 spinal segment and that its effect is detected in a high number of fibers which neurochemical content was not possible to determine by immunofluorescence. The ultrastructural study lead us to detect neuronal alterations at the L6 medullary segment of animals treated with the toxin that may be related to the absence of cSNAP-25 colocalization with different tested markers.

Additionally, a unique injection of the same unitary dose of onabotA and abobotA was administered at the top of the bladder dome and immunoreactive cSNAP-25 fibers were counted in the bladder. The comparison of the average number of immunoreactive fibers of each experimental group suggests that onabotA is 1,7 times more potent than abobotA. Therefore, in the specific case of detrusor administration it should be considered a 1:1,7 ratio for onabotA and abobotA dose conversion.

Índice

Abreviaturas	1
Índice de figuras e tabelas	3
I. Introdução	5
1. Botulismo e toxina botulínica: dados históricos	5
2. Caracterização da toxina botulínica	7
2.1. Estrutura e ativação.	7
2.2. Mecanismo de ação nas junções neuromusculares.	8
2.3. Comercialização e aplicações terapêuticas.	13
3. A toxina botulínica do tipo A no sistema nervoso central	15
3.1. Transporte axonal retrógrado e anterógrado.	15
3.2. Efeito analgésico	17
3.3. Aplicação direta no sistema nervoso central	20
4. A toxina botulínica na urologia	20
4.1. Controlo neuronal do trato urinário inferior.	20
4.1.1. Armazenamento de urina e micção.	22
4.2. Aplicações diretas da toxina botulínica do tipo A na urologia.	23
II. Objetivos	26
III. Materiais e Métodos	27
Modelos animais	27
Parte 1	27
1. Administração da toxina botulínica do tipo A.	27
1.1. Injeções no músculo detrusor.	27
1.2. Injeções no espaço intratecal.	27
2. Perfusões e colheita do material biológico	28
3. Corte do material biológico	29
4. Imunohistoquímica e microscopia	29
4.1. Revelação por imunofluorescência.	30
4.2. Revelação com substrato cromogénico.	31
4.3. Revelação para microscopia eletrónica.	32
Parte 2	33
1. Administração da toxina botulínica do tipo A.	33
2. Colheita do material biológico	33
3. Corte do material biológico	33
4. Imunohistoquímica e microscopia	33
5. Análise estatística	34
IV. Resultados	35
Parte 1	35

1. Expressão de SNAP-25 clivada na bexiga e na medula após administração de onobotulinumtoxinA no detrusor	35
2. Distribuição da SNAP-25 clivada no segmento medular L6 após administração periférica e central de onobotulinumtoxinA	36
3. Conteúdo neuroquímico das fibras que expressam SNAP-25 clivada no segmento medular L6.....	37
3.1. Expressão de SNAP-25 clivada e de VACht ou ChAT	38
3.2. Expressão de SNAP-25 clivada e de CGRP	39
3.3. Expressão de SNAP-25 clivada e de SV2.....	40
3.4. Expressão de SNAP-25 clivada e de β 3-tubulina.....	41
3.5. Expressão de SNAP-25 clivada e de RT97.....	42
3.6. Expressão de SNAP-25 clivada e de GFAP.....	43
4. Ultraestrutura do segmento medular L6 após administração intratecal de onobotulinumtoxinA	44
Parte 2	47
V. Discussão	49
Considerações gerais	49
1. Modelos experimentais	49
2. Serotipo e formulações da toxina botulínica do tipo A.....	50
3. Doses da toxina botulínica do tipo A	50
4. Duração das experiências.....	51
Parte 1	51
1. Transporte axonal e expressão de SNAP-25 clivada no segmento medular L6	51
2. Conteúdo neuroquímico das fibras afetadas pela toxina botulínica do tipo A no segmento medular L6	52
3. Ultraestrutura das fibras afetadas pela toxina botulínica do tipo A no segmento medular L6	53
Parte 2	54
VI. Conclusões e perspectivas futuras	56
VII. Referências Bibliográficas	57

Abreviaturas

- AbobotA – AbobotulinumtoxinA
- ACh – Acetilcolina (do inglês *acetylcholine*)
- ATP – Adenosina trifosfato
- BoNT – Neurotoxina botulínica (do inglês *botulinum neurotoxin*)
- BoNT/A – Serótipo A da neurotoxina botulínica (do inglês *botulinum neurotoxin type A*)
- CGRP – Péptido relacionado com o gene da calcitonina (do inglês *calcitonin gene related peptide*)
- ChAT – Acetiltransferase de colina (do inglês *choline acetyltransferase*)
- CNS – Sistema nervoso central (do inglês *central nervous system*)
- cSNAP-25 – Forma clivada da proteína associada ao sinaptossoma com 25 kDa (do inglês *cleaved synaptosomal-associated protein with 25kDa*)
- DO – Hiperatividade do detrusor (do inglês *detrusor overactivity*)
- DRGs – Gânglios da raiz dorsal (do inglês *dorsal root ganglia*)
- FDA – *Food And Drug Administration*
- GFAP – proteína ácida fibrilar glial (do inglês *glial fibrillary acidic protein*)
- HC – Cadeia pesada da toxina botulínica (do inglês *Heavy chain*)
- H_C – Domínio C-terminal da cadeia pesada da toxina botulínica
- H_{CC} – motivo da cadeia pesada *tree foil* β
- H_{CN} – motivo da cadeia pesada *jelly roll* β
- H_N – Domínio N-terminal da cadeia pesada da toxina botulínica
- IncobotA – IncobotulinumtoxinA
- IT – intratecal
- LC – Cadeia leve da toxina botulínica (do inglês *Light chain*)
- LD₅₀ – Dose letal a 50% (do inglês *lethal dose 50%*)
- LUT – Trato urinário inferior (do inglês *lower urinary tract*)
- NAP – Proteína acessória não tóxica (do inglês *non-toxic accessory protein*)
- NF-H – Neurofilamento H/cadeia pesado (do inglês *neurofilament-H/heavy chain*)
- NHS – Soro norma de cavalo (do inglês *normal horse serum*)
- NMJ – Junção neuromuscular (do inglês *neuromuscular junction*)
- OnobotA – OnobotulinumtoxinA
- PAG – Substância cinzenta periaquedutal (do inglês *periaqueductal gray*)
- PB – tampão fosfato (do inglês *phosphate buffer*)
- PBS – Tampão fosfato salino (do inglês *phosphate buffer saline*)

PBST – Tampão fosfato salino com 0,3% de Tryton (do inglês *phosphate buffer saline with Tryton*)

PMC – Centro pontino da micção (do inglês *pontine micturition center*)

PNS – Sistema nervoso periférico (do inglês *peripheral nervous system*)

RimabotB – RimabotulinumtoxinB

SNAP-25 – Proteína associada ao sinaptossoma com 25 kDa (do inglês *synaptosomal-associated protein with 25kDa*)

SNARE – Recetor da proteína de ligação ao fator sensível à N-etilmaleimida solúvel (do inglês *soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor*)

SP – Substância P

SV2 – Proteína de vesículas sinápticas 2 (do inglês *synaptic vesicle 2*)

Syn – Sintaxina (do inglês *syntaxin*)

Syt – Sinaptotagmina (do inglês *synaptotagmin*)

t-SNARE – Recetor da proteína de ligação ao fator sensível à N-etilmaleimida solúvel associado à membrana alvo (do inglês *target-SNARE*)

TeNT – Neurotoxina do tétano (do inglês *tetanus neurotoxin*)

TRPV1 – Recetor de potencial transiente vanilóide do tipo 1 (do inglês *type 1 transient receptor potential vanilloid receptor*)

U – Unidades de toxina botulínica

v-SNARE – Recetor da proteína de ligação ao fator sensível à N-etilmaleimida solúvel associado a vesículas (do inglês *vesicle-SNARE*)

VACHT – Transportador vesicular da acetilcolina (do inglês *vesicular acetylcholine transporter*)

VAMP – Proteína membranar associada a vesículas (do inglês *vesicle-associated membrane protein*)

β3-Tub – β3-tubulina

Índice de figuras e de tabelas

Figura 1: Estrutura tridimensional da toxina botulínica do tipo A	7
Figura 2: Efeitos da toxina botulínica na junção neuromuscular.....	9
Figura 3: Mecanismo de ação da toxina botulínica	10
Figura 4: Efeito da toxina botulínica do tipo A na sensibilização periférica e central	18
Figura 5: Efeitos antinociceptivos associados à administração central e periférica da toxina botulínica do tipo A em modelos de dor inflamatória e neuropática	19
Figura 6: Circuitos neuronais que controlam o armazenamento e a libertação de urina..	23
Figura 7: Expressão de SNAP-25 clivada na bexiga e na medula três dias após administração de onabotulinumtoxinA no músculo detrusor.....	35
Figura 8: Distribuição da SNAP-25 clivada no segmento medular L6 três dias após administração de onabotulinumtoxinA por via intratecal ou no detrusor	36
Figura 9: Ausência de imunorreação contra a SNAP-25 clivada no segmento medular L6 após administração de soro fisiológico por via intratecal.....	37
Figura 10: Distribuição da SNAP-25 clivada em fibras colinérgicas marcadas contra o transportador vesicular da acetilcolina no corno ventral do segmento medular L6.....	38
Figura 11: Expressão de SNAP-25 clivada e de fibras colinérgicas marcadas contra a acetiltransferase de colina no segmento medular L6	39
Figura 12: Expressão de SNAP-25 clivada e de fibras peptidérgicas imunorreativas contra o péptido relacionado com o gene da calcitonina no segmento medular L6.....	40
Figura 13: Expressão de SNAP-25 clivada e do recetor molecular da toxina botulínica do tipo A SV2 no segmento medular L6	41
Figura 14: Expressão de SNAP-25 clivada e do marcador neuronal β 3-tubulina no segmento medular L6	42
Figura 15: Expressão de SNAP-25 clivada e do marcador de neurofilamentos fosforilados RT97 no segmento medular L6.....	43
Figura 16: Expressão de SNAP-25 clivada e do marcador de astrócitos GFAP no segmento medular L6	44
Figura 17: Ultraestrutura do corno dorsal do segmento medular L6 de animais tratados com onabotulinumtoxinA intratecal e de animais controlo.....	45
Figura 18: Ultraestrutura e expressão da SNAP-25 clivada no corno dorsal do segmento medular L6 de animais tratados com onabotulinumtoxinA intratecal	46
Figura 19: Distribuição das fibras imunorreativas contra a SNAP-25 clivada na bexiga de animais injetados na cúpula com 0,5U de onabotulinumtoxinA ou abobotulinumtoxinA ...	47

Figura 20: Número de fibras imunorreativas contra a SNAP-25 clivada na bexiga de cada animal tratado com 0,5 U de onabotulinumtoxinA ou abobotulinumtoxinA48

Figura 21: Número médio de fibras imunorreativas contra a SNAP-25 clivada na bexiga de animais tratados com 0,5 U de onabotulinumtoxinA ou abobotulinumtoxinA48

Tabela 1: Dados históricos relativos à investigação dos diversos serotipos da toxina botulínica6

Tabela 2: Proteínas alvo e sequências de aminoácidos humanas que contêm as ligações peptídicas especificamente clivadas pelos diferentes serotipos da toxina.....12

Tabela 3: Indicações terapêuticas da toxina botulínica aprovadas pela *FDA*13

Tabela 4: Características dos anticorpos primários utilizados nas reações de imunohistoquímica.....29

Tabela 5: Características dos anticorpos secundários utilizados nas reações de imunohistoquímica.....30

Tabela 6: Anticorpos primários e secundários utilizados nas reações de imunofluorescência.....31

I. Introdução

1. Botulismo e toxina botulínica: dados históricos

O botulismo é uma doença que resulta da exposição à toxina botulínica (BoNT) e que se caracteriza pela paralisia simétrica dos nervos do crânio, seguida de paralisia flácida dos músculos voluntários. A elevada letalidade associada à doença prende-se com o facto de a neurotoxina bloquear a contração muscular essencial ao funcionamento de órgãos vitais, como os pulmões, resultando frequentemente em paragem respiratória (1).

Esta patologia surge em inúmeros casos associada à ingestão de alimentos contaminados com formas latentes da bactéria *Clostridium botulinum* que foram mantidos em condições anaeróbias ideais à replicação bacteriana e à produção da toxina. Após ingestão, a BoNT é absorvida no intestino e alcança a corrente sanguínea, o que garante o seu transporte para os terminais nervosos do sistema nervoso periférico. O mecanismo de ação da toxina nesses locais resulta no bloqueio da neurotransmissão colinérgica, o que se traduz no principal sintoma associado ao botulismo, a paralisia muscular. Contudo, para além do botulismo associado à ingestão de alimentos contaminados, a patologia pode associar-se à contaminação de feridas e à absorção da toxina produzida, *in situ*, no intestino de crianças com menos de um ano de idade e cuja flora intestinal não se encontra totalmente estabelecida, o que facilita a colonização com *C. botulinum* (2).

O relato dos primeiros casos de envenenamento por ingestão de alimentos contaminados surgiu no final do século XVIII na região de Württemberg, a sudoeste da Alemanha, o que se deveu, fundamentalmente, às fracas condições de higiene decorrentes das Guerras Napoleónicas (1803-1815). Inicialmente, os sinais e sintomas apresentados pelos pacientes, como a diplopia, a midríase e a paralisia levaram a que se suspeitasse de envenenamento pelo alcaloide atropina, um antagonista muscarínico que atua ao nível do sistema nervoso parassimpático. Contudo, posteriormente, esses sinais e sintomas foram relacionados com a ingestão de produtos alimentares, nomeadamente enchidos, apreciados e abundantemente consumidos pela generalidade da população dessa região (3).

Em 1820 e 1822, Justinus Kerner publicou duas monografias nas quais reportava diversos casos de envenenamento associados ao consumo de enchidos e nas quais descrevia detalhadamente a doença conhecida, atualmente, por botulismo (3). Os trabalhos de Kerner representaram grandes contributos para a investigação do botulismo,

tendo sido descritos os sinais e os sintomas gastrointestinais, musculares e do sistema nervoso autónomo associados a essa patologia. Adicionalmente, Kerner colocou a hipótese da existência de uma toxina que era responsável pelo desenvolvimento da doença e sugeriu a sua possível utilização no tratamento de doenças caracterizadas por hiperexcitabilidade ou hiperatividade do sistema nervoso motor ou autónomo (4).

O primeiro cientista a adicionar algo de relevante aos trabalhos iniciados por Kerner na área do botulismo foi o microbiologista van Ermengem, ao isolar a bactéria anaeróbia *Bacillus botulinus*, hoje em dia denominada *Clostridium botulinum*, a partir de alimentos contaminados e da medula óssea de indivíduos que faleceram devido à sua ingestão (3). Posteriormente, a identificação do microrganismo causador do botulismo possibilitou a descoberta e a designação dos diversos serótipos da toxina botulínica (**Tabela 1**) e a determinação da sua ocorrência na natureza (5,6).

Tabela 1: Dados históricos relativos à investigação dos diversos serótipos da toxina botulínica (5).

1910	Leuchs descobriu o serotipo B da toxina botulínica
1919	Burke designou os serótipos A e B da toxina botulínica
1922	Bengston e Seddon identificaram o serotipo C da toxina botulínica
1828	Meyer e Gunnison identificaram o serotipo D da toxina botulínica
1936	Bier identificou o serotipo E da toxina botulínica
1960	Moller e Scheibel identificaram os serótipos F e G da toxina botulínica

A aplicação terapêutica da BoNT surgiu no século XX, após purificação da forma cristalina do serotipo A da toxina por Edward Schantz, à qual se seguiu um estudo de Vernon Brooks que concluiu que a injeção de pequenas quantidades desse serotipo num músculo hiperativo bloqueava a libertação de acetilcolina nos terminais nervosos motores e originava relaxamento muscular temporário (7). Essa descoberta levou a que o oftalmologista Alan B. Scott utilizasse esse mesmo serotipo no tratamento do estrabismo e, posteriormente, do blefarospasmo, evitando a necessidade de submeter os pacientes a procedimentos cirúrgicos (8,9).

Os estudos pioneiros descritos levaram a que a toxina botulínica seja, hoje em dia, utilizada clinicamente no tratamento de múltiplas patologias neurológicas associadas a contrações musculares espasmódicas, de doenças dolorosas e de situações caracterizadas por hipersecreção (10).

2. Caracterização da toxina botulínica

2.1. Estrutura e ativação

A toxina botulínica é uma metaloprotease da família da toxina do tétano, produzida por diversas espécies do género *Clostridium* (e.g. *botulinum*, *barati*, *butyricum*), e existe em sete formas serologicamente distintas, designadas pelas letras A-G (11–13).

A neurotoxina é sintetizada sob a forma de cadeia peptídica simples, com um peso molecular de 150 kDa, e permanece no citosol da bactéria produtora até ser libertada sobre a forma de complexo macromolecular, juntamente com proteínas acessórias não tóxicas (NAPs). Esse complexo compreende tamanhos entre os 300 kDa e os 900 kDa, dependendo do serótipo sintetizado, sendo que o serótipo A é o único capaz de formar complexos com 900kDa, que se designam por LL. Adicionalmente, o serótipo A e os serotipos B, C₁ e D hemaglutinina positivos formam complexos com 300 kDa, que se designam pela letra L, ou 500 kDa, correspondendo à forma M. Os serotipos E, F e D hemaglutinina negativos formam apenas complexos com 300 kDa (14,15).

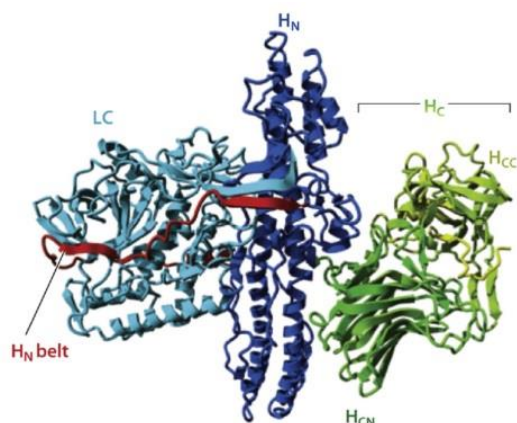


Figura 1: Estrutura tridimensional da toxina botulínica do tipo A. LC: cadeia leve (azul claro); HN: domínio N-terminal da cadeia pesada (azul escuro); HC: domínio C-terminal da cadeia pesada (verde); HN belt: *belt* da cadeia pesada (vermelho); HCN: motivo *jelly roll* da cadeia β (verde escuro); HCC: porção com 25 kDa do domínio C-terminal da cadeia pesada (verde claro). Adaptado de (12).

A toxina sob a forma de cadeia simples não processada é considerada praticamente inerte e a sua ativação requer a ação de proteases clostridiais ou tecidulares. Esse processo culmina com a formação de uma estrutura composta por duas cadeias, uma cadeia leve (LC) e uma cadeia pesada (HC), com 50 kDa e 100 kDa, respetivamente, ligadas entre si por uma ponte bissulfito e por um segmento proteico denominado por *belt* (12,16). A forma ativa da toxina apresenta três domínios: uma protease dependente de zinco localizada na região N-terminal da LC, um domínio de translocação situado na região N-terminal da HC (HN) e um domínio de ligação localizado na região C-terminal da HC (HC). O domínio HC pode ainda ser dividido em dois

subdomínios: um motivo *jelly roll* da cadeia β (H_{CN}) e um motivo *tree foil* β (H_{CC}) (**Figura 1**) (16,17).

As proteínas acessórias agregadas à neurotoxina, apesar de não terem um efeito direto na intoxicação, desempenham uma função protetora contra o pH ácido e a ação proteolítica das enzimas presentes no suco gástrico. Assim, os complexos capazes de alcançar o intestino dissociam-se, devido às condições de pH ligeiramente alcalinas, o que permite a sua subsequente absorção e entrada na corrente sanguínea (18).

2.2. Mecanismo de ação nas junções neuromusculares

A BoNT é transportada através da corrente sanguínea, alcança os terminais nervosos colinérgicos, local onde atua preferencialmente, e impede a libertação de acetilcolina (ACh) na fenda sináptica e a consequente propagação do impulso nervoso (19). Assim, a toxina é capaz de bloquear a neurotransmissão em locais do sistema nervoso periférico, como as junções neuromusculares e os terminais nervosos do sistema nervoso simpático e parassimpático. Contudo, a maioria da investigação tem incidido na ação da neurotoxina ao nível das junções neuromusculares (NMJs), uma vez que esta mostrou ser efetiva no tratamento de distonias, patologias caracterizadas por hiperatividade muscular involuntária (18).

A libertação de ACh nas sinapses colinérgicas ocorre em consequência de um potencial de ação ao longo da membrana pré-sináptica que resulta na abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem e no influxo desses iões para o interior do terminal pré-sináptico. Assim, o estímulo despolarizante, que advém do aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , promove a fusão da membrana das vesículas que contêm a ACh com a membrana pré-sináptica o que culmina com a libertação do neurotransmissor (20).

