

Aplicación clínica de la toxina botulínica tipo A en humanos

Genética, estructura y mecanismos de acción de la toxina botulínica

Trabajo de Fin de Grado

Autor

Sergio García Dieste

Directora

Úrsula María Jarrod Ferrer

ÍNDICE

1. Metodología

2. Introducción

2.1. Generalidades

2.2. Estructura

2.3. Genética

2.4. Estructura del complejo y absorción

3. Objetivos

4. Resultados

4.1. Mecanismo de acción

4.2. Aplicaciones clínicas

4.3. Ingeniería genética

5. Conclusiones

6. Bibliografía

7. Anexos

Aplicación clínica de la toxina botulínica tipo A en humanos

Genética, estructura y mecanismos de acción de la toxina botulínica

Resumen

Las toxinas botulínicas son un conjunto de neurotoxinas producidas por bacterias del género *Clostridium* que provocan el botulismo. Sin embargo, en las últimas décadas se han usado para tratar numerosas patologías y trastornos por su potencia y los efectos que tiene en el organismo. Se clasifican en 8 serotipos, donde el que predomina por su importancia en el uso médico es la de tipo A (BoNT/A). Su mecanismo de acción mejor caracterizado es la escisión de proteínas SNARE (como SNAP-25), lo que imposibilita la liberación de neurotransmisores a la hendidura sináptica, provocando parálisis flácida por interrumpir la señalización de contracción muscular. Sin embargo, otros efectos han sido descritos en lo relativo a este mecanismo de bloqueo de neurotransmisión. Igualmente, se ha investigado la relación entre la toxina y la menor expresión de algunos receptores que son vehiculizados a la membrana en vesículas que utilizan proteínas similares a las que movilizan las vesículas de neurotransmisores y siendo, por tanto, diana de la toxina botulínica. De esta forma, más allá de su conocido uso en medicina estética para reducir las arrugas de expresión, pacientes con condiciones clínicas muy diversas, tales como depresión, migraña, piel grasa o blefaroespasm, han visto mejorar sus síntomas en los últimos años gracias a la investigación clínica de esta toxina. Tanto es el interés que despierta que incluso se han propuesto numerosas modificaciones genéticas para mejorar algunas de sus interesantes propiedades, quedando abierto un gran campo de estudio para seguir mejorando la vida de los pacientes en el futuro próximo.

Abstract

Botulinum toxins are a group of neurotoxins produced by bacteria of the genus *Clostridium* that cause botulism. However, in the last decades they have been used to treat numerous pathologies and disorders due to their potency and their effects it has on the human body. They are classified into 8 serotypes, where the one that predominates due to its importance in medical use is type A (BoNT/A). Its best characterized mechanism of action is the cleavage of SNARE proteins (such as SNAP-25), which makes it impossible to release neurotransmitters to the synaptic cleft, causing flaccid paralysis by interrupting muscle contraction signaling. However, other effects have been described in relation to this neurotransmission blocking mechanism. Likewise, it has been researched the relationship between the toxin and the lower expression of some receptors that are transported to the membrane in vesicles that use proteins similar to those that mobilize neurotransmitter vesicles and are, therefore, a target of botulinum toxin. In this way, beyond its well-known use in aesthetic medicine to reduce expression lines, patients with very diverse clinical conditions, such as depression, migraine, oily skin or blepharospasm, have seen their symptoms improve in recent years thanks to the clinical investigation of this toxin. It stimulates such interest that numerous genetic modifications have been proposed to improve some of its interesting properties, leaving a large field of study open to continue improving the lives of the patients in the near future.

1. Metodología

Esta revisión bibliográfica sobre la toxina botulínica tipo A y sus aplicaciones clínicas fue desarrollada mediante la búsqueda computarizada de papers primarios, revisiones y revisiones sistemáticas en la base de datos PubMed hasta el 6 de septiembre de 2021.

Búsqueda de literatura

Las búsquedas en PubMed se basaron en las palabras clave: “e-cadherin, regulation, plasmid, clinics, TRP Channels, serotonin, depression” combinados con “BoNT, BoNTA o botulinum” y separados por la partícula “AND”. Como criterio adicional, se añadió el filtro “publicado en los últimos 5 años”. Aquellas búsquedas que no arrojaron resultados o cuyos resultados no fueron relevantes (por no contener de forma exacta alguna de las palabras de la búsqueda), se repitieron para cualquier fecha de publicación.

Adicionalmente, se estableció el criterio “ordenar por: más coincidente (best match)”. En el caso de haber numerosos artículos que versaran sobre el tema de interés, se priorizaron los 3 o 4 más recientes.

Para la búsqueda específica de información relativa a la familia de proteínas de la toxina, se consultó la base de datos Pfam; para la información sobre la genética de la toxina, dominios, motivos estructurales y cofactor, se consultó Uniprot; y para información sobre la regulación de la producción de la toxina, la base de datos Prombase.

Criterios de inclusión y exclusión

Los principales criterios de inclusión fueron: a) estudios en ratones y ratas; b) ensayos clínicos en humanos; c) estudios que incluían un grupo control; d) ensayos solo “in vitro”.

Asimismo, se aplicaron algunos criterios de exclusión: a) estudios sin resultados claros; b) cartas, comentarios o directrices.

2. Introducción

2.1. Generalidades de la toxina botulínica

Las toxinas botulínicas o bontoxilinas son un conjunto de neurotoxinas producidas por bacterias del género *Clostridium*, principalmente *C. botulinum*, que producen una toxiinfección conocida como botulismo. Se han descrito al menos 8 serotipos de toxinas botulínicas, nombrados con las letras A-H, y varios subtipos de cada uno (1).

Concretamente, la toxina botulínica tipo A (BoNT/A) es una de las toxinas naturales más potentes conocidas por el ser humano y es la causante, junto con los serotipos B, E y F, del botulismo en humanos (2). Se han caracterizado 4 síndromes clínicos: botulismo transmitido por alimentos, botulismo por heridas, botulismo infantil y toxemia intestinal. Se cree que podría existir también el botulismo por inhalación, pero la toxina debería presentarse en forma de aerosol, lo que no ocurre naturalmente, y se ha advertido como un probable tipo de bioterrorismo. En adición, existe el botulismo iatrógeno, que es resultado de la inyección de toxina botulínica, ya que se usa clínicamente para tratar diversas afecciones y en medicina estética para reducir las arrugas de expresión.

Todos los tipos de botulismo presentan el mismo síndrome neurológico: parálisis simétrica de nervios craneales seguida de parálisis flácida simétrica de músculos voluntarios y compromiso respiratorio (3).

2.2. Estructura de la toxina botulínica

La neurotoxina botulínica tipo A (BoNT/A) es sintetizada por la bacteria Gram-positiva *Clostridium botulinum* como una única cadena de 1296 aminoácidos y aproximadamente 150 kDa. La determinación de la estructura reveló que sus dimensiones son aproximadamente 45 Å x 105 Å x 130 Å (4).

BoNT/A sufre una proteólisis co-traducciona consistente en la eliminación de la metionina inicial y la división de la molécula en dos cadenas, una ligera de 50 kDa y otra pesada de 100 kDa, que se unen por un puente disulfuro (5).

En *C. botulinum* cepa Hall, BoNT/A la cadena ligera ocupa las posiciones 2-448 y la pesada, las posiciones 449-1296. El puente disulfuro conecta Cys-430 y Cys-454. Adicionalmente, otro puente disulfuro conecta Cys-1235 y Cys-1280.

La proteína contiene un átomo de Zinc como cofactor, unido a la proteína por los residuos His-223, His-227 y Glu-262, con actividad catalítica. El Glu-224, sin unión al cofactor, actúa como centro catalítico. En cuanto a sus dominios, la cadena ligera tiene un único dominio con actividad metaloendopeptidasa, mientras que la cadena pesada presenta 3 dominios: un dominio de translocación (residuos 449-872) y un dominio de unión a receptor, dividido en N-

terminal (873-1092) y C-terminal (1093-1296) (Figura 1). Entre 492-545 hay un cinturón que rodea el Zn^{+2} (5), que es innecesario para la formación del canal del dominio de translocación pero que se cree que es responsable de prevenir que la cadena ligera se disocie tempranamente del canal (6,7). Dos regiones transmembrana de 21 aminoácidos aparecen en las posiciones 627-647 y 656-676 de la cadena (5). Las posiciones 1264-1267 conforman un motivo de unión a gangliósidos del hospedador, con secuencia SNWY (8).

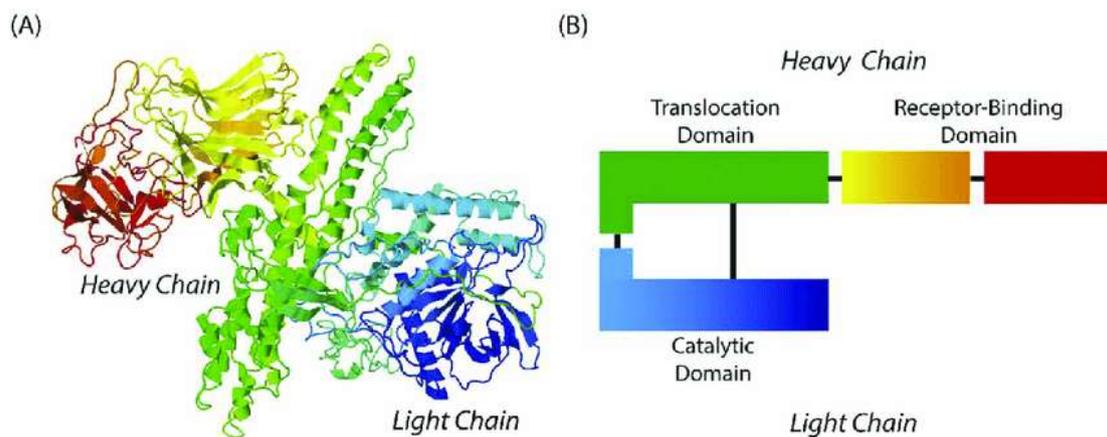


Figura 1. (A) Cadenas ligera y pesada de BoNT/A. (B) Dominios de BoNT/A (9)

El dominio catalítico pertenece a la familia de las peptidasas M27, caracterizada por contener metaloendopeptidasas altamente selectivas presentes en las neurotoxinas clostridiales. Las proteínas de esta familia contienen el motivo HEXXH, en el que las dos histidinas (223 y 227 en este caso) son ligandos de un único átomo de zinc y el glutamato (224) tiene función catalítica. El tercer ligando del átomo de zinc es un residuo de glutamato más cercano al extremo C-terminal (262) (5,10).

En cuanto a la estructura de los dominios, el dominio de unión al receptor presenta dos subdominios de tamaño similar, compuestos principalmente por hebras β y conectados por una gran hélice α . El subdominio N-terminal presenta dos láminas β de 7 hebras por lámina comprimidas en un motivo de barril tipo remolino o jelly roll. Por su parte, el subdominio C-terminal presenta una estructura de pliegue de trébol β con un barril β de 6 hebras próximo al motivo jelly roll del N-terminal y un trío de horquillas β en la base. Se ha observado que el dominio de unión a receptor comparte una notable homología estructural con el dominio de unión de la toxina del tétanos (4,11).

En segundo lugar, el dominio de traslocación y formación del poro de BoNT/A presenta forma cilíndrica, con una pequeña parte que envuelve el dominio catalítico. Contiene dos hélices α de 105 Å, antiparalelas y anfipáticas, que se disponen en forma de hélice superenrollada, con una hélice α más corta en cada uno de los extremos de las hélices orientada en paralelo al eje largo de estas.

En tercer lugar, el dominio catalítico se compone de hélices α y láminas β , con un sitio activo de carga superficial negativa enterrado unos 20-24 Å en la proteína y accesible desde el exterior por un canal de dimensiones 12 Å x 15 Å x 35 Å (4,12).