O processo de fusão das membranas é mediado pelas proteínas SNARE (recetor das proteínas de ligação ao fator sensível à N-etilmaleimida solúvel) que recebem a designação de v-SNAREs ou t-SNAREs consoante se localizam na membrana das vesículas sinápticas ou na membrana plasmática do neurónio pré-sináptico, respetivamente. Assim, quando as vesículas que armazenam o neurotransmissor se aproximam da membrana pré-sináptica, a v-SNARE denominada por VAMP (proteína membrana associada a vesículas) ou sinaptobrevina, interage com as t-SNAREs SNAP-25 e Syn (Syntaxina) formando um complexo que permite a fusão das duas estruturas (**Figura 2A**) (21). Para além dessas proteínas, também a complexina e a sinaptotagmina

interferem com o mecanismo de fusão das vesículas sinápticas, sendo que a primeira atua como “clamp” e impede a formação do complexo SNARE e a segunda contribui para a estabilização desse complexo (22).

Uma vez que a exocitose dos neurotransmissores é regulada pelas diversas proteínas descritas, alterações ao nível da sua expressão e/ou estrutura têm um efeito direto nesse mecanismo. Uma prova dessa dependência é o bloqueio da liberação de ACh que resulta do efeito proteolítico da BoNT nos seus alvos específicos, as proteínas SNARE (**Figura 2B**).

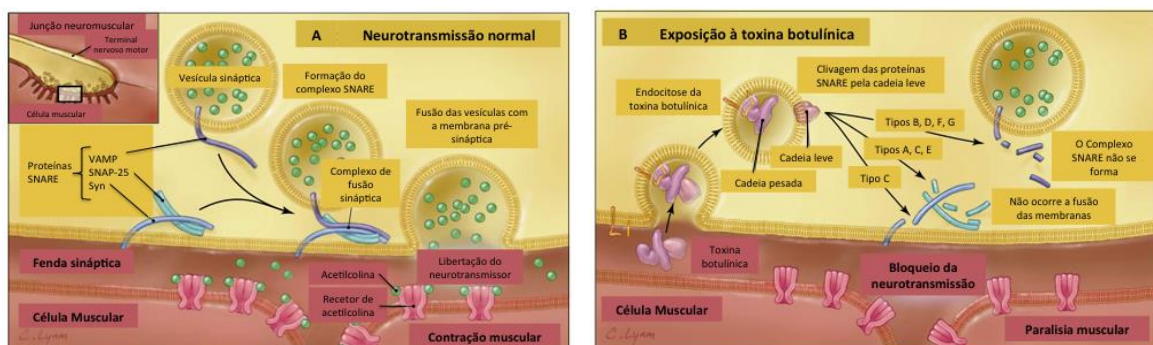


Figura 2: Efeitos da toxina botulínica na junção neuromuscular. (A) Neurotransmissão colinérgica; (B) Inibição da neurotransmissão colinérgica por ação da toxina botulínica. Adaptado de (23).

O mecanismo de intoxicação dos neurónios colinérgicos levado a cabo pela BoNT divide-se, fundamentalmente, em quatro etapas: a) ligação aos terminais nervosos, mediada pelo domínio H_C, b) internalização da toxina por endocitose de vesículas c) translocação da LC, mediada pelo domínio H_N, e d) clivagem e inativação do seu alvo, as proteínas SNARE, através da ação proteolítica da LC (11,16,24,25).

a) Ligação aos terminais nervosos

A interação preferencial da toxina com os terminais dos neurónios colinérgicos deve-se, fundamentalmente, à sua elevada afinidade e especificidade para recetores característicos dessas estruturas. Assim, o modelo de recetor duplo proposto defende que o domínio H_C interage inicialmente com co-recetores gangliosídicos da membrana pré-sináptica, frequentemente o GD1b e o GT1b, o que facilita a ancoragem da toxina e a posterior ligação de alta afinidade a proteínas específicas associadas às vesículas sinápticas (**Figura 3A**) (10,12).

A ligação aos gangliosídeos resulta na alteração da estrutura da toxina, o que permite a sua rotação e torção e facilita as interações adicionais irreversíveis com os

seus recetores específicos (26). Os recetores glicoproteicos específicos diferem consoante o serotipo da toxina, tendo sido identificada a proteína SV₂ (Proteína das vesículas sinápticas 2) como o recetor específico dos serotipos A, D, E e F(27–30) e a Syt (Sinaptogamina) I e II como o receptor dos serótipos B e G (31–35). A ligação da neurotoxina a esses recetores é fundamental para a sua entrada nas células neuronais e a prevalência distinta desses recetores nos diversos tecidos pode explicar o motivo pelo qual a toxina atua maioritariamente em determinados locais (36).

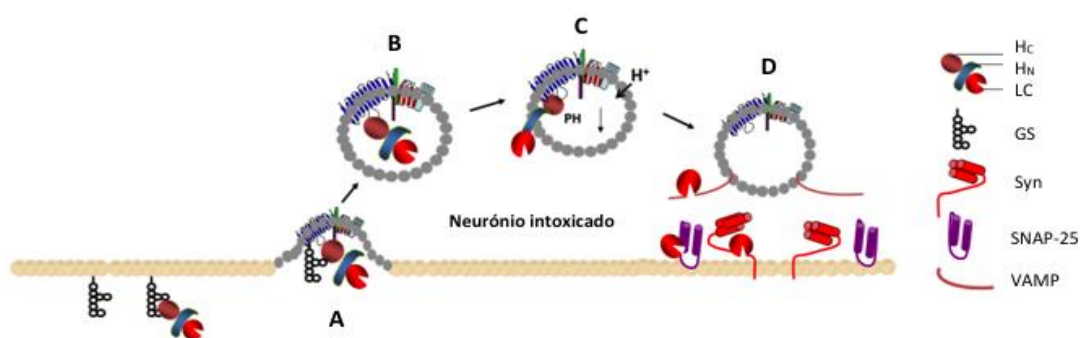


Figura 3: Mecanismo de ação da toxina botulínica. (A) Ligação da BoNT a um gangliosídeo da membrana neuronal e ao seu recetor proteico específico localizado na membrana da vesícula, mediada pelo domínio H_c; (B) Endocitose da toxina no interior da vesícula; (C) Translocação da LC para o citosol, mediada pelo domínio H_n; (D) Clivagem das proteínas SNARE pela LC da BoNT. Adaptado de (10).

b) Internalização

Na ausência de resultados que comprovassem o mecanismo pelo qual a BoNT entrava nos neurónios, acreditava-se que esse processo era homólogo à endocitose de múltiplos ligandos. Contudo, a descoberta dos recetores específicos da toxina, bem como da sua localização no domínio luminal da membrana das vesículas sinápticas, sugere que a internalização da toxina resulta do processo de reciclagem das vesículas sinápticas (22).

No processo de exocitose, a fusão da membrana das vesículas com a membrana pré-sináptica permite a libertação do conteúdo dessas vesículas e a consequente exposição dos recetores específicos da toxina ao meio extracelular da fenda sináptica. Esse processo permite a ligação da BoNT aos recetores e a sua internalização nas vesículas que, após libertarem o neurotransmissor, se voltam a formar (**Figura 3B**). Assim, neurónios colinérgicos com atividade aumentada vão apresentar elevadas taxas de reciclagem de vesículas e vão ser capazes de internalizar uma maior quantidade de toxina (24,36,37). Contudo, apesar de o mecanismo exato pelo qual a internalização da

toxina ocorre permanecer desconhecido, a recente detecção do serotipo A da BoNT no interior dessas vesículas surge como evidência de que esse processo ocorre efetivamente através da reciclagem das vesículas (38).

c) Translocação da cadeia leve

A translocação da LC do interior das vesículas para o citosol neuronal constitui o processo menos esclarecido do mecanismo de ação da BoNT. Contudo, o modelo maioritariamente aceite sugere que as condições de pH ácidas no interior das vesículas sinápticas contribuem para a mudança de conformação da toxina e para a protonação de alguns dos seus resíduos carboxílicos o que a torna positivamente carregada. Essas modificações resultam na exposição dos segmentos hidrofóbicos da molécula e na sua interação com a membrana vesicular e na consequente formação de um canal membranar (**Figura 3C**) (11,36).

Apesar de não se conhecerem os domínios da toxina responsáveis pela sua interação com a membrana e com a formação do canal membranar, considera-se que o domínio H_N possa estar envolvido nesse processo e que a região *belt* possa atuar como chaperona (10).

O processo de translocação culmina com a rutura da ponte bissulfito e consequente separação das duas cadeias que constituem a toxina, o que se deve ao pH neutro e ao ambiente redutor do citosol neuronal (10,39). Uma evidência deste mecanismo resulta da medição das condutâncias, uma vez que, numa fase inicial, o estado de baixa condutância sugere que o canal se encontra parcialmente fechado, correspondendo à situação em que a toxina permanece intacta, e o estado de maior condutância resulta da libertação da cadeia leve e da desobstrução do canal (16,36).

d) Clivagem dos alvos específicos

Ao alcançar o citosol neuronal, a LC impede a libertação de ACh para a fenda sináptica através da sua atividade proteolítica ao nível das proteínas do complexo SNARE. A região LC da neurotoxina é comum a todos os serotipos e caracteriza-se por apresentar uma sub-região altamente conservada, o motivo HEXXH, responsável pela sua atividade como endoprotease dependente de zinco (36).

A natureza das proteínas clivadas depende do serótipo da toxina em causa, pelo que a clivagem da SNAP-25 está associada aos serotipos A, C e E, a clivagem da VAMP

está associada aos serotipos B, D e F e a clivagem da sintaxina associa-se ao serotipo C (**Figura 3D**). Contudo, apesar de diferentes serotipos da toxina serem capazes de clivar a mesma proteína, os locais de reconhecimento e clivagem parecem ser específicos para cada um deles (**Tabela 2**).

Tabela 2: Proteínas alvo e sequências de aminoácidos humanas que contêm as ligações peptídicas especificamente clivadas pelos diferentes serotipos da toxina. Adaptado de (11).

Serotipo	Alvo intracelular	Local específico de clivagem
A	SNAP-25	Glu-Ala-Asn-Gln--Arg-Ala-Thr-Lys
B	VAMP	Gly-Ala-Ser-Gln--Phe-Glu-Thr-Ser
C	Sintaxina	Asp-Thr-Lys-Lys--Ala-Val-Lys-Phe / Ala-Asn-Gln-Arg--Ala-Thr-Lys-Met
D	VAMP	Arg-Asp-Gln-Ly--Leu-Ser-Glu-Leu
E	SNAP-25	Gln-Ile-Asp-Arg--Ile-Met-Glu-Lys
F	VAMP	Glu-Arg-Asp-Gln--Lys-Leu-Ser-Glu / Asp-Lys-Val-Leu--Glu-Arg-Asp-Gln
G	VAMP	Glu-Thr-Ser-Ala--Ala-Lys-Leu-Lys

Relativamente à BoNT/A, o serotipo maioritariamente utilizado e estudado, determinou-se que a região N-terminal da LC interage com os resíduos 80-110 da proteína SNAP-25, resíduos esses que não estão associados à formação do complexo SNARE. Esta particularidade facilita a competição entre a toxina e a sintaxina para a fenda de ligação ao substrato. A ligação da toxina à sequência peptídica específica, localizada na região 141-206 da SNAP-25, resulta na clivagem da proteína (10,40).

Ao clivarem as proteínas SNARE, os diferentes serotipos da neurotoxina vão impedir a formação de um complexo estável e funcional e bloquear o mecanismo de libertação da ACh. Contudo, esse efeito é reversível, pois apesar da perda de função das NMJs afetadas, as fibras musculares adjacentes permanecem viáveis e são capazes de restabelecer a sua função, inicialmente através do fenómeno de *sprouting* e posteriormente através da recuperação total da NMJ original (41).

2.3. Comercialização e aplicações terapêuticas

A elucidação do mecanismo de ação da toxina botulínica nas junções neuromusculares despoletou a sua utilização em diversas condições caracterizadas por hiperexcitabilidade muscular. Assim, apesar de a neurotoxina ser uma das toxinas mais potentes conhecidas e a causa da doença botulismo, a ação limitada à área de aplicação, a reversibilidade do seu efeito e o risco diminuído do desenvolvimento de efeitos secundários sistêmicos quando administrada em baixas concentrações levou à sua comercialização e aprovação, pela *Food And Drugs Administration (FDA)*, no tratamento de diversas patologias (**Tabela 3**) (14).

Tabela 3: Indicações terapêuticas da toxina botulínica aprovadas pela FDA. Adaptado de (10).

Indicações terapêuticas	Produtos comerciais da BoNT (ano, especificidade)
Estrabismo	Oculinum/ Botox (1989)
Blefarospasmo	Oculinum/ Botox (1989)
Espasmo hemifacial	Oculinum/ Botox (1989)
Distonia Cervical	BOTOX (2001), Dysport (2009), Xeomin (2010), Neurobloc (2000)
Utilização cosmética	BOTOX (2000, Canadá), BOTOX (2012, EUA)
Hiperidrose axilar	BOTOX (2001, UK e Canadá), BOTOX (2004, EUA)
Enxaqueca crónica	BOTOX (2010)
Hiperatividade neurogénica do músculo detrusor	BOTOX (2012)

Para além das aplicações reconhecidas pela *FDA*, a toxina tem vindo a ser utilizada no tratamento de diversas patologias do trato urinário inferior, como a dissinergia do esfíncter, a síndrome da bexiga dolorosa e a obstrução da próstata, em doenças gastrointestinais, em condições de espasticidade, e na dor crónica músculo-esquelética (revisto em (10)).

Embora tenham sido identificados sete serotipos da BoNT, apenas os serotipos A e B são comercializados e aprovados para utilização clínica e/ou estética. As três preparações comerciais da BoNT/A maioritariamente utilizadas são a onabotulinumtoxinA, de nome comercial Botox® (Allergan, Inc., Irvine, CA), a abobotulinumtoxinA, de nome comercial Dysport® (Ipsen Biopharm, Ltd., Wrexham, UK) e a incobotulinumtoxinA (incobotA), de nome comercial Xeomin® (Merz Pharmaceuticals,

LLC, Greensboro, NC). Contudo, existe um quarto produto da BoNT/A designado por Prosigne® (Lanzhou Biological Products Institute, China) que carece de nome genérico, o que se deve à sua utilização reduzida. Quanto ao serotipo B existe apenas uma formulação denominada por rimabotulinumtoxinB (rimabotB), de nome comercial Myobloc®/Neurobloc® (Solstice Neurosciences, Inc., San Francisco, CA)) (41,42).

Apesar de todos os produtos da BoNT apresentarem um efeito semelhante ao nível do bloqueio da neurotransmissão colinérgica, é de salientar que não são bioequivalentes pois apresentam diferenças na composição da toxina progenitora, na dosagem e na potência, o que se repercute nas suas distintas indicações terapêuticas (41). Quanto à composição, a rimabotB é produzida como complexo progenitor de 700kDa e como solução pronta a utilizar, diferindo das soluções de onabotA, abobotA e incobotA que contêm complexos progenitores de 900 kDa, 500-900 kDa e 150 kDa, respetivamente, e necessitam de ser restituídas em soro fisiológico. Assim, todos os produtos, exceto a incobotA, são constituídos pela neurotoxina, com 150kDa, e por NAPs que asseguram a sua estabilidade e proteção contra eventual degradação proteolítica, e que podem desempenhar atividades biológicas que favoreçam a internalização da toxina (12).

A dosagem dos produtos comerciais da toxina botulínica utiliza a medida universal unidade (U), sendo que uma unidade é definida como a dose letal a 50% (LD₅₀) correspondente a um grupo de murganhos fêmea da estirpe Swiss-Webster com peso variável entre 18g e 20g (22,36). Contudo, as doses indicadas no tratamento de determinada patologia diferem consoante a forma comercial a utilizar, o que evidencia a diferença de potência entre os produtos. Assim, surge a necessidade de desenvolver estudos que comparem a potência das diversas preparações de BoNT/A utilizadas na clínica no sentido de estabelecer uma equivalência entre as doses e de uniformizar as terapêuticas existentes.

Apesar de o serotipo A da toxina botulínica ser o principal associado ao botulismo humano é, em simultâneo, o mais utilizado, sob a forma de onabotA, na prática clínica. Este facto deve-se, fundamentalmente, à não equivalência entre os produtos da neurotoxina e à predominância de estudos científicos e clínicos que incidem sobre esse produto (41,43).

3. A toxina botulínica do tipo A no sistema nervoso central

A toxina do tétano (TeNT) assemelha-se à toxina botulínica na medida em que é internalizada nos terminais nervosos periféricos e atua como endopeptidase de zinco sobre proteínas características do mecanismo de neuroexcitose. Contudo, enquanto a BoNT induz paralisia flácida, ao inibir preferencialmente a liberação de ACh nos terminais nervoso das NMJs, a TeNT desempenha a sua função catalítica nos interneurónios inibitórios da medula espinal, o que resulta em paralisia espasmódica (25). O alcance dos neurónios centrais através de transporte axonal considerava-se uma característica exclusiva da TeNT, uma vez que o efeito da BoNT parecia restrito aos terminais nervosos periféricos (44).

As primeiras evidências de que a toxina botulínica afeta estruturas do sistema nervoso central surgiram após Tyler observar alterações nos reflexos de Hoffmann num indivíduo com botulismo, indicativas de modificações nas sinapses da medula espinal (45). Os estudos que se seguiram utilizaram a marcação do serotipo A da toxina com radioisótopos e permitiram concluir que após administração intramuscular, a toxina mostrou ser capaz de alcançar estruturas do sistema nervoso central (CNS) (46,47). Adicionalmente a avaliação de alterações sinápticas, recorrendo a técnicas de eletrofisiologia e de análise ultra estrutural, sugeriu que a BoNT/A atua ao nível dos neurónios centrais e que esses efeitos estão relacionados com a administração periférica de doses elevadas da neurotoxina (48).

A descoberta de que a BoNT/A atua no sistema nervoso central evidenciou a necessidade de perceber qual o mecanismo de transporte da toxina e qual a sua função específica nos neurónios centrais. Esses conhecimentos poderão ser úteis para alargar a gama de aplicações da toxina, possibilitando a sua utilização no tratamento de patologias do sistema nervoso central, bem como na investigação científica, fundamentalmente na área das neurociências (44).

3.1. Transporte axonal retrógrado e anterógrado

A ação da toxina botulínica do tipo A no CNS após administração periférica suscitou um enorme interesse na comunidade científica, pelo que, nos últimos anos, surgiram diversos estudos cujo principal objetivo foi clarificar o mecanismo de transporte da toxina dos terminais nervosos periféricos para os neurónios centrais.

Em 2008, um estudo realizado por Antonucci *et al.* forneceu as primeiras evidências de que a BoNT/A, à semelhança da TeNT, sofre transporte axonal a longa distância, bem como trancitose, sendo capaz de desempenhar a sua atividade catalítica, ao nível da proteína SNAP-25, em neurónios do sistema nervoso central. Assim, através da avaliação da presença de SNAP-25 clivada no local de injeção bem como em projeções axonais distantes desse local, os autores concluíram que existe uma fração significativa da toxina ativada que é transportada através dos neurónios aferentes e que atua em estruturas do CNS (49).

Adicionalmente, um estudo publicado em 2012 liderado por Matak, veio confirmar as anteriores evidências de que a BoNT/A sofre transporte axonal retrógrado, através da deteção de SNAP-25 clivada na medula espinal após injeção da onabotA no nervo ciático. Contudo, uma vez que os autores administraram pequenas doses da toxina, estes resultados sugerem ainda que, ao contrário do que se pensava, não são necessárias doses elevadas de toxina para que esta seja transportada na forma ativa para o CNS e que este processo parece ocorrer com frequência (50).

Uma vez que pequenas doses da toxina surtem efeito a nível central, esperava-se que doses consideráveis pudessem resultar na distribuição alargada da toxina pelos diversos nervos do organismo. Em concordância com esta afirmação, Akaike *et al.* mostrou que a administração intramuscular unilateral de uma dose elevada da BoNT/A pode resultar na diminuição da contração muscular contralateral, o que prova que, dependendo da dose a utilizar, a administração da toxina não está livre de efeitos sistémicos (51).

Estas descobertas originaram a necessidade de se desenvolverem moléculas com atividade catalítica da BoNT/A e com a particularidade de serem específicas para um determinado tipo de nervos, direcionando assim a sua função e reduzindo a ocorrência de efeitos sistémicos. Nesse sentido surgiram estudos que utilizam técnicas de *stapling* de proteínas com o intuito de agregar o domínio catalítico da BoNT/A a fragmentos proteicos que redirecionem as moléculas produzidas para populações neuronais específicas (52,53). Estas podem vir a ser ferramentas importantes no estudo de circuitos neuronais uma vez que são capazes de bloquear a neurotransmissão em neurónios específicos.

A capacidade da toxina sofrer transporte axonal pode ser uma vantagem, na medida em que alarga a sua gama de aplicações, ou, pelo contrário, ser um entrave à sua utilização como agente terapêutico, uma vez que o seu efeito não é restrito ao local de administração o que pode estar relacionado com a ocorrência de efeitos adversos.