2.3. Genética de la toxina botulínica

Las toxinas botulínicas están codificadas por los genes *bont* (a veces llamados *botX*, siendo *X* el serotipo). Estos genes se agrupan en clústeres de genes de neurotoxinas (NGC), de los que se distinguen dos modalidades: de tipo hemaglutinina (*ha*) y de tipo *orfX-p47* (13). El primer tipo contiene los genes de una proteína NTNH (no tóxica no hemaglutinina) y de las hemaglutininas HA-17, HA-33 y HA-70. El segundo tipo contiene los genes *orfX1*, *orfX2*, *orfX3* y *p47* (13,14). La toxina botulínica tipo A (BoNT/A) se ha descrito en ambos tipos de clústeres (15) (Figura 2).

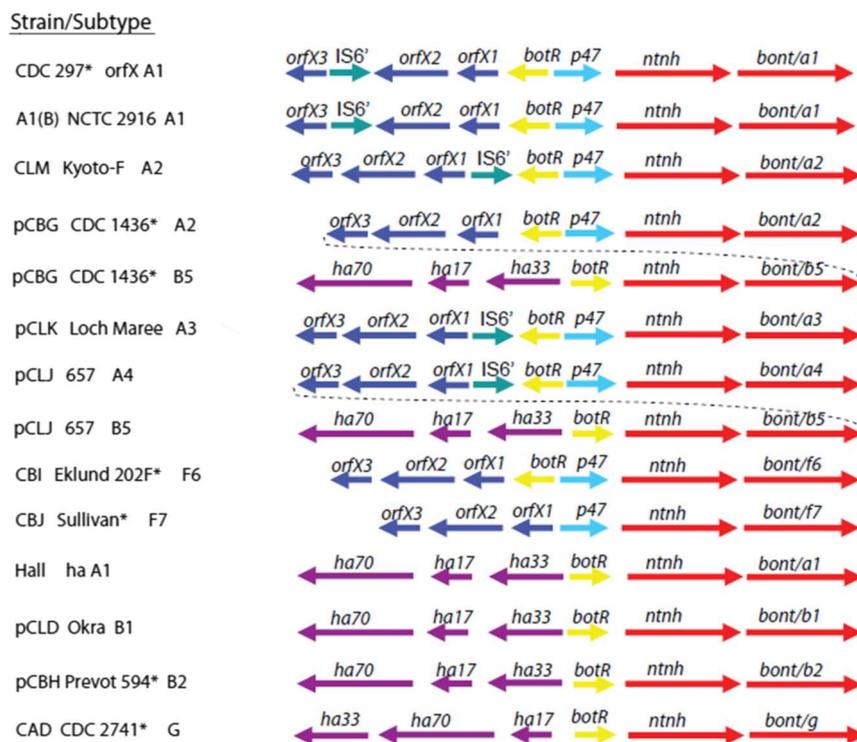


Figura 2. A la derecha: algunos clústeres de genes de neurotoxinas (NGC), correspondientes a distintos subtipos de BoNT. A la izquierda: cepa productora en la que se encuentra el clúster (16)

Los clústeres pueden tener localización cromosómica, como en la cepa de *C. botulinum* Hall A (17); plasmídica, en *C. botulinum* Ba4 (18); o ambas, en *C. botulinum* Af84, que presenta los clústeres de *bont/A2* y *bont/F4* en el cromosoma y el de *bont/F5* en un plásmido de 246 kb (19).

Ambos tipos de clúster pueden codificar además un factor sigma alternativo para la ARN polimerasa llamado *BotR* que regula positivamente la expresión de BoNT (15,20), si bien cepas productoras de otras toxinas como la de tipo E, pueden tener en su lugar otros factores de regulación como *Spo0A* (21).

BotR ha demostrado guiar a la RNA polimerasa hacia la transcripción de genes de ambos tipos de operones, *ha+* y *OrfX+*. Concretamente, *BotR* y otros miembros de su subfamilia, llamada *TcdR* y englobada en la familia de *sigma 70*, reconoce una región promotora muy conservada

(TTTAXA). Experimentos de footprinting con la región promotora del operón *ntnh-bont/A* muestra el reconocimiento de las secuencias GTTATA en el entorno de la posición -10, y TTACA en -35 por parte de *BotR/A* (22).

También están involucrados al menos 6 sistemas de dos componentes (TCS), que permiten a las bacterias adaptarse a diversos cambios en su entorno. Estos sistemas constan de una pareja de proteínas: un RR o regulador de respuesta con unión a DNA, asociado a una histidina quinasa que actúa como sensor ante cambios ambientales (22) (Figura 3). Al reprimirse por separado en distintas cepas isogénicas, se observó que la pareja CBO0787/CBO0786 regula negativamente la expresión de la toxina (23), mientras que otras parejas regulador/quinasa, como CLC 1093/CLC 1094, CLC 1914/CLC 1913 o CLC 0661/CLC 0663 actúan incrementando la síntesis de la toxina ante determinados estímulos (22,24). Algunos de los estímulos que reprimen la síntesis de BoNT/A son el exceso de arginina, prolina, glutamato y amoniaco, así como un pH distinto del óptimo (pH=7) (22).