3.2. Efeito analgésico

As primeiras evidências de que a administração de BoNT/A estava associada ao alívio da dor surgiram entre 1985 e 1987 através de estudos nos quais a toxina foi utilizada como agente terapêutico no tratamento de distonias (22,54). Posteriormente, diversos estudos duplamente cegos nos quais se procedeu à administração de BoNT/A em pacientes que apresentavam diversas condições clínicas dolorosas confirmaram esse efeito analgésico e permitiram concluir que o alívio da dor nem sempre coincide com os efeitos da toxina ao nível das NMJs. Esta descoberta sugeriu que o alívio da dor que advém da administração da toxina não se deve exclusivamente à diminuição da excitabilidade muscular e que a BoNT/A apresenta mecanismos de ação alternativos que envolvem o sistema nociceptivo (22).

Para além de bloquear a libertação de ACh nas junções neuromusculares, ensaios *in vitro* permitiram demonstrar que a BoNT/A inibe a libertação de Substância P (SP) e do péptido relacionado com o gene da calcitonina (CGRP), que são neuropéptidos típicos de neurónios aferentes primários e são normalmente libertados em situações de inflamação (55,56). Estes resultados suportaram a ideia de que a toxina desempenha uma função direta nos nociceptores e tornaram-se o ponto de partida para o desenvolvimento de vários estudos *in vivo*.

A utilização de modelos animais de dor inflamatória, dor visceral e dor neuropática possibilitou o estudo da função da BoNT/A no sistema nociceptivo *in vivo*, e resultou na indicação da toxina no tratamento de patologias dolorosas (7). O estudo pré-clínico realizado num modelo animal de dor inflamatória induzida pela administração de formalina, levado a cabo por Cui *et al.*, surgiu como primeira evidência da ação direta da BoNT/A nos nociceptores *in vivo* (57). Ao estimular diretamente os nociceptores dos aferentes primários, a formalina induz a libertação de glutamato, SP e CGRP que levam ao desenvolvimento de inflamação neurogénica caracterizada pela libertação de mediadores inflamatórios como a bradiquinina, as prostaglandinas, a histamina, a serotonina, entre outros. Este processo resulta na sensibilização dos nociceptores periféricos associado à dor e na sensibilização dos neurónios do sistema nervoso central, através do aumento do *input* de glutamato e de SP (54).

A observação de que a administração subcutânea da BoNT/A inibe os efeitos nociceptivos associados à aplicação de formalina, como a libertação de glutamato, a imunoreatividade para a proteína *Fos* e a atividade dos neurónios de largo espectro da medula espinal, sugere que a toxina inibe diretamente a sensibilização periférica e

indiretamente a sensibilização central. Assim, o bloqueio da libertação dos neuropeptídeos inflamatórios nos nervos periféricos, que sucede à administração da BoNT/A, reduz a transmissão dos impulsos nervosos através dos nociceptores e a libertação de glutamato e SP pelos neurónios centrais (**Figura 4**) (54).

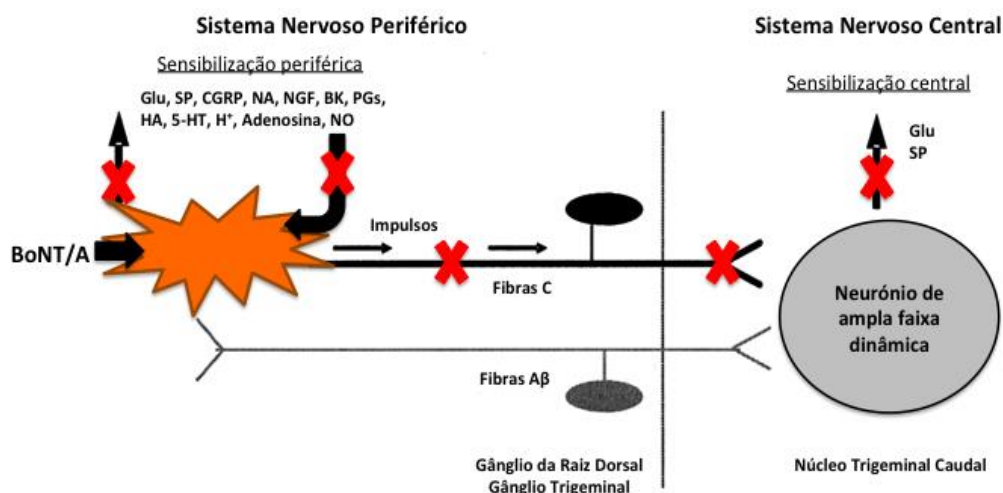


Figura 4: Efeito da toxina botulínica do tipo A na sensibilização periférica e central. Glu: Glutamato; NA: Noradrenalina; NGF: fator de crescimento neuronal; BK: Bradiquinina; H⁺: hidrogénio; NO: óxido nítrico; 5-HT: serotonina; SP: substância P; CGRP: péptido relacionado com o gene da calcitonina; HA: Histamina; PGs: prostaglandinas. Adaptado de (58).

O estudo do efeito analgésico da BoNT/A na dor inflamatória não se restringiu à utilização do modelo animal descrito mas também a outros modelos cuja inflamação foi induzida pela administração de carragenina ou capsaicina. Contudo, a publicação de resultados controversos, que demonstram que a BoNT/A não desempenha efeitos anti-inflamatórios significativos nesses modelos, põe em causa os processos descritos, pelos quais a toxina atua ao nível do processo inflamatório e reduz a dor resultante (7).

Em modelos animais de dor visceral associada a condições do trato urinário inferior como a hiperatividade da bexiga e a prostatite verificou-se alívio da dor após administração de BoNT/A, que se relacionou com a inibição da expressão de CGRP em terminais nervosos aferentes, com a inibição da expressão de ciclooxigenase 2 e dos seus recetores, bem como, com a inibição da expressão do recetor das prostaglandinas EP(4) (7). Estes resultados, obtidos em modelos animais de dor visceral, favoreceram a utilização clínica da toxina em pacientes com condições do trato urinário inferior de carácter doloroso.

Para além dos efeitos analgésicos resultantes da administração da BoNT/A em modelos de dor inflamatória e visceral, várias evidências sugerem que a toxina atua de forma idêntica na redução da dor neuropática (**Figura 5**) (59).

A dor neuropática resulta de danos no sistema nervoso central ou periférico, que podem dever-se a lesões diretas em estruturas nervosas ou a doenças que induzem neuropatia periférica. Assim, animais com lesões na medula espinal ou nos nervos ciáticos, bem como, animais diabéticos ou com neuralgia pós-herpética constituem modelos válidos de dor neuropática que são essenciais ao estudo do efeito analgésico da BoNT/A nesse tipo de dor (7).

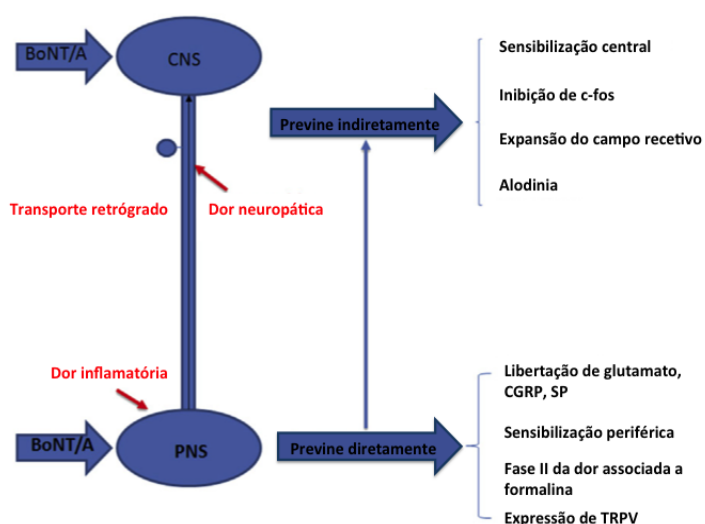


Figura 5: Efeitos antinociceptivos associados à administração central e periférica de BoNT/A em modelos de dor inflamatória e neuropática. BoNT/A: toxina botulínica do tipo A; CNS: sistema nervoso central; PNS: sistema nervoso periférico; SP: substância P; CGRP: péptido relacionado com o gene da calcitonina; TRPV: recetor de potencial transiente vanilóide. Adaptado de (59).

Um estudo publicado em 2012 por Marineli *et al.* (60) constituiu um importante avanço na investigação da ação analgésica da BoNT/A na dor neuropática. Os autores evidenciaram que a toxina sofre transporte axonal retrógrado e que exerce uma ação analgésica direta no CNS, uma vez que cliva a proteína SNAP-25 em astrócitos e influencia a proliferação das células de Schwann após lesão neuronal.

Os estudos desenvolvidos até à data permitiram concluir que a BoNT/A é eficaz no tratamento de múltiplas condições dolorosas que não se relacionam diretamente com o excesso de contrações musculares. Essa função parece relacionar-se com os efeitos diretos ao nível do sistema nociceptivo que consistem na inibição da libertação de SP e CGRP a partir dos nociceptores, na inibição do neurotransmissor excitatório glutamato e na diminuição da expressão do recetor TRPV1 (22).

3.3. Aplicação direta no sistema nervoso central

A elucidação dos efeitos da BoNT/A a nível central contribuiu para o desenvolvimento de estratégias de investigação de circuitos neuronais e de estruturas do CNS, bem como de novas terapias para doenças neurológicas (61).

Em 2011, surgiu um estudo levado a cabo por Lee *et al.* (62) no qual os autores pretenderam clarificar de que modo a onabotA atenua as respostas nociceptivas induzidas pela inflamação, a nível central. Para isso utilizaram o modelo animal de dor inflamatória induzida por formalina, e recorreram à administração intratecal da toxina e à avaliação da expressão de p-ERK, de p-CAMK-II e de CGRP. A observação de que a onabotA afeta as vias sinalização responsáveis pela modulação da dor, ao diminuir a expressão das ERKs, CAMK-II e CGRP ao nível do corno dorsal da medula espinal sugere que a toxina exerce um efeito antinociceptivo central. Comparativamente ao observado por Lee *et al.* (62), Luvisetto *et al.* demonstraram, num estudo publicado em 2006 (63), que a BoNT/A quando administrada por injeção intracerebroventricular é de igual modo capaz de atenuar a dor induzida pela formalina, sugerindo a interação da toxina com vias excitatórias responsáveis pela modulação da dor inflamatória. Estas descobertas favorecem a utilização da toxina para fins de analgesia, no entanto, há uma elevada necessidade de desenvolver estudos adicionais que comprovem estes efeitos.

Para além da atividade analgésica, a aplicação intracerebral de BoNT/A apresenta boas perspectivas no tratamento da doença de Parkinson e no desenvolvimento de modelos animais de demência (61). Contudo, a investigação dos efeitos diretos da toxina no CNS requer continuidade, no sentido de desvendar as suas demais potencialidades.

4. A toxina botulínica do tipo A no tratamento de condições urológicas

4.1. Controlo neuronal do trato urinário inferior

A micção é um processo visceral complexo controlado pelo sistema nervoso central, pelo que as diversas patologias e/ou danos que afetam as vias neuronais fundamentais ao controlo da atividade da bexiga resultam em alterações dos reflexos miccionais e na incapacidade de controlar esse processo (64). As estruturas do trato urinário inferior responsáveis pelo armazenamento e pela eliminação da urina (a bexiga, o colo da bexiga, o esfíncter e a uretra) são inervadas por nervos eferentes e aferentes

que transportam a informação de e para zonas específicas do cérebro, da medula espinal e dos gânglios periféricos (65).

As vias eferentes responsáveis pelo controlo da atividade da bexiga são constituídas por estruturas neuronais pertencentes ao sistema nervoso simpático, parassimpático e somático. As fibras simpáticas têm origem nos segmentos T11-L2 da medula espinal e alcançam os nervos pélvicos na base da bexiga e da uretra através do nervo hipogástrico ou da cadeia paravertebral. Os neurónios pós ganglionares simpáticos são responsáveis pela libertação de noradrenalina que atua nos recetores inibitórios β -adrenérgicos do músculo detrusor e dos gânglios e nos recetores excitatórios α -adrenérgicos presentes na uretra, no colo da bexiga e também nos gânglios. Assim, a libertação de noradrenalina desencadeia o relaxamento do músculo liso da bexiga e a contração do músculo liso da uretra (65,66).

Contrariamente às fibras simpáticas, as fibras parassimpáticas e as motoras somáticas provêm dos segmentos S2-S4 da medula espinal e alcançam o trato urinário inferior (LUT) através do nervo pélvico e das raízes sacrais e do nervo pudendo, respetivamente. Assim, as fibras parassimpáticas inervam os gânglios do plexo pélvico e a parede da bexiga e são responsáveis pela contração do músculo detrusor através da atividade da estimuladora da ACh nos recetores muscarínicos M3. Para além de assegurarem a neurotransmissão colinérgica, que constitui o principal mecanismo excitatório do trato urinário, os axónios pós-ganglionares parassimpáticos libertam ATP que estimula os recetores purinérgicos P2X do músculo detrusor e libertam óxido nítrico que medeia a inibição do músculo liso uretral (65,66).

Os nervos motores somáticos alcançam o músculo estriado do esfíncter uretral externo através dos nervos pudendos e induzem a sua contração pela libertação de ACh que atua ao nível dos recetores nicotínicos (65). Por outro lado, os nervos aferentes que inervam a bexiga projetam ramificações para o segmento L6 da medula espinal e são constituídos por dois tipos de axónios, os mielinizados A δ , que respondem à distensão e à contração da bexiga, e os não mielinizados que respondem apenas a estímulos nódicos. Estes nervos viajam através da comissura dorsal, pelo corno dorsal superficial e pelo núcleo parassimpático sacral até diversos locais supraspinhais, entre eles, o centro pontino da micção (PMC), o córtex cerebral e a substância cinzenta periaquedutal (PAG) (65,67).

Para além das vias neuronais descritas é de salientar que a camada suburotelial do colo da bexiga e o urotélio desempenham um papel fundamental na sensibilidade da bexiga. Esta propriedade está relacionada com a expressão de diversos tipos de

recetores na camada urotelial, como os nicotínicos, os muscarínicos, os TRPVs e os adrenérgicos, com a capacidade de resposta a transmissores libertados pelos nervos aferentes e também à libertação de ATP, ACh e óxido nítrico que podem influenciar a atividade de nervos adjacentes (64,65). Assim, a atividade da bexiga, que varia entre as fases de enchimento e de esvaziamento, é controlada pela complexa interação entre as diversas vias descritas e depende da integridade de todas as estruturas envolvidas.

4.1.1. Armazenamento de urina e micção

A fase de enchimento da bexiga caracteriza-se pelo armazenamento de urina que resulta no aumento da pressão no interior da bexiga e na distensão da sua superfície. Esses estímulos mecânicos induzem a resposta dos aferentes primários localizados na parede da bexiga que transportam a informação para as estruturas do CNS. Durante essa fase, a atividade do PMC encontra-se inibida e são organizados na medula espinal “reflexos de guarda” que promovem a continência. Simultaneamente, a distensão da bexiga estimula a inervação simpática conduzida pelos nervos hipogástrico e podendo e inibe a inervação parassimpática, o que resulta na inibição da contração do músculo detrusor e na estimulação da contração do esfíncter uretral (**Figura 6A**) (64,65,68).

No momento em que a bexiga se encontra cheia, os neurónios aferentes transportam a informação para zonas do CNS, como o PMC e a PAG. Assim, a estimulação do PMC é responsável pela estimulação da atividade parassimpática e pela inibição da atividade simpática que, conseqüentemente, resultam na contração do músculo detrusor e no relaxamento do esfíncter uretral (**Figura 6B**). Este fenómeno culmina com esvaziamento da bexiga através da expulsão de urina, o que permite um novo ciclo de enchimento e esvaziamento (65).

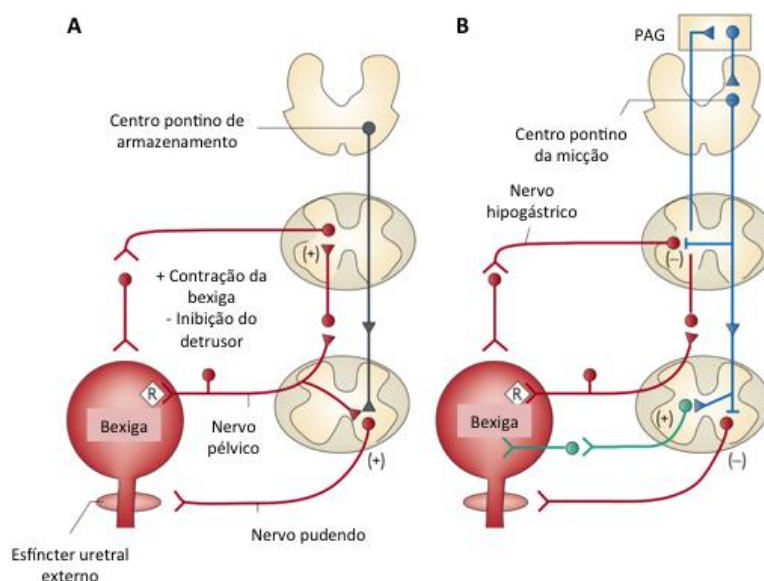


Figura 6: Circuitos neurais que controlam o armazenamento e a liberação de urina. (A) Armazenamento de urina; (B) Liberação de urina; Cor verde: representa o efluxo parassimpático em direção à bexiga e ao músculo liso da uretra; Cor azul: representa as vias reflexivas provenientes de zonas específicas do sistema nervoso central. PAG: substância cinzenta periaquedutal. Adaptado de (65).

4.2. Aplicações diretas da toxina botulínica do tipo A na urologia

A onabotA tem vindo a ser indicada no tratamento de diversas condições do trato urinário inferior, como a hiperatividade do músculo detrusor, a dissinergia do esfíncter do detrusor, a incontinência urinária de causa motora ou sensitiva, a dor pélvica e, recentemente, a dor prostática crónica (69–71).

A elucidação do mecanismo de ação da BoNT/A nas junções neuromusculares e o sucesso associado à sua aplicação no tratamento de condições caracterizadas por hiperatividade dos músculos esqueléticos levaram a que a primeira aplicação urológica da toxina fosse direcionada a pacientes que apresentavam dissinergia do esfíncter derivada de lesões na medula espinal (70). Os resultados preliminares obtidos por Dykstra *et al.* (72,73) demonstraram que a administração direta da toxina no esfíncter levava à redução da pressão uretral, do volume residual de urina pós-miccional e da pressão da bexiga durante a fase de enchimento, o que resultava da diminuição da dissinergia. Adicionalmente, a aplicação da toxina no esfíncter foi alargada a outras patologias do LUT caracterizadas por retenção urinária e a condições de dor prostática crónica (70).

Posteriormente, surgiu a hipótese da aplicação de onabotA no músculo liso da bexiga impulsionada pela elevada necessidade de tratar os sintomas associados à hiperatividade do detrusor e apoiada nos factos descritos por Dickson e Shevky (74) que sugerem uma possível ação da toxina no bloqueio do sistema nervoso parassimpático (69,70). Assim, a utilização de onabotulinumtoxinA no tratamento da hiperatividade do músculo detrusor, em pacientes adultos que não respondam ou tolerem fármacos anticolinérgicos tornou-se a única aplicação urológica da toxina aprovada pela FDA (75,76). A hiperatividade do músculo detrusor caracteriza-se por contrações involuntárias desse músculo durante a fase de enchimento da bexiga e estima-se que atinja cerca de 16,6% da população mundial adulta (71). Esta patologia subdivide-se em hiperatividade neurogénica do detrusor, quando tem origem no sistema nervoso, ou hiperatividade idiopática do detrusor, quando a causa é desconhecida.

A atividade exacerbada do músculo da bexiga resulta, na maioria dos casos, no aumento da frequência e da urgência miccional, sendo que por vezes, pode associar-se a episódios de incontinência urinária. Os sinais e sintomas relacionados com a incontinência influenciam negativamente a qualidade de vida dos pacientes com DO e constituem os principais impulsos à procura de soluções terapêuticas para essa patologia. Assim, o treino do músculo detrusor e fortificação do músculo pélvico, bem como a estimulação elétrica e a utilização de fármacos antimuscarínicos e anticolinérgicos surgiram como terapias úteis no tratamento da DO. Contudo a ineficiência e intolerância associadas a essas abordagens desencadearam a procura de outros agentes terapêuticos que constituíssem alternativas válidas às intervenções cirúrgicas disponíveis (71). A evidência de que a injeção de 100U de onabotA no músculo detrusor melhorava significativamente os sintomas associados à hiperatividade da bexiga e a qualidade de vida dos pacientes que sofriam da doença, bem como o conhecido perfil de segurança da toxina e elevada durabilidade dos seus efeitos sugeriram que a administração de onabotA no detrusor constituía uma escolha útil no tratamento da DO (77).

A utilização de onabotA no tratamento de patologias urológicas deve-se, em grande parte, à sua ação nos terminais nervosos colinérgicos. Contudo, um estudo levado a cabo por Chuang *et al.* (78), forneceu evidências de que a administração intravesical de onabotA bloqueia as respostas dolorosas induzidas pela inflamação da bexiga e inibe a libertação de CGRP dos aferentes primários vesicais. Estes resultados sugeriram a possibilidade de utilizar BoNT/A no tratamento de cistite intersticial e de outros tipos de dor visceral.