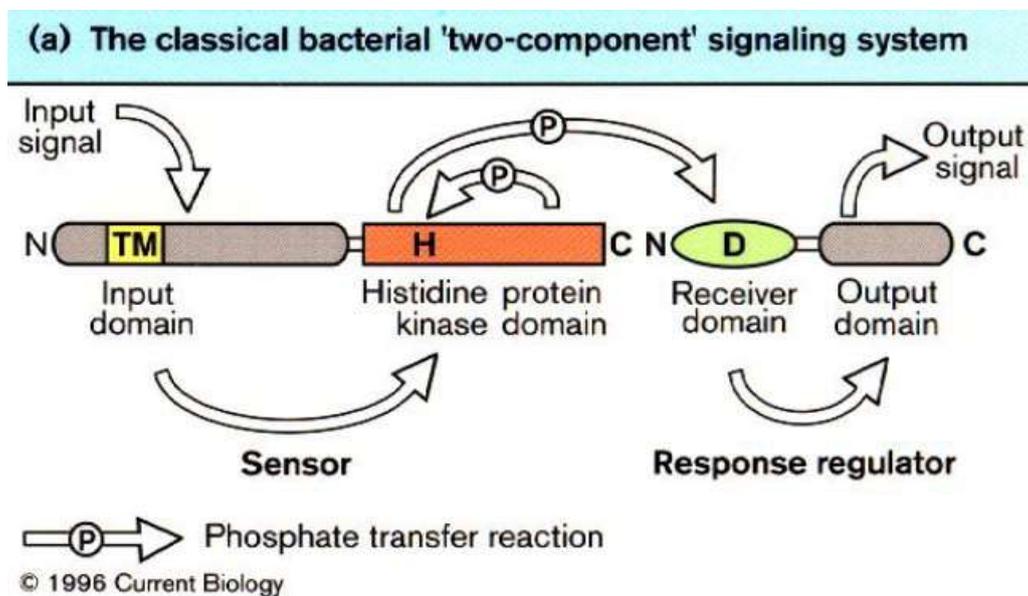


Figura 3. Esquema general de los sistemas de dos componentes (TCS) (25)

2.4. Estructura del complejo y absorción

La proteína NTNH protege a BoNT de la desnaturalización gastrointestinal en el interior del hospedador mediante la formación del complejo de toxina progenitora mínimamente funcional (M-PTC) de 300 kDa. Posteriormente, M-PTC se une a las hemaglutininas y forma el complejo PTC grande (L-PTC), de unos 500 kDa (26,27). En algunas ocasiones, L-PTC dimeriza, dando lugar al LL-PTC (900 kDa). Estos complejos M-PTC, L-PTC y LL-PTC reciben también el nombre de toxinas 12S, 16S y 19S respectivamente (28). Se ha observado que los PTC muestran una toxicidad oral 360-16000 veces mayor que las toxinas libres en función de su serotipo (29). Las formulaciones farmacéuticas aprobadas por la FDA (Food and Drug

Administration) consisten en el complejo L-PTC completo (toxina onabotulínica A, 900 kDa), en ciertos componentes (toxina abobotulínica A, 400 kDa) o en la neurotoxina aislada (toxina incobotulínica A, 150 kDa). Se ha observado que estas preparaciones tienen actividades específicas diferentes: 137 unidades/ng en la onabotulínica, 154 U/ng en abobotulínica A y 227 U/ng en el caso de la toxina pura, incobotulínica A (26,30,31).

La absorción intestinal se logra gracias a las hemaglutininas mediante al menos dos mecanismos: en primer lugar, el acoplamiento del complejo a la superficie de las células del lumen gracias a la actividad de unión a residuos glucídicos de glicoproteínas y glicolípidos, con la subsecuente transcitosis del complejo en la lámina propia; y, en segundo lugar, la unión a E-cadherina, que participa en la adhesión entre células epiteliales, dando como resultado la alteración de la barrera epitelial (11,23). Una vez superadas las condiciones ácidas del intestino, la toxina en un pH ligeramente básico, como el de la sangre, se disocia de las proteínas asociadas a neurotoxinas (NAPs) (32).

En cuanto a las proteínas *orfX1*, *orfX2*, *orfX3* y *p47*, su función todavía no ha sido aclarada. Se cree que las tres primeras pueden jugar un papel en la formación de PTC o en la patogénesis de BoNT debido a que presentan una estructura de operón idéntica a la del operón de *ha17*, *ha33* y *ha70*, así como una localización cercana al operón *bont-ntnh*. El gen *p47* codifica un producto de 47 kDa de función desconocida, aunque análisis bioquímicos han mostrado que, junto a las proteínas OrfX1 y OrfX2, se une a lípidos in vitro (13).

3. Objetivos

El objetivo este trabajo es conocer la evidencia que existe actualmente sobre las aplicaciones clínicas de la toxina botulínica tipo A, incluyendo los mecanismos de acción que esta sigue para llevar a cabo sus efectos, incidiendo especialmente en los estudios más recientes en el tema. Asimismo, se realiza una introducción con generalidades de las toxinas botulínicas, y se explican aspectos relevantes sobre su estructura, su interacción con otras moléculas en el organismo y su genética. En definitiva, esta revisión bibliográfica pretende que el lector logre adquirir una visión global de esta molécula y de sus usos en la medicina.

Por otra parte, el trabajo también pretende recopilar algunas de las modificaciones genéticas ya exploradas en la toxina, que buscan obtener una solución mejor a la toxina wild-type, buscando potenciar ciertas propiedades.

Por último, se pretende crear dos pequeñas hipótesis de trabajo: una con la que poder mejorar todavía más algunas de las propiedades de la toxina botulínica; y otra que permita atacar patologías de células no-neuronales que no se han tratado todavía con la toxina.

4. Resultados

4.1. Mecanismo de acción

El principal efecto de BoNT es la inhibición de la liberación de acetilcolina en la unión neuromuscular contenida en las vesículas sinápticas, pero también inhibe la descarga de otros neurotransmisores, entre ellos, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), la sustancia P, serotonina, glutamato, GABA, noradrenalina, dopamina, encefalina y glicina (33). Esto se debe a que, una vez translocada al citosol, la cadena ligera de BoNT, con actividad metaloproteasa, fragmenta un componente del heterotrímero formado por SNAP-25, sintaxina y sinaptobrevina-VAMP2. Este heterotrímero media el acoplamiento de las vesículas sinápticas a la membrana plasmática y las proteínas que lo constituyen pertenecen al grupo de proteínas conocidas como SNAREs (receptores de proteínas de fijación soluble de NSF; NSF: factor sensible a la N-etilmaleimida). De esta forma, el neurotransmisor contenido en la vesícula no puede liberarse a la hendidura sináptica y no lleva a cabo su función (26) (Figura 4).

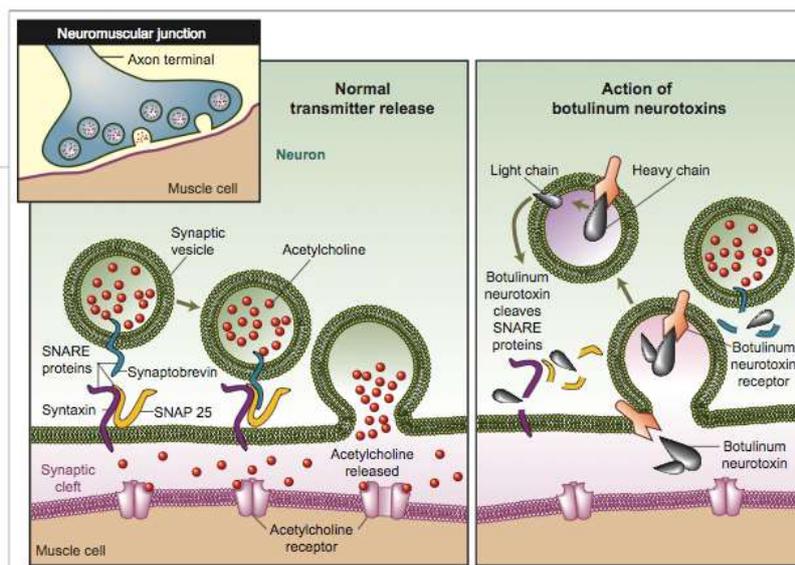


Figura 4. Acción de BoNT sobre las vesículas sinápticas (34)

En el caso de BoNT/A y BoNT/E, el polipéptido escindido es SNAP-25 por uno de sus motivos SNARE, mientras que BoNT/B, D, F y G escinden la proteína VAMP2, y BoNT/C corta tanto SNAP-25 como la sintaxina-1A (30). Las dos primeras, a pesar de actuar sobre la misma diana, realizan cortes en sitios distintos: BoNT/A deja un producto carente de 9 aminoácidos en C-terminal, mientras que BoNT/E escinde 26 aminoácidos del mismo extremo. Estos productos presentan comportamientos: se ha observado que el producto de escisión de BoNT/A, nombrado SNAP-25(1-197) o SNAP-25 Δ 9, permanece más tiempo en el botón sináptico que el

equivalente fragmentado por BoNT/E, llamado SNAP-25(1-180) o SNAP-25 Δ_{26} , que es retirado rápidamente y reemplazado por un nuevo SNAP-25 (26,35).

Ensayos de inmunoblot reflejan una mucho mayor afinidad de SNAP-25 Δ_{9} por la sintaxina-1A, componente del heterotrímero, que la que presenta SNAP-25 Δ_{26} ; tanto sucede así que no se logró una unión saturable ni siquiera con elevadas cantidades de sintaxina-1A entre esta y SNAP-25 Δ_{26} , pero sí entre la sintaxina y SNAP-25 Δ_{9} , con niveles de afinidad ligeramente mayores a los que presenta con SNAP-25 intacta. Esta persistencia es uno de los motivos de la elevada potencia de BoNT/A (35).

En cuanto a la formación del heterotrímero, estudios in vitro parecen indicar que la acción de BoNT/A no impide la formación de este complejo, a diferencia de lo que ocurre con BoNT/B y BoNT/E (26,36). De esta forma, el heterotrímero con SNAP-25 Δ_{9} compite con su análogo natural, con SNAP-25 intacto, en el sitio de liberación de vesículas, reduciendo de esta forma la cantidad de neurotransmisores liberados (36).

En adición, la cadena pesada (HC/A) puede unirse y activar el FGFR3 (receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos). Se cree que podría utilizar este receptor para entrar a las neuronas corticales, ya que es la vía que sigue el mutante BoNT/A(0) (cadena completa pero catalíticamente inactiva) para su internalización. El mismo mutante ha demostrado también entrar a neuronas mediante endocitosis dependiente e independiente de la GTPasa dinamina (37).

De igual forma, hay receptores celulares que ven inhibida su expresión en superficie por la acción de BoNT debido a que su exocitosis está mediada por transporte SNARE-dependiente. Algunos ejemplos son los canales iónicos TRPV1, TRPM8, TRPA1, P2X3 y GABA-A (33).

En este sentido, se ha observado que disminuye la expresión del receptor de potencial transitorio vaniloide tipo 1 (TRPV1) en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal primaria (30), y la expresión de TRPV1, de TRPA1 y del purinoceptor P2X3 en las neuronas del ganglio del trigémino (38) (Figura 5).

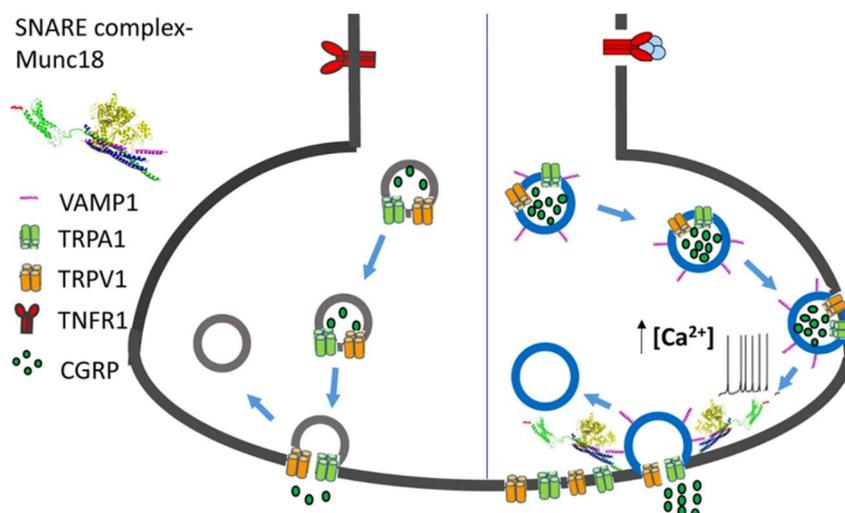


Figura 5. Transporte de TRPA1 y TRPV1 a la membrana plasmática de la neurona, y de CGRP a la hendidura sináptica, mediada por un complejo de proteínas SNARE (39)

4.2. Aplicaciones clínicas

Debido a los mecanismos expuesto anteriormente, la toxina botulínica está indicada para el tratamiento de diversas patologías y condiciones clínicas, mientras que, para otras, está todavía en estudio. La patente más explotada, el BOTOX® (toxina onabotulínica A), está registrada por Allergan, propiedad de la farmacéutica AbbVie, pero existen otras preparaciones en el mercado, como Dysport® (toxina abobotulínica A) o Xeomin® (toxina incobotulínica A).