Estudos clínicos levados a cabo por Pinto *et al.* (79,80), nos quais o produto onabotA foi injetado no trígono de pacientes que apresentavam síndrome de dor vesical ou cistite intersticial comprovaram a eficácia da toxina na redução desse tipo de dor. Essas evidências sugerem a importância do estudo do transporte axonal da toxina para o sistema nervoso central, bem como das estruturas centrais afetadas e qual o seu envolvimento nos mecanismos nociceptivos. De acordo com os resultados obtidos nesse estudo surgiu recentemente um trabalho da autoria de Coelho *et al.* no qual se concluiu que a administração da toxina botulínica do tipo A por via intratecal leva à clivagem da SNAP-25 no sistema nervoso central que se associa à redução da dor em modelos animais de cistite (81).

Apesar dos últimos avanços científicos, que evidenciam o efeito nociceptivo da toxina, permanece a necessidade de se estudar o transporte axonal da toxina após administração periférica no músculo detrusor e de determinar o seu efeito direto no sistema nervoso central, no sentido de perceber de que modo a toxina se associa com a redução da dor.

II. Objetivos

Parte 1

Tendo por base os efeitos da toxina botulínica do tipo A no sistema nervoso central e considerando a sua marcada utilização no domínio da urologia torna-se essencial:

- Avaliar a possibilidade da onabotulinumtoxinA sofrer transporte axonal para o sistema nervoso central, nomeadamente para o segmento L6 da medula espinhal, após administração periférica, na bexiga;
- Localizar os efeitos da onabotulinumtoxinA no segmento L6 da medula espinhal após administração periférica e central;
- Estudar o conteúdo neuroquímico e a ultraestrutura das fibras afetadas pela onabotulinumtoxinA no segmento L6 da medula espinhal.

Parte 2

Concomitantemente, é importante considerar a possibilidade de utilizar outros produtos da toxina na urologia, nomeadamente o segundo mais utilizado e estudado de seu nome abobotulinumtoxinA. Contudo, a não bioequivalência entre as formulações, que se relaciona com diferenças na potência e na capacidade de difusão surge como entrave à utilização de outras formulações que não a onabotulinumtoxinA. Assim, surgiu como objetivo:

- Comparar a potência relativa das formulações onabotulinumtoxinA e abobotulinumtoxinA após administração na parede da bexiga;

III. Materiais e métodos

Modelos animais

No presente trabalho utilizaram-se ratos (*Rattus norvegicus*) fêmea da estirpe Wistar, com pesos compreendidos entre 220 e 250 g (Charles River, Barcelona, Espanha), e murganhos (*Mus musculus*) fêmea da estirpe C57Bl/6, com pesos compreendidos entre 20 e 25 g (Charles River, Barcelona, Espanha). Os animais foram mantidos em condições controladas de luz (12h luz/ 12h escuro), temperatura (20-24°C) e humidade (55% +/- 10%) e com livre acesso a alimento e água. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com a Diretiva do Conselho das Comunidades Europeias (2010/63/EU) e fizeram-se todos os esforços no sentido de reduzir o número de animais utilizados bem como o seu sofrimento.

Parte 1

1. Administração da toxina botulínica do tipo A

1.1. Injeções no músculo detrusor

Um grupo de 4 ratos foi anestesiado com isoflurano (IsoFlo®, 2% para indução e 4% para manutenção) e por laparotomia expuseram-se as bexigas. De seguida procedeu-se à administração de um total de 10 U de onabotA (Botox®, Allergan, Irvine, Ca, USA) através de 10 injeções, cada uma com 1 U da toxina diluída em 10 µL de soro fisiológico, distribuídas pelo músculo detrusor. No final das cirurgias os animais ficaram em recuperação durante 3 dias.

Como controlo da experiência, 2 ratos foram sujeitos a um procedimento semelhante no qual a administração da toxina foi substituída pela administração de soro fisiológico na mesma proporção.

1.2. Injeções no espaço intratecal

Os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (Imalgene 1000®, 6 mg/ 100 g de peso corporal) e medetomidina (Dormitor®, 0,025 mg/ 100 g de peso corporal) diluída em soro fisiológico, por via intraperitoneal. Um grupo de 10 ratos foi

submetido à implantação de um cateter de silicone ao nível da região lombar subaracnoide. Procedeu-se a uma laminectomia entre os segmentos T9 e T10 da medula espinal e o cateter foi inserido até uma das extremidades alcançar os segmentos medulares L5/ L6. A outra extremidade do cateter foi externalizada na região frontal da cabeça.

Após dois dias de recuperação e monitorização procedeu-se à administração única de 5 U de onabotA diluída em 50 µL de soro através do cateter de 6 dos animais. Os restantes animais (n=4) foram utilizados como controlo tendo-se administrado 50 µL de soro fisiológico através do cateter.

2. Perfusões e colheita de material biológico

Ao terceiro dia após injeção de onabotA todos os animais foram anestesiados com uma sobredose de pentobarbital (Nembutal®, 6 mg/ 100 g de peso corporal) e procedeu-se à perfusão vascular a partir da aorta ascendente.

O grupo de animais injetado com onabotA (n=4) ou o seu veículo (n=2) na bexiga e um grupo de animais injetado com onabotA (n=2) ou o seu veículo (n=2) no espaço intratecal (IT) foram perfundidos com um solução de lavagem Tyrode (6,8 g NaCL, 0,40 g KCl, 0,32 g Mg.Cl₂.H₂O, 0,10 g MgSO₄.7H₂O, 0,17 g NaH₂PO₄.H₂O, 1 g glicose, 2,20 g NaHCO₃, perfazer com dH₂O, para 1 L de solução) e com uma solução de fixação (4% (v/v) paraformaldeído, tampão fosfato (PB) 0,1 M).

Para análise ultraestrutural por microscopia eletrónica, um grupo de animais injetado no espaço IT com onabotA (n=2) foi perfundido com tampão fosfato salino a 0,1 M (PBS) e com a solução de fixação anteriormente descrita. Os restantes animais injetados com onabotA (n=2) ou o seu veículo (n=2) no espaço IT foram perfundidos com PBS e com uma solução de fixação (4% (v/v) paraformaldeído, 0,5% (v/v) de glutaraldeído, em PB 0,1 M).

Após perfusão foram recolhidas as bexigas e as porções medulares entre os segmentos T13 e L6, inclusive. O material biológico foi mantido nas respetivas soluções de fixação durante 4 horas e armazenado em sacarose a 30% (material fixado sem glutaraldeído) ou a 8% (m/v) (material fixado com glutaraldeído) em PB 0,1 M.

3. Corte do material biológico

No presente trabalho utilizaram-se dois métodos de corte distintos, cortes em criostato, para análise imunohistoquímica, e cortes em vibratome, para utilização em microscopia eletrónica.

Utilizando um criostato Zeiss Microm® procedeu-se ao corte transversal dos trógonos e dos segmentos medulares L6 de animais injetados na bexiga e no espaço IT. Após inclusão em meio de congelação FSC 22 (Leica Microsystems) os trógonos foram seccionados de forma seriada em cortes de 20 µm de espessura e os segmentos L6 foram seccionados na totalidade em cortes com 40 µm de espessura. Todo o material foi recolhido em lâminas Superfrost™ Plus (Thermo Scientific™).

Segmentos medulares L6 de animais injetados no espaço IT foram embebidos em agar a 0,8% (m/v), seccionados em cortes de 50 µm, utilizando um vibratome Leica®, e recolhidos em PB 0,1 M.

4. Imunohistoquímica e Microscopia

As características dos anticorpos primários e secundários utilizados nas reações de imunohistoquímica encontram-se discriminadas nas **tabelas 4 e 5**. Cada reação imunohistoquímica foi devidamente controlada com os respetivos controlos negativos (animais controlo ou incubação apenas com anticorpo secundário) e positivos (cortes de animais que se sabe à priori que apresentam imunorreação).

Tabela 4: Características dos anticorpos primários utilizados nas reações de imunohistoquímica.

Alvo/ especificação	Diluição	Desenvolvido em	Fabricante
SNAP-25 clivada	1:4000	Coelho	Cedido e produzido por Ornella Rossetto (49)
VAcHt	1:1000	Sheep	Novus Biologicals (Cambridge, RU)
ChAT	1:2000	Cabra	Merk Millipore (Algés, Portugal)
CGRP	1:10000	Murganho	Abcam (Cambridge, RU)
SV2	1:3000	Murganho	DSHB (Iowa, EUA)
NF-H (RT97)	1:1000	Murganho	Merk Millipore (Algés, Portugal)
β3-tubulina	1:2000	Cobaio	SYSY (Goettingen, Alemanha)

Tabela 5: Características dos anticorpos secundários utilizados nas reações de imunohistoquímica.

Alvo/ especificação	Diluição	Desenvolvido em	Fabricante
Coelho/ Alexa Fluor 568	1:1000	Burro	Molecular Probes (Paisley, RU)
Coelho/ Alexa Fluor 488	1:1000	Cabra	Molecular Probes (Paisley, RU)
Murganho/ Alexa Fluor 488	1:1000	Cabra	Molecular Probes (Paisley, RU)
Cobaio/ Alexa Fluor 568	1:1000	Cabra	Molecular Probes (Paisley, RU)
Cabra/ Alexa Fluor 488	1:1000	Burro	Molecular Probes (Paisley, RU)
Coelho/ Biotinilado	1:200	Porco	Dako (Glostrup, Dinamarca)

4.1. Revelação por imunofluorescência

Um conjunto de cortes representativos dos trígonos e dos segmentos L6 foram imunorreagidos contra a SNAP-25 clivada e em simultâneo contra diversos marcadores neuronais. Os anticorpos primários e os respetivos secundários utilizados nas reações de imunohistoquímica encontram-se listados na **Tabela 6**. Os anticorpos secundários foram selecionados de modo a que a espécie para a qual são específicos coincidisse com a espécie na qual os anticorpos primários foram desenvolvidos.

Tabela 6: Anticorpos primários e secundários utilizados nas reações de imunofluorescência.

Anticorpos primários		Anticorpos secundários	
Reação simples	SNAP-25 clivada	Burro anti-coelho 568	
Reações duplas	SNAP-25 clivada	VAcHT	Burro anti-coelho 568
		ChAT	Burro anti-coelho 568
		CGRP	Burro anti-coelho 568
		SV2	Burro anti-coelho 568
		NF-H (RT97)	Burro anti-coelho 568
		β3 tubulina	Burro anti-coelho 488
		Burro anti-cabra 488	Cabra anti-murganho 488
			Cabra anti-cobaio 568

O protocolo utilizado na revelação por imunofluorescência consistiu na lavagem das lâminas com PBS e com tampão fosfato salino 0,1 M contendo 0,3% (v/v) de Triton X-100 (PBST), seguindo-se a incubação em plano em Soro Normal de Cavalo (NHS) a 10% (v/v) em PBST durante 1 hora. Posteriormente, os cortes foram incubados nos anticorpos primários diluídos em NHS a 2% (v/v) em PBST durante 48 horas, em ambiente húmido entre lâmina e lamela a 4°C. Após a incubação as lâminas foram novamente lavadas com PBST, e foram incubadas nos anticorpos secundários diluídos em NHS a 2% (v/v) em PBST durante 1 hora. Por fim, após lavagem com PBST, as lâminas foram montadas com um reagente *antifade* (Molecular Probes).

As lâminas reagidas foram observadas através de um microscópio de fluorescência Zeiss Imager Z1 com filtros adequados aos comprimentos de onda dos fluorocromos Alexa 488 e Alexa 568. A aquisição e o tratamento das imagens foi efetuada com recurso aos programas AxioVision 4.6 e Photoshop CC.

4.2. Revelação com substrato cromogénico

Cortes dos segmentos medulares L6 de animais fixados para microscopia eletrónica foram reagidos com o anticorpo primário anti-SNAP-25 clivada e com o respetivo anticorpo secundário biotilado.

A revelação iniciou-se com a lavagem dos cortes em PBS e com a posterior inibição da peroxidase endógena, utilizando uma solução de peróxido de hidrogénio a 1% (v/v) em PBS durante, 30 minutos. De seguida os cortes foram novamente lavados com PBS e com etanol a 50% (v/v) durante 30 minutos. A incubação em bloco em NHS a 10% (v/v) em PBS durante 1 hora precedeu as 48 horas de incubação em anticorpo primário diluído em NHS a 2% (v/v) em PBS, em ambiente húmido, entre lâmina e lamela e a 4°C. Posteriormente os cortes sofreram sucessivas lavagens com PBS e foram incubados durante 1 hora em anticorpo secundário biotilado diluído em NHS a 2% (v/v) em PBS. Após lavagem com PBS os cortes foram incubados com o complexo avidina-biotina-HRP (ABC Vectastain® Elite Kit, Vector Laboratories, Peterborough, RU) durante e foram novamente lavados com PBS e com tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,6.

A imunorreacção foi revelada utilizando 0,05% (m/v) de tetrahydroclorato de 3,3 diaminobenzidina em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,6 contendo 0,003% (v/v) de peróxido de hidrogénio.

4.3. Revelação para microscopia eletrónica

Após reagidos contra a SNAP-25 clivada e revelados com substrato cromogénico procedeu-se à lavagem dos cortes com PB seguindo-se a incubação numa solução de tetróxido de ósmio a 1% (v/v) em PB durante 2 horas a uma temperatura de 4°C. No final da incubação realizaram-se lavagens sucessivas, à temperatura ambiente com soluções de concentração crescente de etanol entre 70% (v/v) e 100% (v/v). De seguida procedeu-se à incubação dos cortes numa solução de epon e óxido de propileno (Acros Organics) 1:1 durante 20 minutos à temperatura ambiente. No final desse período os cortes foram incubados numa mistura de epon e óxido de propileno 3:1 durante 12 h e posteriormente em epon total durante 20 minutos a 60°C. Os cortes embebidos em epon foram dispostos entre duas lâminas revestidas com dimetildiclorosilano (Sigma-Aldrich) e colocados a 60°C durante 24 h. Os cortes foram posteriormente incluídos em cápsulas de epon, incubadas a 60°C durante 12 h e as cápsulas foram talhadas para realização de cortes ultrafinos utilizando um ultramicrotomo (Reichert Ultracut S, Leica).

Cortes ultrafinos provenientes de cada um dos segmentos medulares foram dispostos em grelhas de cobre para microscopia eletrónica e contrastados com soluções de acetato de uranilo a 4% (m/v) durante 15 minutos e de citrato de chumbo a 0,4% (m/v) durante 10 minutos tendo sido posteriormente lavados.

Captaram-se imagens representativas da região do corno dorsal do segmento medular L6 de cada animal utilizando um microscópio eletrónico de transmissão Jeol JEM 1400.

Parte 2

1. Administração da toxina botulínica do tipo A

Um grupo de 26 murganhos foi anestesiado com isoflurano (indução 5%, manutenção 1,5%) e as bexigas foram externalizadas por laparotomia. Efetuou-se uma injeção única de 0,5 U de onabotA (n=12) ou abobotA (n=12) diluídas em 2 µL de soro fisiológico no músculo detrusor da região superior da cúpula. Como controlo da experiência, 2 ratos receberam apenas soro fisiológico na mesma proporção.

2. Colheita de material biológico

Após 3 dias de recuperação, os animais foram occisados por injeção intraperitoneal de uma sobredose de pentobarbital (Nembutal®, 6 mg/ 100 g de peso corporal) e recolheram-se as bexigas numa solução de fixação de paraformaldeído a 4% (v/v) em PB 0,1M. As bexigas permaneceram na solução de fixação durante 6 horas e posteriormente foram armazenadas numa solução de sacarose a 30% (m/v) em PB.

3. Corte do material biológico

Embebeu-se o material recolhido em meio de congelação FSC 22 (Leica Microsystems) e utilizando um criostato Zeiss Microm® realizaram-se cortes com 20 µm de espessura de toda a extensão das bexigas. Os cortes de cada bexiga foram recolhidos de forma seriada em 10 lâminas Superfrost™ Plus (Thermo Cientific™).

4. Imunohistoquímica e Microscopia

Lâminas representativa da bexiga de cada um dos animais foram lavadas em PBS e de seguida inibiu-se a atividade da peroxidase endógena com uma solução de peróxido de hidrogénio a 1% (v/v) em PBS durante 30 minutos. Os cortes foram novamente lavados com PBS e com PBST e seguiu-se a incubação em bloco em NHS a 10% em PBST durante 1 hora. Incubaram-se os cortes em anticorpo primário anti-SNAP-25 clivada diluído em NHS a 2% em PBST, em ambiente húmido entre lâmina e lamela a 4°C.

Posteriormente os cortes foram lavados com PBST e incubados durante 1 hora em anticorpo secundário biotilado diluído em NHS a 2% em PBST. Após lavagens com PBST os cortes foram incubados com o complexo avidina-biotina-HRP (ABC Vectastain® Elite Kit, Vector Laboratories, Peterborough, RU) durante 1 hora e foram novamente lavados com PBST, PBS e tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,6. A imunorreação foi revelada utilizando 0,05% (m/v) de tetrahidroclorato de 3,3 diaminobenzidina em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,6 contendo 0,003% (v/v) de peróxido de hidrogénio. Após lavagens com tampão Tris-HCl e com PBS os cortes foram desidratados em soluções com concentrações de etanol crescentes (50% (v/v), 70% (v/v), 90% (v/v) e 100% (v/v)) e por fim foram mergulhados em xilol e montados com Eukitt (Sigma-Aldrich, Portugal). As reações foram controladas recorrendo a controlos positivos, cuja presença de cSNAP-25 se conhecia à priori, e a controlos negativos incubados apenas com o anticorpo secundário.

Os resultados das reações foram observados com recurso a um microscópio Zeiss Axioscop 40 equipado com uma câmara digital a cores e as imagens foram captadas utilizando o programa AxioVision 4.6. Foram obtidas imagens correspondentes a 5 cortes representativos de áreas distintas da bexiga de cada murganho (1 imagem da cúpula, 3 imagens do corpo e 1 imagem do triângulo). Essas imagens foram posteriormente montadas com o programa Photoshop CC, tendo-se obtido esquemas correspondentes à totalidade de cada corte. Posteriormente as fibras marcadas com o anticorpo contra a SNAP-25 clivada foram delineadas e contadas de forma alheia aos grupos experimentais.

5. Análise estatística

Para o cálculo do número médio de fibras imunorreativas contra a SNAP-25 clivada consideraram-se apenas 9 animais tratados com OnabotA e 9 animais tratados com AbobotA, tendo-se excluído os 3 animais de cada grupo com menor número total de fibras imunorreativas na bexiga.

Os gráficos foram desenhados com recurso ao programa Microsoft Excel e para análise estatística recorreu-se ao *software* GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) tendo-se utilizado o teste t não emparelhado. Os resultados consideraram-se estatisticamente significativos quando $p \leq 0,05$.

IV. Resultados

Parte 1

1. Expressão de SNAP-25 clivada na bexiga e na medula após administração de onobotulinumtoxinA no detrusor

Três dias após a administração de 10 U de onabotA no músculo detrusor observou-se imunorreação contra a SNAP-25 clivada ao longo de toda a bexiga, fundamentalmente na camada muscular e em menor extensão na mucosa (**Figura 7A**). Adicionalmente, a análise do segmento medular L6 permitiu concluir que após administração periférica, no músculo detrusor, a toxina cliva a proteína SNAP-25 na medula (**Figura 7B**). Contudo, apesar de a toxina exercer um efeito bastante marcado no local de aplicação, que se traduz pela presença de uma grande quantidade de fibras imunorreativas contra a cSNAP-25 em toda a extensão da bexiga, no sistema nervoso central o mesmo não se verificou. A escassez de imunorreação no segmento medular L6 indica que após administração de 10 U na bexiga o efeito da toxina é pouco evidente ao nível desse segmento.

No grupo de animais controle, injetados com soro na bexiga, não se observou imunorreação contra a SNAP-25 clivada na bexiga e no segmento L6.

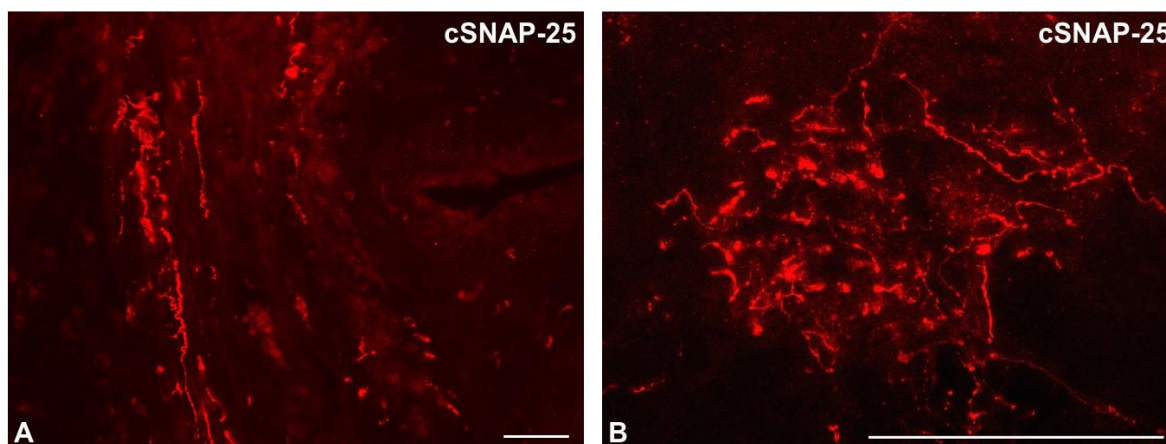


Figura 7: Expressão de SNAP-25 clivada na bexiga e na medula três dias após administração de onobotulinumtoxinA no músculo detrusor. A representa a expressão de SNAP-25 clivada na bexiga e B representa a expressão de SNAP-25 clivada no segmento medular L6. As barras de calibração representam 50 µm.