El efecto de la toxina comienza 2 o 3 días después del tratamiento, y llega a su máximo a las dos semanas (40). Su efecto es reversible: la actividad neuronal empieza a normalizarse entre 2,8-3 meses después de la inyección, debido a que se produce un recambio de moléculas como SNAP-25 y una reorganización neuronal en la unión neuromuscular (40,41).

Algunos de los usos clínicos más relevantes se exponen a continuación.

Estética

Uno de los usos más conocidos de BoNT/A tiene lugar en el campo de la medicina estética, concretamente, para eliminar arrugas de expresión. El mecanismo de acción que subyace en este caso es la detención del flujo de acetilcolina, necesaria para la contracción muscular, mediante la escisión de SNAP-25.

Depresión

Otra aplicación clínica de BoNT/A es su uso como antidepresivo. En los pacientes con depresión, los niveles de serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) y noradrenalina aparecen notablemente reducidos (42), así como el nivel del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (43). BoNT/A, al aplicarse como una única inyección facial en la zona glabellar, ha demostrado incrementar los niveles de 5-HT en varias regiones del cerebro de ratones, como el hipocampo y el hipotálamo, así como la expresión de BDNF en varias regiones del cerebro (37,42), simulando el efecto de antidepresivos de uso habitual, como los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRI), que aumentan la disponibilidad sináptica de 5-HT y la producción en el hipocampo y en el córtex prefrontal de BDNF (44).

También, se conoce que hay una importante reducción en la expresión de las subunidades NR1 y NR2B del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) en el hipocampo de ratones SRS (estresados por restricción del espacio), modelo animal utilizado habitualmente para estudios de la bioquímica de la depresión. Estas subunidades parecen desarrollar una función diferente en función del modelo animal elegido (42,45), pero la inyección facial de BoNT/A logró aumentar estos niveles en el hipocampo de los ratones SRS (45).

La relación entre todos estos eventos puede deberse a que el BDNF participa en el desarrollo neuronal y en la neurogénesis por medio de la activación de los receptores de NMDA del hipocampo, además de que activa a la proteína ERK, la cual fosforila a CREB. Así, CREB se activa

y participa en la neurogénesis y en la atenuación de los síntomas depresivos en ratones (46,47). En definitiva, a nivel bioquímico, BoNT/A elevó temporalmente los niveles de ERK fosforilado (p-ERK) y CREB fosforilado (p-CREB) vía activación por BDNF y, a nivel comportamental, redujo el tiempo de inmovilidad en distintas pruebas de comportamiento realizadas a los ratones, criterio utilizado para determinar que mejoró los síntomas de la depresión (42). Esto es lo que se conoce como *Hipótesis del BDNF*, una de las relaciones causa-efecto propuestas para explicar la eficacia de BoNT/A sobre la depresión. Sin embargo, existen algunas otras:

Hipótesis de retroalimentación facial: se fundamenta en la evidencia de la bidireccionalidad entre el centro emocional del cerebro y los músculos faciales. Una inyección de BoNT/A en el entrecejo puede interferir con la retroalimentación emocional: debido a la parálisis, no cambian las expresiones faciales en función de las distintas emociones (48)

Hipótesis de retroalimentación social: al prevenir expresiones faciales de enfado, tristeza o miedo, podría mejorar la interacción social. Se ha demostrado que el sistema límbico y el sistema de neuronas espejo están involucrados en el reconocimiento de expresiones faciales (37).

Teoría de la monoamina: afirma que hay una relación entre la reducida disponibilidad de serotonina (5-HT) y norepinefrina (NE) en el cerebro y los trastornos emocionales. Se observó el incremento de estos dos neurotransmisores en distintas regiones tras la inyección facial de BoNT/A en ratas y ratones estresados (49).

Teoría de la neuroinflamación: la inflamación sistémica de bajo grado podría tener relación con el estrés psicológico y los síntomas depresivos (37). BoNT/A demostró reducir la regulación al alza de la expresión de los factores proinflamatorios derivados de la microglía, por lo que podría modular la neuroinflamación por la inhibición de la activación de la microglía en el CNS (50).

Probablemente, no solo una teoría sea cierta, sino que varias de ellas se den al mismo tiempo y expliquen la relación entre BoNT/A y su efecto de mejora sobre los síntomas de la depresión.

Migraña crónica

La migraña es una enfermedad caracterizada por el dolor de cabeza, las náuseas, los vómitos y la hipersensibilidad a la luz o el ruido. Es el segundo trastorno neurológico más común (51). Como causa de la migraña, se propone la hipótesis neurovascular, corroborada por estudios que muestran el papel de la inflamación neurogénica en el trastorno. La inflamación neurogénica está mediada por la activación de las fibras perivasculares del trigémino, las cuales liberan neuropéptidos como sustancia P y CGRP, que conduce a un mayor flujo sanguíneo y edema (51,52).

Los receptores de potencial transitorio (TRPs) también han sido relacionados con la migraña, incluyendo TRPV1, TRPV4, TRPM8 y TRPA1. TRPV1 es un canal catiónico no selectivo que se expresa principalmente en pequeñas y medianas neuronas del ganglio del trigémino. La estimulación de TRPV1, presente en un subconjunto de neuronas (TRPV1+), conduce a la liberación de CGRP. Es activado por temperatura alta (>43°C), pH bajo, capsaicina y anandamida, entre otros (52,53). A continuación, el CGRP activa el receptor de CGRP presente en las fibras A δ . El receptor activado inicia un mecanismo dependiente de PKA y PKC, que termina con la fosforilación e incremento del efecto de los receptores de NMDA (54). La sensibilización central implica la reducción del umbral del dolor, lo que conduce a una amplificación por parte del sistema nervioso central de algunos estímulos normalmente no dolorosos (55) (Figura 6).

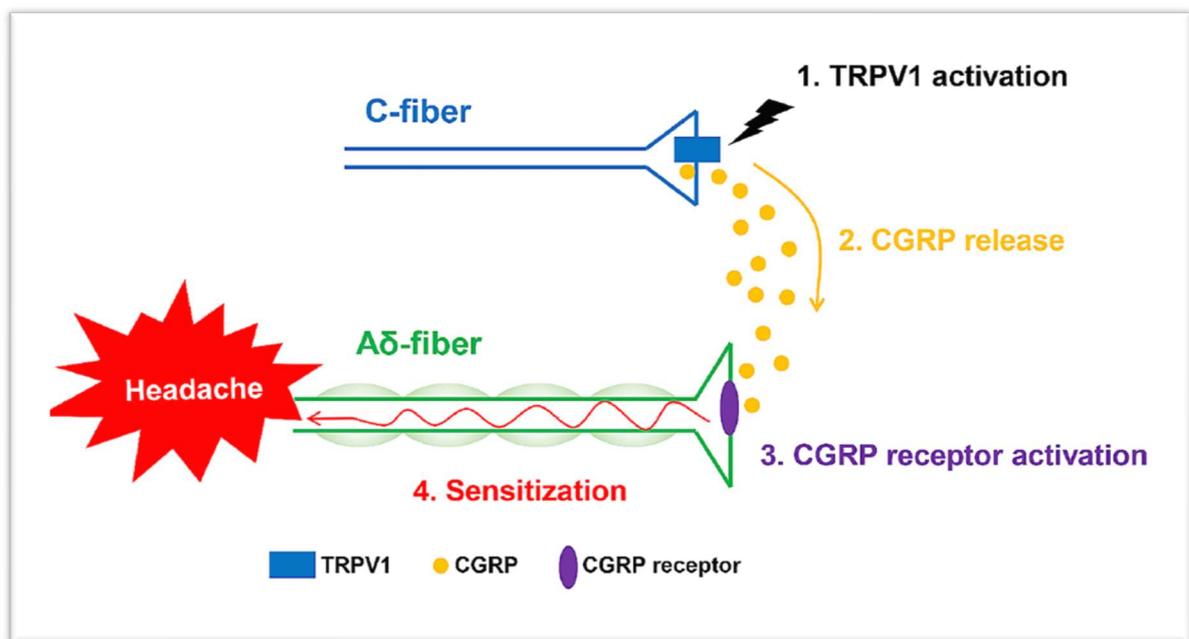


Figura 6. Sensibilización de las fibras A δ por acción del CGRP (52)

Los pacientes tratados con BoNT/A muestran una reducción en los niveles de CGRP, ya que su liberación depende de proteínas SNARE, que son escindidas por la toxina. Adicionalmente, ha mostrado inhibir el reclutamiento de TRPV1 y TRPA1 hacia la membrana plasmática de las neuronas del ganglio del trigémino, probablemente por reducir la distribución del TNF-alfa, que promovería el transporte de estos a la membrana, impidiendo así el incremento de flujo de Ca²⁺ a través de estos receptores y, por tanto, la posterior cascada de señales que conducen a la liberación de CGRP (51,56).

Vejiga hiperactiva

La reducción de los receptores TRPV1 y P2X3, expresados en las neuronas sensoriales primarias, se ha correlacionado en el tratamiento de vejiga hiperactiva con una mejora de los síntomas: la disminución de TRPV1, con menor sensibilidad, y la de P2X3, con menor percepción de urgencia (30,38). Adicionalmente, BoNT/A reduce la liberación de ATP vesicular por las células uroteliales (57).

En esta línea, se ha observado también, y utilizando inmunofluorescencia, una reducción de los receptores P2X2, P2X3, y los receptores muscarínicos M2 y M3 en el músculo detrusor de la vejiga tras la inyección directa en ese músculo de onabotulinumtoxina A en pacientes con hiperactividad neurogénica del detrusor a los que se les extrajo la cúpula vesical (58). La relación entre causa y efecto puede ser que la transducción purinérgica de señales de los receptores P2X2 y P2X3 es interrumpida por BoNT/A en vejiga de rata (58). También se reduce el efecto de los receptores muscarínicos M2 y M3 en ratones, receptores con una implicación aproximada en las contracciones colinérgicas del detrusor del 5 y el 95% respectivamente (59).

Piel grasa

Los sebocitos expresan el receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ (nAChR $\alpha 7$) y liberan acetilcolina en el entorno local (a modo de citotransmisor autocrino o paracrino). Esta acetilcolina activaría el receptor nAChR $\alpha 7$ e induciría la síntesis de lípidos por la vía de señalización de la quinasa ERK (41). Sin embargo, esta ruta se vería interrumpida por la no liberación de acetilcolina a nivel local gracias al papel de BoNT/A en la escisión de SNAP-25 (28,30), efecto especialmente notable en individuos con piel grasa debido al mayor número de sebocitos maduros y, por tanto, de receptores de acetilcolina $\alpha 7$ en estos (42).

Otros

La toxina botulínica tipo A se ha usado también para paliar algunos síntomas de la enfermedad de Parkinson, como temblor, sialorrea, camptocormia o vejiga hiperactiva (31). Adicionalmente, ha demostrado ser muy eficaz en el tratamiento de blefaroespasmos, con un ratio de respuesta superior al 90% (41,60), así como en el tratamiento del espasmo hemifacial, con mejora de más del 75% en el 76-100% de los pacientes durante 3-4 meses (61). Los mecanismos que explican la mejora de los síntomas coinciden con los detallados anteriormente: bloqueo de la liberación de neurotransmisores necesarios para la contracción muscular.

De hecho, hay otra serie de patologías, principalmente trastornos del movimiento, en las que se ha usado BoNT/A como tratamiento (Ver *Anexos 1,2*).