2. Distribuição da SNAP-25 clivada no segmento medular L6 após administração periférica e central de onobotulinumtoxinaA

O estudo da distribuição das fibras imunorreativas contra a SNAP-25 clivada no segmento L6 foi realizado três dias após a administração de 10 U ou de 5 U de onobotulinumtoxinaA no músculo detrusor ou no espaço intratecal, respetivamente. A imunorreação contra a SNAP-25 clivada foi observada nos dois grupos de animais tratados, tendo-se concluído que após administração intratecal a quantidade de fibras que expressavam SNAP-25 clivada no segmento L6 foi visivelmente superior à observada nos animais injetados na bexiga.

Adicionalmente, a localização da imunorreação em L6 mostrou ser independente da via de administração, sendo que os dois grupos de animais tratados exibiram marcação de cSNAP-25 nas lâminas superficiais I e II do corno dorsal (**Figura 8A, B**), bem como na comissura dorsal e no corno ventral (**Figura 8C, D**).

Os animais controlo injetados com soro no músculo detrusor ou no espaço intratecal não apresentaram imunorreação contra a SNAP-25 clivada (**Figura 9**).

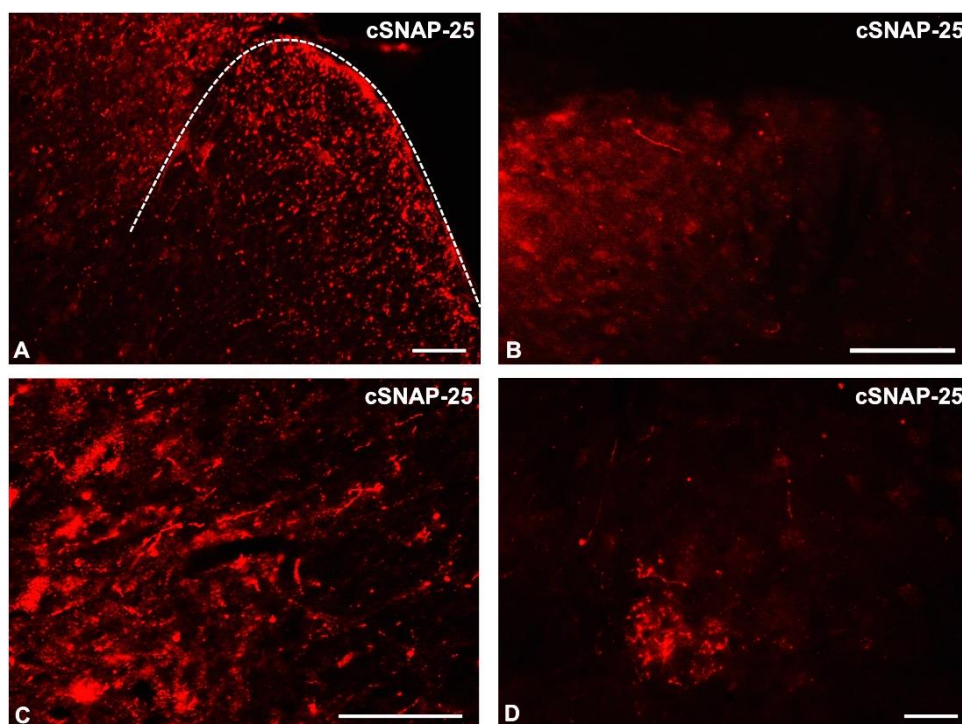


Figura 8: Distribuição da SNAP-25 clivada no segmento medular L6 três dias após administração de onobotulinumtoxinaA por via intratecal ou no detrusor. A e B representam a expressão de SNAP-25 clivada no corno dorsal após administração intratecal e no detrusor, respetivamente. **C e D** representam a expressão de SNAP-25 clivada no corno ventral após administração intratecal e no detrusor, respetivamente. As barras de calibração representam 50 µm.

3. Conteúdo neuroquímico das fibras que expressam SNAP-25 clivada no segmento medular L6

O estudo do conteúdo neuroquímico das fibras que expressam SNAP-25 clivada presentes no segmento medular L6 foi desenvolvido em animais injetados com 10 U de onabotA no músculo detrusor ou 5 U de onabotA no espaço intratecal. Para tal recorreu-se a reações de imunofluorescência duplas nas quais se utilizaram anticorpos primários contra a SNAP-25 clivada e contra marcadores neuronais específicos. Os marcadores considerados para o estudo foram o transportador vesicular da acetilcolina (VACHT), a enzima colina-acetiltransferase (ChAT), o péptido relacionado com o gene da calcitonina (CGRP), a glicoproteína membranar associada a vesículas 2 (SV2), a proteína constituinte dos microtúbulos β 3-tubulina (β 3-Tub), a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e o anticorpo do neurofilamento-H (RT97).

É de salientar que as reações foram devidamente controladas e que os animais injetados com soro fisiológico quer na bexiga quer no espaço intratecal não exibiram imunorreação contra a cSNAP-25 (**Figura 9**).

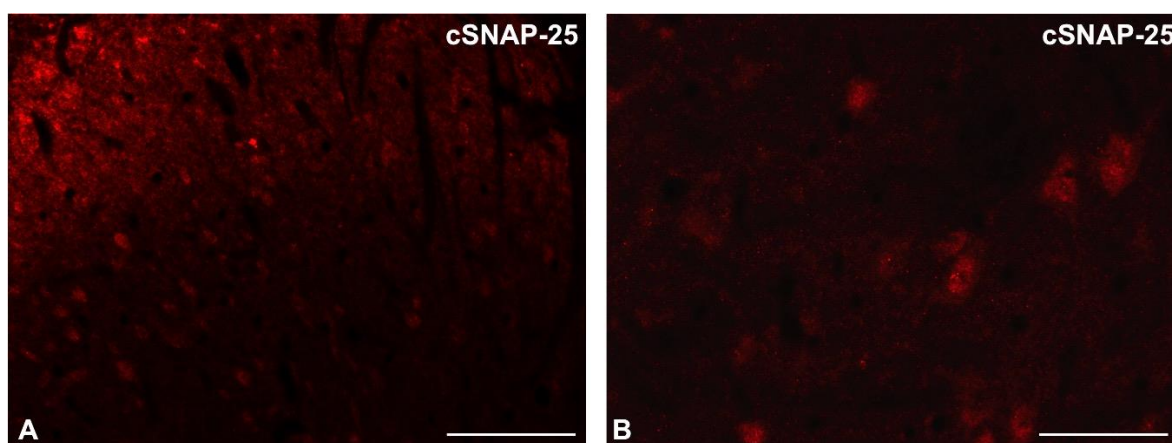


Figura 9: Ausência de imunorreação contra a SNAP-25 clivada no segmento medular L6 após administração de soro fisiológico por via intratecal. **A** representa a região do corno dorsal e **B** representa a região do corno ventral. Notar a presença de autofluorescência em alguns corpos celulares que não corresponde a marcação específica da SNAP-25 clivada. As barras de calibração representam 50 μ m.

3.1. Expressão de SNAP-25 clivada e de VAcChT ou ChAT

No sentido de determinar se a onabotA atua ao nível das fibras colinérgicas parassimpáticas presentes no segmento medular L6 recorreu-se à marcação simultânea da SNAP-25 clivada, produto da ação da toxina, e do VAcChT ou da enzima ChAT.

Após a administração da toxina observou-se a presença de SNAP-25 clivada em alguns botões sinápticos que expressam VAcChT, bem como a presença de marcação exclusiva de a SNAP-25 clivada e de VAcChT (**Figura 10**).

Uma vez que o VAcChT marca maioritariamente terminações nervosas de fibras colinérgicas, recorreu-se também à marcação de ChAT com o objetivo de determinar se a SNAP-25 clivada estava presente nos corpos celulares dessas mesmas fibras. Não se observou colocalização da cSNAP-25 com ChAT (**Figura 11**). Contudo, verificou-se que as fibras cSNAP-25 positivas se encontravam a circundar os corpos celulares dos motoneurónios presentes no corno ventral do segmento medular L6 (**Figura 11**).

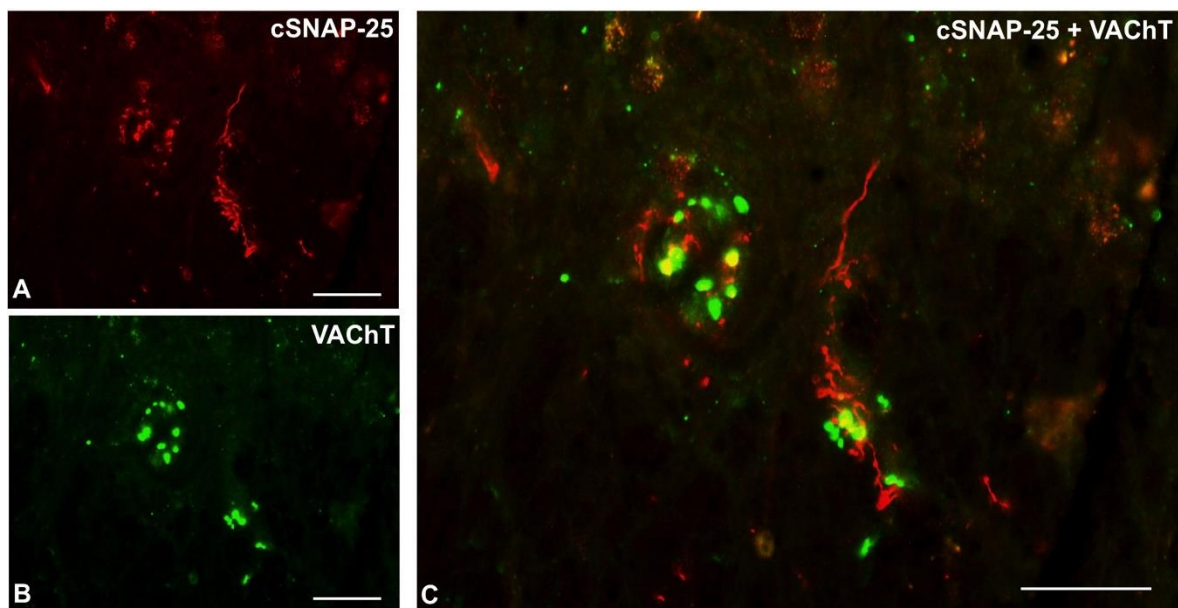


Figura 10: Distribuição da SNAP-25 clivada em fibras colinérgicas marcadas contra o transportador vesicular da acetilcolina no corno ventral do segmento medular L6 após administração intratecal de **OnobotulinumtoxinA**. **A** representa a distribuição da SNAP-25 clivada, **B** representa a distribuição de VAcChT e **C** correspondem à sobreposição de A e B. Notar a presença de colocalização (amarelo) em C. As barras de calibração representam 50 μ m.

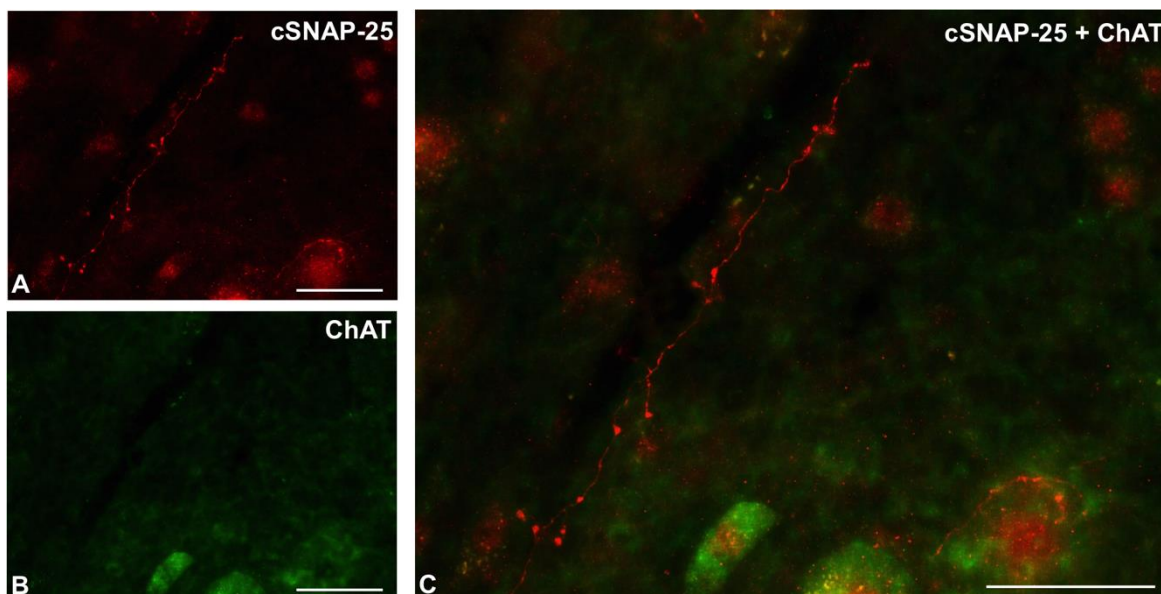


Figura 11: Distribuição da SNAP-25 clivada em fibras colinérgicas marcadas contra a acetiltransferase de colina no corno ventral do segmento medular L6 após administração intratecal de **OnobotulinumtoxinA**. **A** representa a distribuição da SNAP-25 clivada, **B** representa a distribuição de VACHT e **C** correspondem à sobreposição de A e B. Notar ausência de colocalização em C. As barras de calibração representam 50 μm .

3.2. Expressão de SNAP-25 clivada e de CGRP

Para além da ação da toxina em fibras parassimpáticas também se considerou a hipótese da toxina atuar em fibras sensitivas peptidérgicas, tendo-se utilizado o CGRP como marcador específico desse tipo de fibras. A ausência de colocalização da SNAP-25 clivada e do CGRP permitiu concluir que a toxina não atua nos terminais das fibras peptidérgicas, maioritariamente presentes nas lâminas superficiais do corno dorsal (**Figura 12A, B e C**), nem nos corpos celulares dos motoneurónios observados no corno ventral (**Figura 12D, E e F**) do segmento L6.

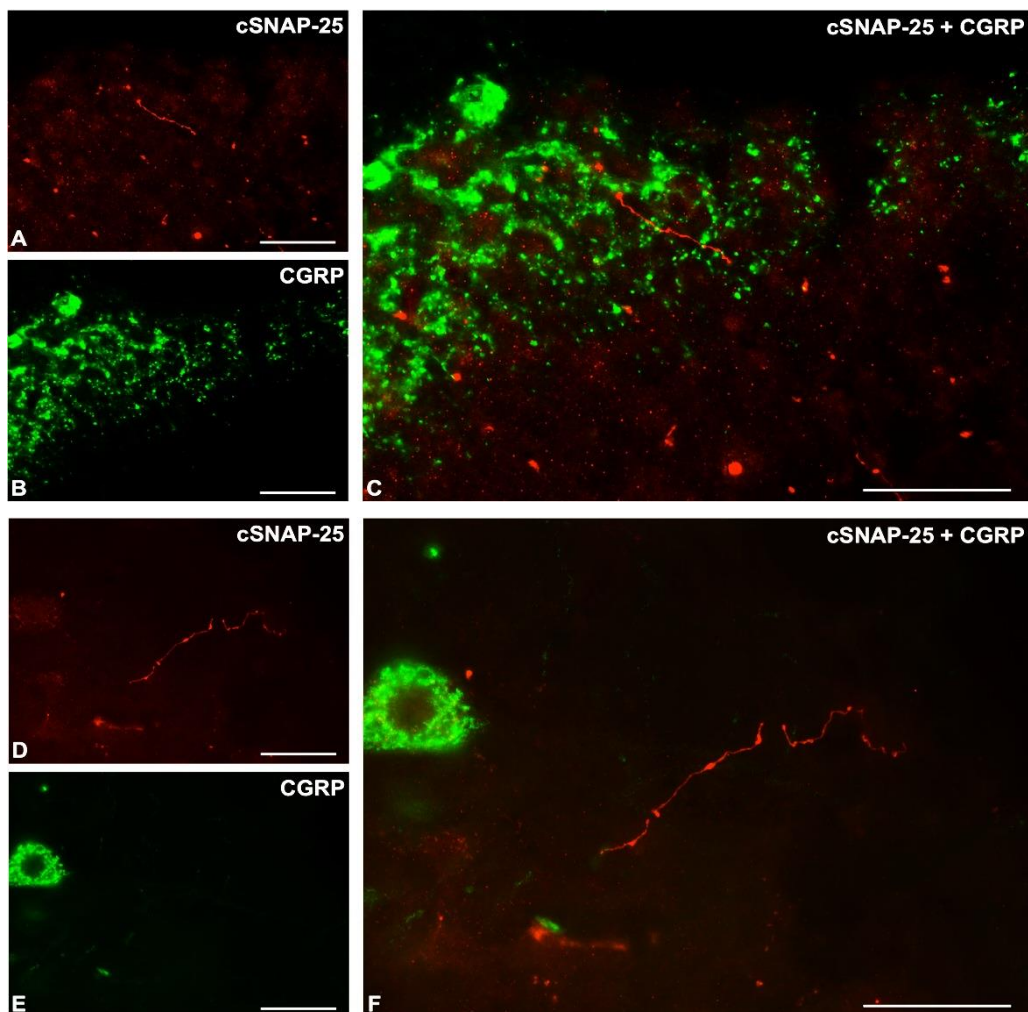


Figura 12: Distribuição da SNAP-25 clivada e de fibras peptidérgicas marcadas contra o péptido relacionado com o gene da calcitonina no segmento medular L6 após administração intratecal de **OnobotulinumtoxinA**. **A**, **B** e **C** correspondem a uma zona do corno dorsal e **D**, **E** e **F** correspondem a uma zona do corno ventral. **A** e **D** representam a distribuição da SNAP-25 clivada, **B** e **E** representam a distribuição de CGRP e **C** e **F** correspondem à sobreposição de **A** e **B** e de **D** e **E**, respetivamente. Notar a ausência de colocalização em **C** e **F**. As barras de calibração representam 50 μm .

3.3. Expressão de SNAP-25 clivada e de SV2

O SV2 foi descrito como sendo o recetor específico do serotipo A da toxina botulínica pelo que se considerou importante determinar a expressão dessa proteína específica das vesículas sinápticas ao nível do segmento L6 e verificar se colocalizava com a forma clivada da SNAP-25.

A imunorreacção contra o SV2 foi observada em L6, ao nível corno dorsal (**Figura 13B**), contudo, a colocalização com a SNAP-25 clivada foi inexistente (**Figura 13C**).

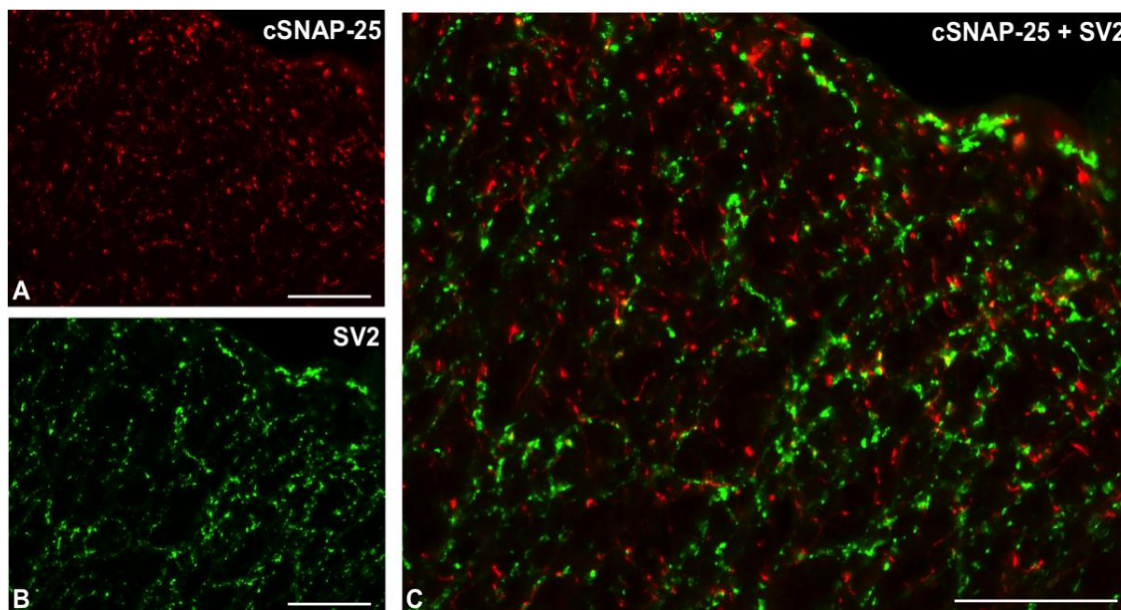


Figura 13: Expressão de SNAP-25 clivada e do recetor molecular específico da toxina botulínica do tipo A SV2 no segmento medular L6 após administração intratecal de OnabotulinumtoxinA. A representa a distribuição de SNAP-25 clivada no corno dorsal, **B** representa a distribuição do recetor SV2 no corno dorsal e **C** representa a sobreposição de A e B. Notar a ausência de colocalização em C. As barras de calibração representam 50 μ m.

3.4. Expressão de SNAP-25 clivada e de β 3-tubulina

O anticorpo contra a β 3-tubulina foi utilizado como marcador pan-neuronal uma vez que essa proteína é um constituinte específico dos microtúbulos de neurónios.

A observação por imunofluorescência da reação dupla contra a SNAP-25 clivada e contra a β 3-tubulina permitiu concluir que na medula as proteínas não colocalizam (**Figura 14C e F**). Para além disso, verificou-se que a imunorreação contra o marcador neuronal parece ser mais evidente na substância branca da região dorsal (**Figura 14B e C**), contrariamente à imunorreação contra a SNAP-25 clivada que é maioritária na substância cinzenta dessa mesma região (**Figura 14A e C**).

No corno ventral do segmento L6 foi também detetada imunorreação contra a β 3-tubulina (**Figura 14E**) e contra a forma clivada da proteína SNAP-25 (**Figura 14D**) contudo, assim como no corno dorsal, não se verificou colocalização dos dois marcadores (**Figura 14F**).

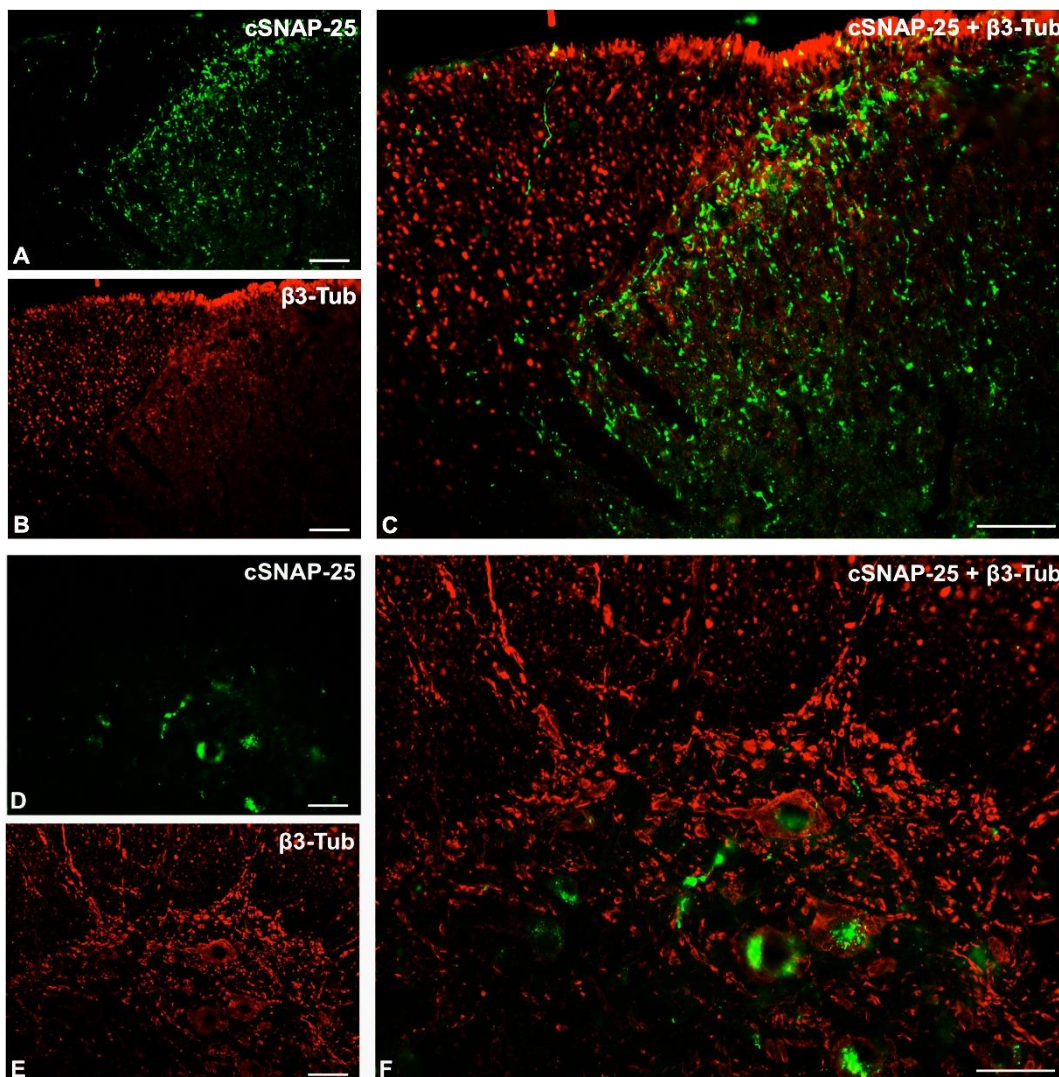


Figura 14: Expressão da SNAP-25 clivada e do marcador pan-neuronal β 3-tubulina no segmento medular L6 após administração intratecal de OnobotulinumtoxinA. **A e D** representam a dispersão de SNAP-25 clivada no corno dorsal e ventral, respectivamente, **B e E** representam a dispersão de β 3-tubulina no corno dorsal e ventral, respectivamente e **C e F** representam a sobreposição entre de A e B e de D e E, respectivamente. As barras de calibração representam 50 μ m.

3.5. Expressão de SNAP-25 clivada e de RT97

O anticorpo RT97 reconhece epítomos fosforilados de neurofilamentos pesados com 200 kDa (NF-H), que são constituintes do citoesqueleto neuronal, e são abundantes nos axônios do sistema nervoso central e periférico. Assim, no presente estudo, esse marcador foi utilizado juntamente com o anticorpo contra a SNAP-25 clivada no sentido de avaliar a presença de SNAP-25 clivada em axônios do segmento medular L6.

Contudo, não se observou colocalização da SNAP-25 clivada com o RT97 nem na região do corno dorsal (**Figura 15A, B e C**) nem no corno ventral (**Figura 15D, E e F**).

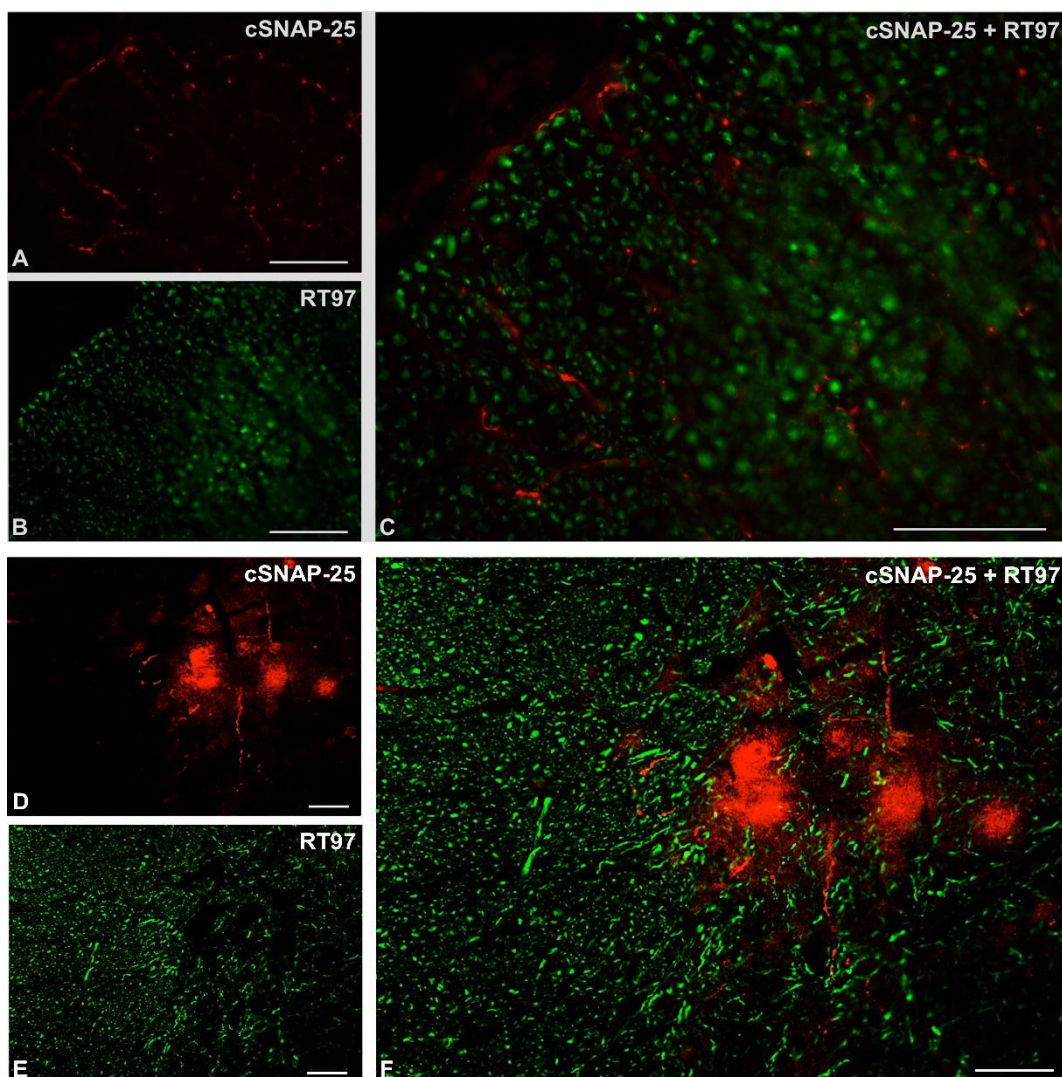


Figura 15: Expressão da SNAP-25 clivada e do marcador de neurofilamentos fosforilados RT97 no segmento medular L6 após administração intratecal de OnabotulinumtoxinA. A e D representam a distribuição da SNAP-25 clivada no corno dorsal e ventral respectivamente, B e E representam a distribuição do RT97 no corno dorsal e ventral respectivamente e a C e F corresponde à sobreposição entre A e B e D e E, respectivamente. As barras de calibração representam 50 μm .

3.6. Expressão de SNAP-25 clivada e de GFAP

Tendo em conta a ausência de colocalização com os marcadores neuronais descritos e a posição adjacente das fibras que expressam SNAP-25 clivada em relação às fibras que expressam esses marcadores surgiu a hipótese de que a toxina poderia estar a atuar em astrócitos que preenchem o espaço entre os neurónios. Assim, estudou-

se a expressão de SNAP-25 clivada e de GFAP, um filamento intermédio expresso por células do sistema nervoso central como os astrócitos e as células ependimais, no segmento medular L6.

Mais uma vez, a ausência de colocalização indica que o produto de ação da onabotA também não se encontra em células da glia (**Figura 16C**).

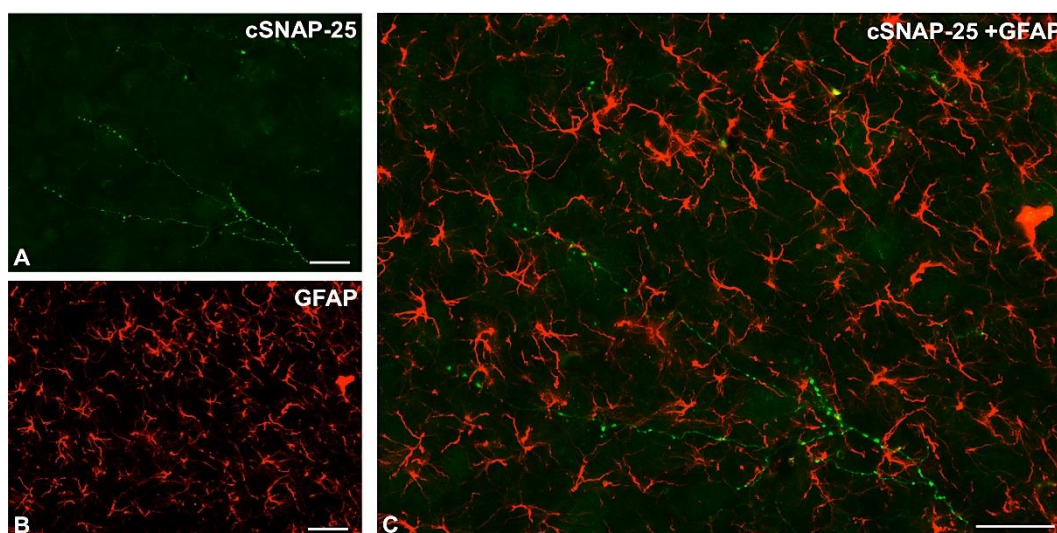


Figura 16: Expressão de SNAP-25 clivada e do marcador de astrócitos GFAP no segmento medular L6 após administração intratecal de OnabotulinumtoxinA. A representa a distribuição de SNAP-25 clivada, B representam a distribuição de GFAP e C representa a sobreposição de A e de B. As barras de calibração representam 50 μm .

4. Ultraestrutura do segmento medular L6 após administração intratecal de onabotulinumtoxinA

A ausência de colocalização da forma clivada da proteína SNAP-25 com os diversos marcadores neuronais específicos, levou a que se colocasse a hipótese de que as fibras centrais afetadas pela toxina pudessem estar alteradas ou degeneradas. Assim, tornou-se fundamental analisar a ultraestrutura do segmento medular L6 de animais injetados no espaço IT com onabotA em comparação com animais controlo.

Os resultados obtidos por microscopia eletrónica sugerem que não existem diferenças significativas entre as estruturas medulares dos animais injetados por via intratecal com o produto onabotA (**Figura 17A e B**) e os animais controlo injetados por via intratecal com soro fisiológico (**Figura 17C e D**). Note-se a presença de sinapses no tecido medular dos dois grupos de animais testados e a maior quantidade de vesículas justapostas à membrana pré-sináptica nos animais tratados com onabotA (**Figura 17B e D**). É ainda de

salientar que a análise pormenorizada das imagens permitiu detetar um maior número de mitocôndrias no tecido nervoso dos animais tratados com a toxina.

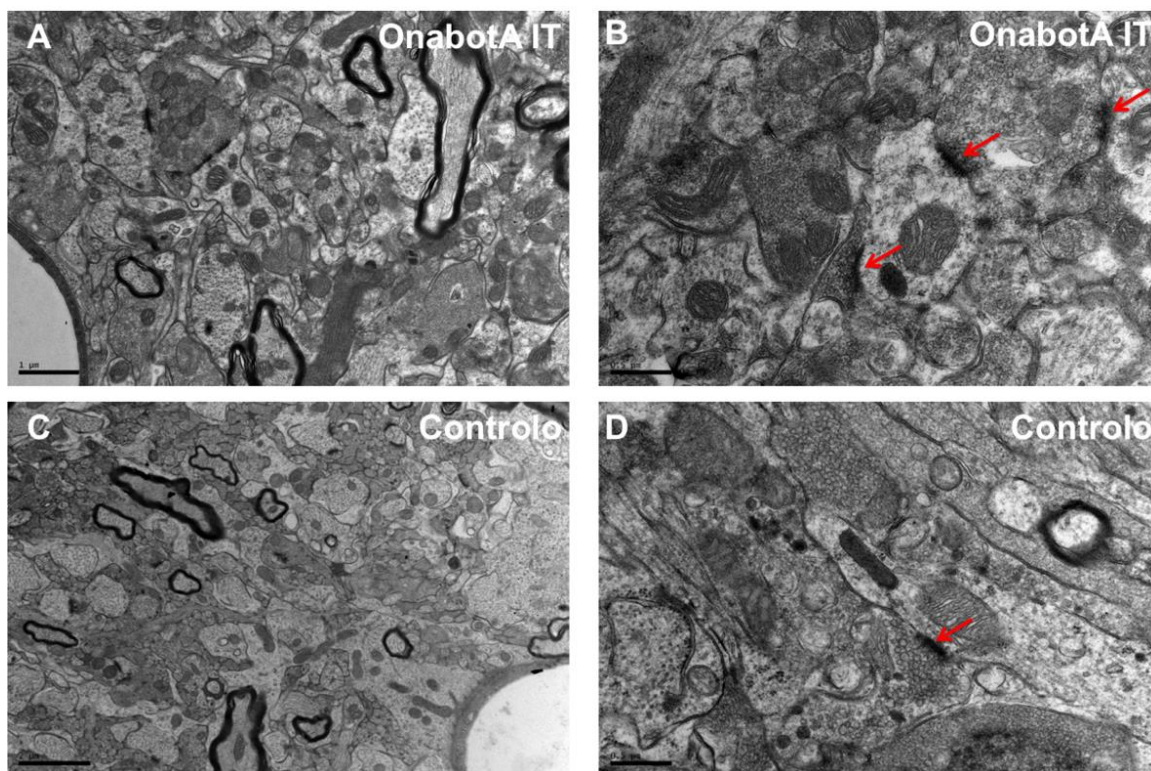


Figura 17: Ultraestrutura do corno dorsal do segmento L6 de animais tratados com onabotulinumtoxinA intratecal e de animais controlo. **A** e **B** correspondem a animais tratados com onabotA; **C** e **D** correspondem a animais controlo. Notar a semelhança entre as imagens A e C e B e D, respetivamente e a presença de um maior número de vesículas sinápticas justapostas à membrana pré-sináptica nos animais tratados com onabotA. As setas a vermelho representam locais de sinapse. As barras de calibração representam 0,5 μm (direita), 1 μm (cima, esquerda); 2 μm (baixo, esquerda).

Adicionalmente, a localização da imunorreação contra a cSNAP-25 no segmento medular L6 permitiu concluir que a proteína está presente em estruturas vesiculares que não aparentam ter alterações estruturais (**Figura 18**). Os animais controlo não apresentaram imunorreação contra a SNAP-25 clivada.

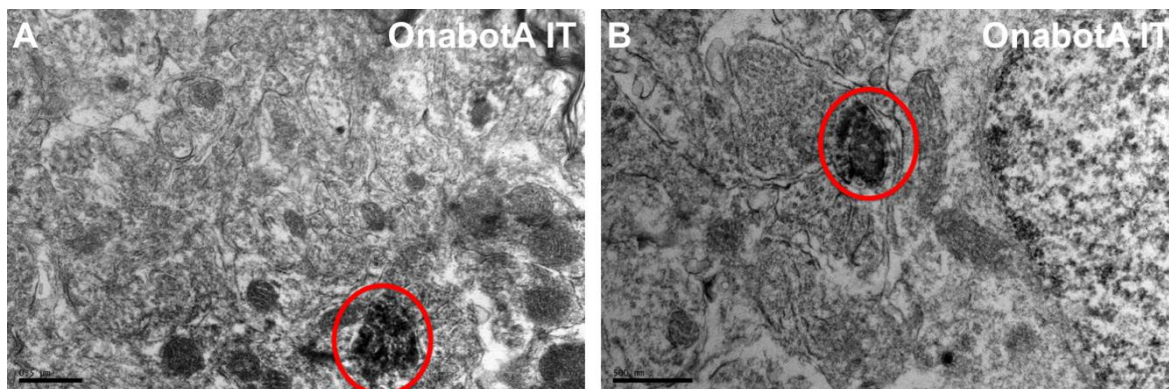


Figura 18: Ultraestrutura e expressão da SNAP-25 clivada no corno dorsal do segmento L6 de animais tratados com onobotulinumtoxinA intratecal. A e B representam a distribuição da SNAP-25 clivada em vesículas sinápticas presentes no segmento medular L6. Notar a preservação da ultraestrutura nos animais tratados e a expressão de SNAP-25 clivada em botões sinápticos (rodeados a vermelho). As barras de calibração representam 0,5 μ m.

Parte 2

Comparação da potência relativa da onabotulinumtoxinA e da abobotulinumtoxinA quando administradas no detrusor

Três dias após a injeção única de 0,5 U de onabotulinumtoxinA ou abobotulinumtoxinA diluídas em 2 µL de soro fisiológico na região superior da cúpula, todos os animais (n=24) apresentavam imunorreação contra a SNAP-25 clivada nas secções de bexiga analisadas (**Figura 19**). É de salientar que na maioria dos animais a imunorreação foi mais evidente no corpo da bexiga e na zona superior do trígono. Os animais controlo (n=2), injetados com soro fisiológico, não apresentaram imunorreação contra a SNAP-25 clivada.

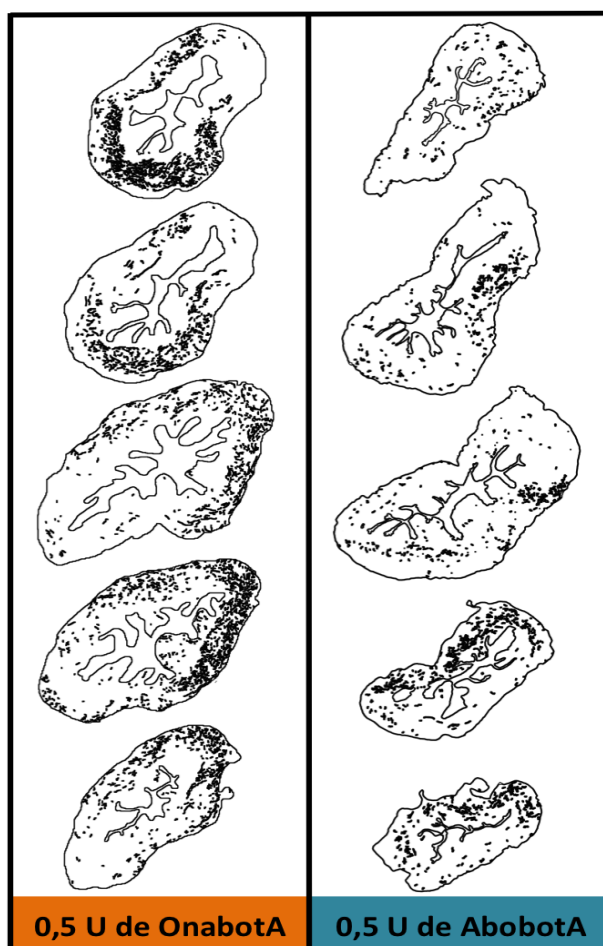


Figura 19: Distribuição das fibras imunorreativas contra a SNAP-25 clivada na bexiga de animais injetados na cúpula com 0,5 U de onabotulinumtoxinA e abobotulinumtoxinA. De cima para baixo estão representados cortes da região superior da cúpula, local próximo da injeção, até à região inferior do trígono, correspondentes a cada grupo experimental.

A contagem do número total de fibras nos cortes representativos da bexiga de cada animal evidenciou que a maioria dos animais injetados com OnabotA apresenta um maior número de fibras imunorreativas contra a SNAP-25 clivada quando comparados com os animais injetados com AbobotA (**Figura 20**).

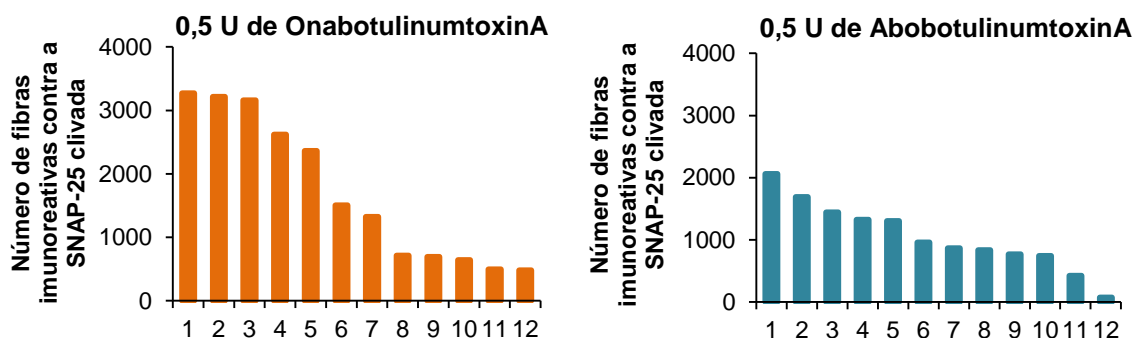


Figura 20: Número de fibras imunorreativas contra a SNAP-25 clivada na bexiga de cada animal tratado com 0,5 U de onabotulinumtoxinA ou abobotulinumtoxinA. Os gráficos representam o número total de fibras imunorreativas contra a SNAP-25 clivada nos 5 cortes representativos da bexiga de cada animal tratado com onabotulinumtoxinA (n=12) (Gráfico da esquerda, a laranja) e com abobotulinumtoxinA (n=12) (Gráfico da direita, a azul).

A média do número total de fibras imunorreativas contra a SNAP-25 clivada na bexiga dos animais tratados com OnabotA ou com AbobotA foi de 2095 ± 1056 e de 1249 ± 437 , respectivamente (**Figura 21**). Estes resultados sugerem que a formulação OnabotA apresenta uma potência relativa 1,7 vezes superior à da AbobotA.

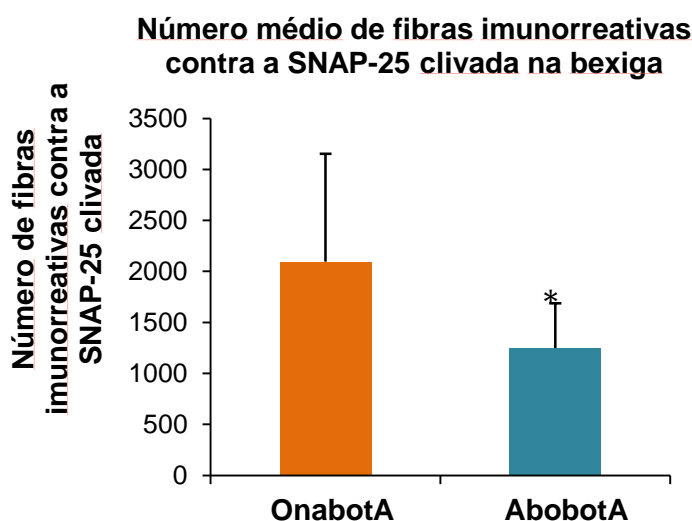


Figura 21: Número médio de fibras imunorreativas contra a SNAP-25 clivada na bexiga de animais tratados com 0,5 U onabotulinumtoxinA ou abobotulinumtoxinA. Foram analisados 5 cortes da bexiga de cada animal. A diferença é estatisticamente significativa (*p<0,05); As barras de erro mostram o desvio padrão.

V. Discussão

Considerações gerais

A presente tese centra-se no estudo da ação da toxina botulínica do tipo A, tendo o seu efeito sido avaliado através da análise da expressão da proteína SNAP-25 na sua forma clivada, resultante da ação proteolítica da toxina. Esta abordagem tem vindo a ser utilizada em numerosos trabalhos, sendo considerada eficaz e ideal para este tipo de estudos (82).

1. Modelos experimentais

Os objetivos do presente trabalho exigiram a utilização de animais como modelos experimentais pelo que se optou pela utilização de ratos da estirpe Wistar e murganhos da estirpe C57Bl6. Ambas as estirpes são bem definidas e amplamente utilizadas em projetos de investigação na área da urologia, sendo a anatomia e a fisiologia do sistema urinário semelhantes às do ser humano. Adicionalmente, a possibilidade de induzir sintomas característicos de patologias do trato urinário humano bem como a sensibilidade à ação da BoNT/A torna esses modelos adequados à investigação da ação da toxina para fins urológicos (83).

As duas espécies consideradas são de fácil manutenção e manipulação, contudo ambas apresentam vantagens e desvantagens. Assim, na primeira parte do trabalho utilizou-se como modelo o rato uma vez que as maiores dimensões facilitam a injeção da toxina tanto no músculo detrusor como no espaço intratecal, minimizando os erros relativos à sua administração. Por sua vez, a escolha do murganho como modelo para o estudo da potência deveu-se sobretudo à homogeneidade da estirpe C57Bl6, que sendo uma estirpe *inbred* garante uma variabilidade mínima entre as unidades experimentais e favorece a reprodutibilidade das experiências. Também a maior sensibilidade à ação da toxina, a necessidade de utilizar uma dose menor e a facilidade de manter um maior número de animais surgiram como vantagens para a utilização do murganho.

2. Serotipo e formulações da toxina botulínica do tipo A

A comercialização de apenas dois serotipos da toxina botulínica, o A e o B, e a utilização maioritária do primeiro na prática clínica e de investigação fundamentam a escolha do serotipo A como alvo dos estudos desenvolvidos na presente tese.

Considerando as formulações de BoNT/A disponíveis no mercado optou-se pelo estudo dos efeitos centrais decorrentes da aplicação periférica e central da onabotulinumtoxinA, uma vez que esta se encontra bem descrita e é a maioritariamente utilizada. Contudo, a crescente utilização clínica e o elevado número de estudos efetuados com abobotulinumtoxinA desencadearam a necessidade de comparar as potências relativas dessa formulação e da onabotA (41,75).

3. Doses da toxina botulínica do tipo A

A formulação onabotulinumtoxinA é indicada para o tratamento de diversas condições urológicas e as doses aconselhadas e frequentemente utilizadas num indivíduo adulto variam entre 100 e 300 U (84,85). Assim, considerando a maior dose descrita e o peso normal de um adulto como sendo 70 kg, a dose correspondente para um rato com 250 g é de cerca de 1 U.

Uma vez que o rato apresenta uma certa resistência à ação da toxina, no presente trabalho utilizou-se uma dose 10 vezes maior do que a dose calculada, tendo-se optado pela sua administração em dez injeções de 10 µL contendo 1 U de toxina, por toda a extensão do detrusor. Estudos preliminares não publicados mostraram que após a administração dessa dose o efeito da toxina é bastante pronunciado em toda a extensão da bexiga e visível ao nível do sistema nervoso central. Quanto à administração pela via intratecal foi escolhida a dose de 5 U diluída em 50 µL de soro, uma vez que foi utilizada num trabalho recente e mostrou ser eficaz na clivagem da SNAP-25 no segmento L6 da medula, bem como na bexiga (81).

Na segunda parte do trabalho, após comparação do efeito de diferentes doses e volumes, concluiu-se que 0,5 U de onabotA diluídas em 2 µL de soro era a menor dose passível de ser administrada que assegurava alguma reprodutibilidade e que foi capaz de afetar toda a extensão da bexiga do murganho. Pelo que se estabeleceu essa dose para ser administrada nos dois grupos experimentais.

4. Duração das experiências

Após a administração da toxina os animais foram mantidos durante 3 dias após os quais foram occisados. Este intervalo de tempo foi escolhido com base em estudos anteriores que evidenciam que o efeito da onabotA no sistema nervoso central é crescente no intervalo de tempo entre as 4 horas e as 72 horas após aplicação (81). Três dias após a aplicação da toxina observa-se uma quantidade elevada de SNAP-25 clivada no segmento medular L6 que se mantém até 1 mês após o tratamento com a toxina (resultados não mostrados).

Parte 1

1. Transporte axonal e expressão de SNAP-25 no segmento medular L6

A administração de 10 U de onabotA no detrusor resultou na clivagem da proteína SNAP-25 na camada muscular e na mucosa da bexiga, bem como no segmento espinhal L6. Estes resultados evidenciam a capacidade da toxina sofrer transporte axonal após injeção na bexiga, o que surge em concordância com outros estudos que demonstram o transporte axonal da toxina ou do seu produto de ação, a SNAP-25 clivada, para o sistema nervoso central após aplicação na periferia (49,50,60). Contudo, após injeção no detrusor o efeito da toxina ao nível do segmento L6 foi pouco pronunciado, o que se traduz na escassez de SNAP-25 clivada.

No sentido de potenciar o efeito da toxina a nível central, considerou-se a via de administração intratecal, que surgiu recentemente como alternativa no tratamento da dor associada à cistite (81). A administração de 5 U de onabotA por via intratecal resultou na clivagem de uma elevada quantidade de cSNAP-25 no segmento medular L6, o que evidencia um efeito marcado da toxina decorrente da aplicação direta no sistema nervoso central.

Tendo em conta a localização da imunorreação contra a SNAP-25 clivada no segmento medular L6, observada após administração periférica e central de onabotA, conclui-se que, independentemente da via de aplicação, o produto da ação da toxina é maioritariamente detetado nas lâminas I e II do corno dorsal. Este resultado sugere um efeito predominante na região da substância gelatinosa, que se caracteriza pela presença de aferentes primários de pequeno diâmetro não mielinizados e de diâmetro médio mielinizados envolvidos na nocicepção (86).

2. Conteúdo neuroquímico das fibras afetadas pela toxina botulínica do tipo A no segmento medular L6

O efeito da BoNT/A na inervação da bexiga é particularmente bem definido sabendo-se que a maioria das fibras parassimpáticas são alvo de ação da toxina e que cerca de metade das fibras sensitivas peptidérgicas e simpáticas são também afetadas (82,87). No sistema nervoso central o conteúdo neuroquímico das fibras afetadas nunca foi estudado, pelo que constituiu um dos objetivos da presente tese. Assim, neste trabalho procurou-se estabelecer uma relação entre o produto de clivagem da toxina e diversos marcadores neuronais específicos através do recurso a técnicas de imunohistoquímica.

Contrariamente ao que foi observado na periferia, no segmento L6 a cSNAP-25 surge apenas em alguns botões sinápticos, marcados com o transportador vesicular da acetilcolina, e não em aferentes primários sensitivos que expressam CGRP. Adicionalmente, a análise simultânea da expressão da enzima ChAT e da cSNAP-25 permitiu concluir que o produto de ação da toxina não está presente no corpo celular de neurónios colinérgicos, o que corrobora a ideia de que esse produto é restrito a fibras nervosas (82). Estas evidências sugerem que a toxina cliva a proteína SNAP-25 em algumas terminações nervosas de neurónios colinérgicos presentes no segmento L6 da medula, e não em fibras sensitivas peptidérgicas. Estes resultados não eram espectáveis tendo em conta o efeito antinociceptivo da toxina anteriormente evidenciado (81).

O SV2 foi descrito como sendo o recetor específico do serotipo A da toxina botulínica e na bexiga é expresso em fibras parassimpáticas, simpáticas e sensitivas, em conjunto com a SNAP-25 (27,88). Neste estudo, a ausência de colocalização do SV2 com a SNAP-25 clivada sugere a presença de alterações no recetor, após ação da BoNT/A, que impedem o seu reconhecimento pelo anticorpo específico.

Para além dos marcadores descritos analisou-se a expressão de β 3-tubulina, uma proteína globular expressa exclusivamente em neurónios, e de RT97, um marcador específico de neurofilamentos, em simultâneo com a SNAP-25 clivada. A ausência de colocalizações no segmento L6 sugere que o alvo da toxina botulínica do tipo A não está presente em toda a extensão dos neurónios dessa região. Por outro lado, existe a possibilidade de terem ocorrido alterações nos neurónios afetados pela toxina que impeçam o reconhecimento dos seus constituintes específicos.

Tendo em conta as evidências que sugerem que a toxina possa atuar em células da neurógliia (89) estudou-se a expressão de SNAP-25 clivada e de GFAP, um marcador de

astrócitos. Contudo, a colocalização foi inexistente sugerindo que a BoNT/A não tem qualquer efeito nos astrócitos do segmento L6.

Através da análise global dos resultados conclui-se que a toxina desempenha um efeito catalítico ao nível da proteína SNAP-25 no segmento L6 da medula espinal. Contudo, o estudo do conteúdo neuroquímico das fibras afetadas não foi conclusivo porque um elevado número de fibras que expressam cSNAP-25 não expressam qualquer outro marcador testado. Este facto surgiu como incentivo à análise ultraestrutural dessas fibras, uma vez que alterações estruturais podem constituir o motivo da não expressão ou não reconhecimento por anticorpos específicos de estruturas do sistema nervoso.

3. Ultraestrutura das fibras afetadas pela toxina botulínica do tipo A no segmento medular L6

Os estudos ultraestruturais focaram-se na análise das lâminas I e II do corno dorsal do segmento medular L6 de animais tratados com onabotA intratecal e de animais controlo, o que se deveu à anterior observação predominante de SNAP-25 clivada nessa região.

A morfologia dos constituintes neuronais manteve-se praticamente inalterada após a administração intratecal da toxina botulínica do tipo A, o que se traduz pela semelhança das imagens obtidas por microscopia eletrónica dos grupos de animais tratados e controlo. Em ambos os grupos foi possível visualizar sinapses e a marcação com o anticorpo contra a SNAP-25 clivada foi observada exclusivamente nos animais tratados com a toxina e apenas em terminais nervosos pré-sinápticos com conteúdo vesicular. Estas observações fundamentam a ideia de que a inibição da libertação de neurotransmissores no sistema nervoso central pode efetivamente relacionar-se com o efeito analgésico da toxina (90).

À semelhança do que foi descrito em 2000 por Schiavo *et al.* (24), observou-se no presente estudo um aumento do número de vesículas sinápticas adjacentes à membrana pré-sináptica dos neurónios de animais tratados com a toxina. Este resultado sugere que a OnabotA atua em terminais nervosos do segmento L6.

O elevado número de mitocôndrias no meio intracelular dos neurónios observado apenas no grupo de animais tratados pode relacionar-se com a alteração de constituintes neuronais essenciais ao bom funcionamento dos axónios, comprometendo a sua função de transporte (91). Assim, a acumulação de mitocôndrias pode ser indicativa de danos resultantes da ação da toxina.

Parte 2

A atividade biológica das formulações da toxina botulínica é medida em unidades. Uma unidade é descrita como sendo a dose letal média correspondente à administração intraperitoneal da toxina, utilizando o murganho como modelo biológico. No entanto, as unidades correspondentes a cada produto da toxina não são equivalentes, o que se deve sobretudo às diferentes metodologias utilizadas por cada empresa produtora para a análise dos ensaios biológicos que resultam na LD50 (41,92). As doses terapêuticas dependem então das indicações clínicas, da anatomia do local de injeção, das respostas dos pacientes a tratamentos anteriores e dos efeitos secundários (41).

No sentido de ultrapassar o problema da não bioequivalência têm vindo a ser desenvolvidos diversos estudos que procuram estabelecer uma comparação entre as diferentes doses, tendo sido sugerido que 1 U de onabotA corresponde a cerca de 2 a 6 U de abobotA (41,93). Contudo, apesar de estas taxas de conversão serem frequentemente aplicadas na prática clínica não existe um acordo global quanto à sua utilização. Tendo em conta a variabilidade associada às taxas de conversão desses produtos prevê-se que vários pacientes possam estar a receber quantidades inferiores ou superiores às indicadas no tratamento de determinadas patologias. Esta prática pode estar na génese de fenómenos de ausência de resposta a tratamentos com a neurotoxina, nomeadamente devido a fenómenos de imunogenicidade, ou de efeitos secundários indesejáveis.

As diferenças na farmacologia e nas indicações clínicas dos produtos da neurotoxina evidenciam a relação entre a dose terapêutica e o local de administração, pelo que se torna fundamental determinar a quantidade terapêutica de cada produto no tratamento das diversas patologias. Desse modo é possível assegurar uma melhor seleção do produto terapêutico, bem como a segurança e eficácia da sua administração.

Na ausência de estudos que comparem o efeito da onabotA e da abobotA após administração no músculo detrusor, as doses clínicas baseiam-se em trabalhos realizados no músculo-esquelético (94–96). Assim, surge a necessidade de contrariar esse facto e estabelecer uma dose de conversão apropriada para a administração da toxina no músculo liso da bexiga.

Um dos objetivos do presente trabalho foi comparar a potência relativa das formulações onabotA e abobotA após injeção no detrusor, tendo-se para tal procedido à administração da mesma dose de cada produto. Como medida da atividade da toxina determinou-se a quantidade de fibras imunorreativas contra a SNAP-25 clivada, produto da ação proteolítica da toxina, na bexiga de cada animal.

A presença de imunorreção contra a SNAP-25 clivada em toda a extensão da bexiga dos animais tratados com onabotA ou AbobotA sugere que a dose administrada é suficiente para que a toxina se espalhe ao longo da bexiga e desempenhe o seu efeito proteolítico em zonas distantes do local de administração. Adicionalmente, a maior quantidade de fibras imunorreativas detetadas nas regiões do corpo e do trígono da bexiga está de acordo com os resultados de estudos anteriores que indicam que a zona inferior da bexiga apresenta uma maior densidade de inervação (97).

A potência é definida como a capacidade biológica da toxina produzir um efeito que é dependente da quantidade administrada. Através da comparação do número total de fibras afetadas pelos produtos da toxina na bexiga de cada animal concluiu-se que, tendencialmente, a formulação onabotA apresenta maior capacidade biológica.

Tendo em conta o número médio de fibras imunorreativas contra a SNAP-25 na bexiga dos animais de cada um dos grupos experimentais, inferiu-se que o produto onabotA é cerca de 1,7 vezes mais potente do que o abobotA, o que indica que a taxa de conversão indicada para a utilização no músculo detrusor é de 1:1,7 (onabotA:abobotA). Para cálculo da média e posterior análise estatística excluíram-se os três animais de cada um dos grupos experimentais que continham menor número total de fibras cSNAP-25 positivas. Este facto deveu-se à existência de dados provenientes de estudos clínicos que indicam que cerca de 25% dos indivíduos tratados com onabotA não apresentam resposta ao tratamento (84). Assim, e uma vez que o método de aplicação da toxina não é livre de erros, procurou-se minimizar os riscos de consideração de injeções falhadas.

Os dados obtidos sugerem que as doses de abobotA a administrar no músculo detrusor para o tratamento de condições urológicas devem variar entre 170 U a 510 U de forma a garantir um efeito semelhante às doses de onabotA extensivamente estudadas e validadas na prática clínica (84,85).

VI. Conclusões e perspectivas futuras

O presente trabalho permitiu concluir que após administração no músculo detrusor a toxina e/ou o seu produto catalítico sofrem transporte axonal para o segmento L6 da medula espinhal, observando-se o seu efeito maioritariamente ao nível da região periférica do corno dorsal. A predominância de SNAP-25 clivada nessa região sugere o possível efeito da toxina em aferentes primários provenientes da bexiga, o que apoia a ideia de que um dos contributos para o efeito antinociceptivo é a sua ação direta no sistema nervoso central.

O estudo do conteúdo neuroquímico das fibras afetadas pela toxina não foi totalmente conclusivo, uma vez que a forma clivada da SNAP-25 foi detetada apenas num número reduzido de botões sinápticos e uma grande quantidade de fibras na qual a proteína estava expressa não apresentou marcação contra qualquer outro marcador neuronal. Surgiu assim a necessidade de prosseguir para a análise ultraestrutural, tendo-se concluído que a administração de onabotulinumtoxinA resulta numa acumulação de vesículas justapostas à membrana pré-sináptica e de mitocôndrias intracelulares. Estes resultados sugerem que a toxina possa, efetivamente, causar modificações nos neurónios da medula espinhal.

Por fim, o estudo da potência relativa das formulações onabotulinumtoxinA e abobotulinumtoxinA permitiu concluir que as duas formulações não são bioequivalentes e que no caso específico da injeção no músculo detrusor a onabotA é cerca de 1,7 vezes mais potente do que a abobotA.

Este trabalho forneceu evidências da ação da toxina botulínica do tipo A no sistema nervoso central e evidenciou uma taxa de conversão entre doses de 1:1,7 (onabotA e abobotA) para administração no músculo detrusor.

Como perspectivas futuras surge a necessidade de:

- Avaliar marcadores de dano neuronal que possam estar expressos nas estruturas medulares afetadas pela toxina;
- Aprofundar a análise ultraestrutural do segmento L6 para comprovar as alterações observadas;
- Avaliar a potência relativa da onabotA e de abobotA em modelos animais de doença urológica e testar a taxa de conversão determinada nesses modelos patológicos;
- Comparar a potência relativa de onabotA e incobotA.

VII. Referências bibliográficas

1. Sobel J. Botulism. *Clin Infect Dis*. 2005;41(8):1167–73.
2. Maselli RA. Pathogenesis of human botulism. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;841(1):122–9.
3. Erbguth FJ. Historical notes on botulism, *Clostridium botulinum*, botulinum toxin, and the idea of the therapeutic use of the toxin. *Mov Disord*. 2004;19(8):S2–S6.
4. Erbguth FJ, Naumann M. Historical aspects of botulinum toxin Justinus Kerner (1786–1862) and the “sausage poison”. *Neurology*. 1999;53:1850–3.
5. Erbguth FJ. From poison to remedy: the chequered history of botulinum toxin. *J Neural Transm*. 2008;115(4):559–65.
6. Burke GS. The occurrence of *Bacillus botulinus* in nature. *J Bacteriol*. 1919;4(5):541–53.
7. Pavone F, Luvisetto S. Botulinum neurotoxin for pain management: insights from animal models. *Toxins*. 2010;2(12):2890–913.
8. Scott AB. Botulinum toxin injection of eye muscles to correct strabismus. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1981;79:734–70.
9. Scott AB, Kennedy RA, Stubbs HA. Botulinum A toxin injection as a treatment for blepharospasm. *Arch Ophthalmol*. 1985;103(3):347–50.
10. Chen S. Clinical uses of botulinum neurotoxins: current indications, limitations and future developments. *Toxins*. 2012;4(10):913–39.
11. Rossetto O, Megighian A, Scorzeto M, Montecucco C. Botulinum neurotoxins. *Toxicon*. 2013;67:31–6.
12. Tighe AP, Schiavo G. Botulinum neurotoxins: mechanism of action. *Toxicon*. 2013;67:87–93.
13. Brin MF. Botulinum toxin: chemistry, pharmacology, toxicity, and immunology. *Muscle Nerve*. 1997;20(6):146–68.
14. Aoki KR, Guyer B. Botulinum toxin type A and other botulinum toxin serotypes: a comparative review of biochemical and pharmacological actions. *Eur J Neurol Off J Eur Fed Neurol Soc*. 2001;8(5):21–9.
15. Rossetto O, Montecucco C. Presynaptic neurotoxins with enzymatic activities. *Pharmacol Neurotransmitter Release Handb Exp Pharmacol*. 2008;184:129–70.
16. Montal M. Botulinum neurotoxin: a marvel of protein design. *Annu Rev Biochem*. 2010;79:591–617.
17. Lacy DB, Tepp W, Cohen AC, DasGupta BR, Stevens RC. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat Struct Mol Biol*. 1998;5(10):898–902.
18. Simpson LL. Identification of the major steps in botulinum toxin action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44:167–93.

19. Burgen AS V, Dickens F, Zatman LJ. The action of botulinum toxin on the neuro-muscular junction. *J Physiol.* 1948;109:10–24.
20. Brunton LL, Parker K, Blumenthal D, Buxton I. *The goodman and gilman's manual of pharmacological therapeutics.* McGraw-Hill Professional; 2007.
21. Jahn R, Scheller RH. SNAREs—engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(9):631–43.
22. Wheeler A, Smith HS. Botulinum toxins: Mechanisms of action, antinociception and clinical applications. *Toxicology.* 2013;306:124–46.
23. Arnon SS, Schechter R, Inglesby T V, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Fine AD, Hauer J, Layton M. Botulinum toxin as a biological weapon. *JAMA J Am Med Assoc.* 2001;285(8):1059–70.
24. Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev.* 2000;80(2):717–66.
25. Montecucco C, Schiavo G. Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Mol Microbiol.* 1994;13(1):1–8.
26. Montecucco C, Rossetto O, Schiavo G. Presynaptic receptor arrays for clostridial neurotoxins. *Trends Microbiol.* 2004;12(10):442–6.
27. Dong M, Yeh F, Tepp WH, Dean C, Johnson EA, Janz R, Chapman ER. SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science.* 2006;312(5773):592–6.
28. Mahrhold S, Rummel A, Bigalke H, Davletov B, Binz T. The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves. *FEBS Lett.* 2006;580(8):2011–4.
29. Dong M, Liu H, Tepp WH, Johnson EA, Janz R, Chapman ER. Glycosylated SV2A and SV2B mediate the entry of botulinum neurotoxin E into neurons. *Mol Biol Cell.* 2008;19(12):5226–37.
30. Fu Z, Chen C, Barbieri JT, Kim J-JP, Baldwin MR. Glycosylated SV2 and gangliosides as dual receptors for botulinum neurotoxin serotype F. *Biochemistry.* 2009;48(24):5631–41.
31. Dong M, Richards DA, Goodnough MC, Tepp WH, Johnson EA, Chapman ER. Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J Cell Biol.* 2003;162(7):1293–303.
32. Nishiki T, Kamata Y, Nemoto Y, Omori A, Ito T, Takahashi M, Kozaki S. Identification of protein receptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem.* 1994;269(14):10498–503.
33. Nishiki T, Tokuyama Y, Kamata Y, Nemoto Y, Yoshida A, Sato K, Sekiguchi M, Takahashi M, Kozaki S. The high-affinity binding of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides G T1b/G D1a. *FEBS Lett.* 1996;378(3):253–7.
34. Rummel A, Karnath T, Henke T, Bigalke H, Binz T. Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G. *J Biol Chem.* 2004;279(29):30865–70.

35. Peng L, Tepp WH, Johnson EA, Dong M. Botulinum neurotoxin D uses synaptic vesicle protein SV2 and gangliosides as receptors. *PLoS Pathog.* 2011;7(3):1–13.
36. Peng Chen Z, Morris JG, Rodriguez RL, Shukla AW, Tapia-Núñez J, Okun MS. Emerging opportunities for serotypes of botulinum neurotoxins. *Toxins.* 2012;4(11):1196–222.
37. Verderio C, Rossetto O, Grumelli C, Frassoni C, Montecucco C, Matteoli M. Entering neurons: botulinum toxins and synaptic vesicle recycling. *EMBO Rep.* 2006;7(10):995–9.
38. Colasante C, Rossetto O, Morbiato L, Pirazzini M, Molgó J, Montecucco C. Botulinum Neurotoxin Type A is Internalized and Translocated from Small Synaptic Vesicles at the Neuromuscular Junction. *Mol Neurobiol.* 2013;48:120–7.
39. Montal M. Translocation of botulinum neurotoxin light chain protease by the heavy chain protein-conducting channel. *Toxicon.* 2009;54(5):565–9.
40. Chen S, Barbieri JT. Association of botulinum neurotoxin serotype A light chain with plasma membrane-bound SNAP-25. *J Biol Chem.* 2011;286(17):15067–72.
41. Chen JJ, Dashtipour K. Abo-, Inco-, Ona-, and Rima-Botulinum Toxins in Clinical Therapy: A Primer. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther.* 2013;33(3):304–18.
42. Dressler D, Hallett M. Immunological aspects of Botox®, Dysport® and Myobloc™/NeuroBloc®. *Eur J Neurol.* 2006;13(1):11–5.
43. Dolly JO, Lawrence GW, Meng J, Wang J, Ovsepian S V. Neuro-exocytosis: botulinum toxins as inhibitory probes and versatile therapeutics. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(3):326–35.
44. Caleo M, Schiavo G. Central effects of tetanus and botulinum neurotoxins. *Toxicon.* 2009;54(5):593–9.
45. Tyler HR. Botulinus toxin: effect on the central nervous system of man. *Science.* 1963;139:847–8.
46. Habermann E. 125I-labeled neurotoxin from *Clostridium botulinum* A: preparation, binding to synaptosomes and ascent to the spinal cord. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1974;281(1):47–56.
47. Wiegand H, Erdmann G, Wellhöner HH. 125 I-labelled botulinum A neurotoxin: pharmacokinetics in cats after intramuscular injection. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1976;292(2):161–5.
48. Pastor AM, Moreno-Lopez B, De La Cruz RR, Delgado-García JM. Effects of botulinum neurotoxin type A on abducens motoneurons in the cat: ultrastructural and synaptic alterations. *Neuroscience.* 1997;81(2):457–78.
49. Antonucci F, Rossi C, Gianfranceschi L, Rossetto O, Caleo M. Long-distance retrograde effects of botulinum neurotoxin A. *J Neurosci.* 2008;28(14):3689–96.
50. Matak I, Riederer P, Lacković Z. Botulinum toxin's axonal transport from periphery to the spinal cord. *Neurochem Int.* 2012;61(2):236–9.

51. Akaike N, Shin M-C, Wakita M, Torii Y, Harakawa T, Ginnaga A, Kato K, Kaji R, Kozaki S. Transsynaptic inhibition of spinal transmission by A2 botulinum toxin. *J Physiol*. 2013;591(4):1031–43.
52. Ferrari E, Maywood ES, Restani L, Caleo M, Pirazzini M, Rossetto O, Hastings MH, Niranjana D, Schiavo G, Davletov B. Re-assembled botulinum neurotoxin inhibits CNS functions without systemic toxicity. *Toxins*. 2011;3(4):345–55.
53. Ferrari E, Gu C, Niranjana D, Restani L, Rasetti-Escargueil C, Obara I, Geranton SM, Arsenault J, Goetze TA, Harper CB. Synthetic Self-Assembling Clostridial Chimera for Modulation of Sensory Functions. *Bioconjug Chem*. 2013;24:1750–9.
54. Aoki KR. Review of a proposed mechanism for the antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Neurotoxicology*. 2005;26(5):785–93.
55. Durham PL, Cady R, Cady R. Regulation of Calcitonin Gene-Related Peptide Secretion From Trigeminal Nerve Cells by Botulinum Toxin Type A: Implications for Migraine Therapy. *Headache J Head Face Pain*. 2004;44(1):35–43.
56. Welch MJ, Purkiss JR, Foster KA. Sensitivity of embryonic rat dorsal root ganglia neurons to Clostridium botulinum neurotoxins. *Toxicon*. 2000;38(2):245–58.
57. Cui M, Khanijou S, Rubino J, Aoki KR. Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduces formalin-induced pain. *Pain*. 2004;107(1):125–33.
58. Aoki KR. Evidence for antinociceptive activity of botulinum toxin type A in pain management. *Headache J Head Face Pain*. 2003;43(1):9–15.
59. Guo B-L, Zheng C-X, Sui B-D, Li Y-Q, Wang Y-Y, Yang Y-L. A Closer Look to botulinum neurotoxin type A-Induced Analgesia. *Toxicon*. 2013;71:134–9.
60. Marinelli S, Vacca V, Ricordy R, Uggenti C, Tata AM, Luvisetto S, Pavone F. The Analgesic Effect on Neuropathic Pain of Retrogradely Transported botulinum Neurotoxin A Involves Schwann Cells and Astrocytes. *PLoS One*. 2012;7(10):1–12.
61. Hawlitschka A, Antipova V, Schmitt O, Witt M, Benecke R, Mix E, Wree A. Intracerebrally Applied Botulinum Neurotoxin in Experimental Neuroscience. *Curr Pharm Biotechnol*. 2013;14(1):124–30.
62. Lee W-H, Shin TJ, Kim HJ, Lee J-K, Suh H-W, Lee SC, Seo K. Intrathecal administration of botulinum neurotoxin type A attenuates formalin-induced nociceptive responses in mice. *Anesth Analg*. 2011;112(1):228–35.
63. Luvisetto S, Marinelli S, Lucchetti F, Marchi F, Cobiauchi S, Rossetto O, Montecucco C, Pavone F. Botulinum neurotoxins and formalin-induced pain: central vs. peripheral effects in mice. *Brain Res*. 2006;1082(1):124–31.
64. Birder L, De Groat W, Mills I, Morrison J, Thor K, Drake M. Neural control of the lower urinary tract: peripheral and spinal mechanisms. *NeuroUrol Urodyn*. 2010;29(1):128–39.
65. Fowler CJ, Griffiths D, de Groat WC. The neural control of micturition. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9(6):453–66.
66. Andersson K-E, Arner A. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2004;84(3):935–86.

67. Fowler CJ. Integrated control of lower urinary tract—clinical perspective. *Br J Pharmacol*. 2006;147:S14–S24.
68. De Groat WC, Yoshimura N. Pharmacology of the lower urinary tract. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41(1):691–721.
69. Apostolidis A, Dasgupta P, Denys P, Elneil S, Fowler CJ, Giannantoni A, Karsenty G, Schulte-Baukloh H, Schurch B, Wyndaele J-J. Recommendations on the use of botulinum toxin in the treatment of lower urinary tract disorders and pelvic floor dysfunctions: a European consensus report. *Eur Urol*. 2009;55(1):100–20.
70. Leippold T, Reitz A, Schurch B. Botulinum toxin as a new therapy option for voiding disorders: current state of the art. *Eur Urol*. 2003;44(2):165–74.
71. Chancellor MB, Elovic E, Esquenazi A, Naumann M, Segal KR, Schiavo G, Smith CP, Ward AB. Evidence-based review and assessment of botulinum neurotoxin for the treatment of urologic conditions. *Toxicon*. 2013;67:129–40.
72. Dykstra DD, Sidi AA, Scott AB, Pagel JM, Goldish GD. Effects of botulinum a toxin on detrusor-sphincter dyssynergia in spinal cord injury patients. *J Urol*. 1988;139(5):919–22.
73. Dykstra DD, Sidi AA. Treatment of detrusor-sphincter dyssynergia with botulinum A toxin: a double-blind study. *Arch Phys Med Rehabil*. 1990;71(1):24–6.
74. Dickson EC, Shevky R. Botulism. Studies on the manner in which the toxin of clostridium botulinum acts upon the body I. The effect upon the autonomic nervous system. *J Exp Med*. 1923;37(5):711–31.
75. Abrams SB, Hallett M. Clinical utility of different botulinum neurotoxin preparations. *Toxicon*. 2013;67:81–6.
76. Yao S. FDA approves Botox to treat overactive bladder [Internet]. 2013 [cited 2013 Jan 18]. Available from: <http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm336101.htm>
77. Nitti VW, Dmochowski R, Herschorn S, Sand P, Thompson C, Nardo C, Yan X, Haag-Molkenteller C. OnabotulinumtoxinA for the treatment of patients with overactive bladder and urinary incontinence: results of a Phase 3 randomized placebo-controlled trial. *J Urol*. 2012;189:2186–93.
78. Chuang Y-C, Yoshimura N, Huang C-C, Chiang P-H, Chancellor MB. Intravesical botulinum toxin a administration produces analgesia against acetic acid induced bladder pain responses in rats. *J Urol*. 2004;172(4):1529–32.
79. Pinto R, Lopes T, Frias B, Silva A, Silva JA, Silva CM, Cruz C, Cruz F, Dinis P. Trigonal injection of botulinum toxin A in patients with refractory bladder pain syndrome/interstitial cystitis. *Eur Urol*. 2010;58(3):360–5.
80. Pinto R, Lopes T, Silva J, Silva C, Dinis P, Cruz F. Persistent therapeutic effect of repeated injections of onabotulinum toxin a in refractory bladder pain syndrome/interstitial cystitis. *J Urol*. 2013;189:548–53.
81. Coelho A, Oliveira R, Rossetto O, Cruz CD, Cruz F, Avelino A. Intrathecal administration of botulinum toxin type A improves urinary bladder function and reduces pain in rats with cystitis. *Eur J Pain*. 2014.

82. Cruz F. Targets for botulinum toxin in the lower urinary tract. *Neurourol Urodyn*. 2014;33(1):31–8.
83. Fry CH, Daneshgari F, Thor K, Drake M, Eccles R, Kanai AJ, Birder LA. Animal models and their use in understanding lower urinary tract dysfunction. *Neurourol Urodyn*. 2010;29(4):603–8.
84. Cruz F, Herschorn S, Aliotta P, Brin M, Thompson C, Lam W, Daniell G, Heesakkers J, Haag-Molkenteller C. Efficacy and safety of onabotulinumtoxinA in patients with urinary incontinence due to neurogenic detrusor overactivity: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur Urol*. 2011;60(4):742–50.
85. Botox® Prescribing Information [Internet]. 2014 [cited 2014 Jul 10]. Available from: <http://www.botox.com/>
86. Paxinos G. The rat nervous system. Gulf Professional Publishing; 2004.
87. Coelho A, Cruz F, Cruz CD, Avelino A. Effect of onabotulinumtoxinA on intramural parasympathetic ganglia: an experimental study in the guinea pig bladder. *J Urol*. 2012;187(3):1121–6.
88. Coelho A, Dinis P, Pinto R, Gorgal T, Silva C, Silva A, Silva J, Cruz CD, Cruz F, Avelino A. Distribution of the high-affinity binding site and intracellular target of botulinum toxin type A in the human bladder. *Eur Urol*. 2010;57(5):884–90.
89. Kanno T, Nishizaki T. A2a adenosine receptor mediates PKA-dependent glutamate release from synaptic-like vesicles and Ca²⁺ efflux from an IP₃-and ryanodine-insensitive intracellular calcium store in astrocytes. *Cell Physiol Biochem*. 2012;30(6):1398–412.
90. Matak I, Lacković Z. Botulinum toxin A, brain and pain. *Prog Neurobiol*. 2014;119:39–59.
91. Court FA, Coleman MP. Mitochondria as a central sensor for axonal degenerative stimuli. *Trends Neurosci*. 2012;35(6):364–72.
92. Sesardic D, Leung T, Gaines Das R. Role for standards in assays of botulinum toxins: international collaborative study of three preparations of botulinum type A toxin. *Biologicals*. 2003;31(4):265–76.
93. Hexsel D, Brum C, do Prado DZ, Soirefmann M, Rotta FT, Dal'Forno T, Rodrigues TC. Field effect of two commercial preparations of botulinum toxin type A: A prospective, double-blind, randomized clinical trial. *J Am Acad Dermatol*. 2012;67(2):226–32.
94. Sampaio C, Costa J, Ferreira JJ. Clinical comparability of marketed formulations of botulinum toxin. *Mov Disord*. 2004;19(S8):S129–S136.
95. Marchetti A, Magar R, Findley L, Larsen JP, Pirtosek Z, Ráuzička E, Jech R, Sławek J, Ahmed F. Retrospective evaluation of the dose of Dysport and BOTOX in the management of cervical dystonia and blepharospasm: the REAL DOSE study. *Mov Disord*. 2005;20(8):937–44.
96. Wohlfarth K, Sycha T, Ranoux D, Naver H, Caird D. Dose equivalence of two commercial preparations of botulinum neurotoxin type A: time for a reassessment? *Curr Med Res Opin*. 2009;25(7):1573–84.

97. Dickson A, Avelino A, Cruz F, Ribeiro-da-Silva A. Peptidergic sensory and parasympathetic fiber sprouting in the mucosa of the rat urinary bladder in a chronic model of cyclophosphamide-induced cystitis. *Neuroscience*. 2006;139(2):671–85.