4.3. Ingeniería genética

La base de datos Uniprot recoge 34 variantes generadas por mutagénesis con una descripción del efecto observado en la toxina o su actividad. Entre ellas, aparecen dos mutantes del dominio de translocación con reducida toxicidad al cambiar 11 residuos entre 861 y 871 y 6 residuos entre 862 y 867; dos variantes, F953G y F953R, con muy reducida y nula toxicidad respectivamente, pero a la vez muy reducida unión a neuronas; y un mutante del bolsillo de unión a gangliósidos, con cambios W1266L e Y1267S. Además, un cambio en un solo aminoácido, E224K o E224Q, se traduce en el no procesamiento de SNAP25, lo que remarca su importancia en la actividad catalítica (5).

Sin embargo, la ingeniería genética no solo se ha utilizado para determinar la importancia de ciertos aminoácidos dentro de la cadena polipeptídica de BoNT/A, sino que se han logrado crear toxinas mutantes, en muchos casos por combinación de varios subtipos de estas, en busca de mejorar sus propiedades terapéuticas (*Figura 7*).

BoNT	Modification	Application
BoNTs	Re-engineering of target specificity	Chronic pain
BoTIMs	Full-length BoNTs incorporation inactive LC/A and LC/E	Prolonged effect in various pain states including chronic pain
BoNT/B _{MY}	Mutations enhancing binding to human synaptotagmin-II, mutations of the lipid binding loop	Enhanced efficacy
LC/B	Mutations of substrate recognition pockets	Novel therapy to escape immunoresistance in BoNT/B therapy.
BoNT/LC	LC Mutations	Maintain cleavage of syntaxin
BoNT/B TM (triple mutant)	Mutations inducing protonation of residues involved in translocation process	Increased neurotoxicity due to faster cytosolic delivery of the enzymatic domain
BoNT/A	Protein stapling allowing BoNT/A re-assembly in situ	Development of neuronal modulating agents
BoNT/A and E chimera	Chimera construction	Targeting specific populations of neurons or secretory cells
BoNT/LC	Vector-expressed transgenic BoNT/LC	Stable, selective, and controllable, BoNT/LC expression in different neuron types
BoNTs	Ligation to agents targeting BoNT delivery into specific cell types	Pain relief, inflammation and neuropathic pain

Figura 7. Modificaciones por ingeniería genética de diversas toxinas y su aplicación en clínica (61)

Unas de las propiedades que se busca mejorar en las toxinas con uso clínico es la duración de su efecto, aproximación estudiada por Dolly et al. en un estudio que utilizaba mutantes enzimáticamente inactivos derivados de BoNT/A (BoTIMs). Uno de ellos (LC/E-BoNT/A) consistía en la cadena completa de BoNT/A con la cadena ligera sin actividad catalítica a la que se le añadió la cadena ligera del serotipo BoNT/E (LC/E) mediante fusión génica. El resultado

de la inyección con la toxina híbrida purificada fue una mayor duración del efecto analgésico en un modelo de rata con dolor inducido (61).

Una quimera con la misma configuración fue creada por Wang et al. para comparar algunas de sus características con las toxinas wild-type. En ratones, el híbrido demostró provocar una parálisis flácida más persistente, gracias a la interrupción del transporte vesicular a la superficie de los receptores TRPV1 y TRPA1 (62). Así mismo, demostró unirse a neuronas sensoriales, mientras que la toxina BoNT/E nativa no mostró tal unión (63). En definitiva, la estrategia consistió en aprovechar la especificidad de unión de BoNT/A con la mayor persistencia del efecto de escisión de SNAP-25 de la cadena ligera de BoNT/E.

Por otra parte, los experimentos de Chaddock et al. exploraron una estrategia de conjugación de aglutinina de germen de trigo (WGA) a un mutante de BoNT/A sin su dominio de unión (LH(N)/A), constituyendo así el derivado WGA-LH(N)/A. Su aplicación in vitro a diversas líneas celulares naturalmente resistentes al efecto de BoNT/A mostró la inhibición de las respuestas secretoras de estas células, lo que abre una vía de estudio al uso de BoNT/A en células no neuronales aprovechando su efecto de escisión sobre los motivos SNARE (64).

Posibles líneas de mejora de la toxina

En la línea de los experimentos de Dolly y Wang, una propuesta para mejorar aún más la duración del efecto de BoNT/A y su especificidad surgiría de exponer su híbrido LC/E-BoNT/A a una PCR propensa al error. Con cultivos in vitro de neuronas, podrían seleccionarse aquellos mutantes que presentasen unas características mejores con respecto a la toxina LC/E-BoNT/A, como una mayor especificidad, mientras que utilizando modelos animales (ratón o rata), se podrían elegir las que tuvieran una mayor duración del efecto.

De esta forma, utilizaríamos las ventajas del mutante de Dolly y Wang (la especificidad de unión de BoNT/A y la mayor persistencia del efecto de escisión de LC/E), pero potencialmente mejoraríamos ambas características al seleccionar los mutantes que mejores resultados arrojasen en los experimentos con cultivo in vitro e in vivo.

Adicionalmente, imitando los experimentos de Chaddock, podría replicarse el mutante LH(N)/A, esto es, BoNT/A sin su dominio de unión, y conjugarlo a nanoanticuerpos (nanobodies) para dirigirlos a dianas específicas donde la función de bloqueo de liberación vesicular SNARE-dependiente presente una ventaja. Esta vía podría permitir potencialmente mejorar los síntomas de patologías que hasta ahora no hacían uso de BoNT/A debido a su especificidad exclusiva de células neuronales.

5. Conclusiones

Finalmente, se extraen las siguientes conclusiones del trabajo:

1. No solo se van conociendo con detalle los mecanismos patológicos de BoNT/A, sino que, gracias a las investigaciones de los últimos años, se ha podido aplicar con éxito a numerosos pacientes con dolencias y patologías diversas, gracias principalmente a su capacidad para interrumpir la fusión de vesículas celulares a las membranas neuronales, evitando la liberación de mensajeros y receptores.
2. Las modificaciones en la toxina y su fusión génica con otros serotipos y proteínas están permitiendo dibujar una nueva vía para tratar enfermedades con origen neuronal (por mejora de duración del efecto o especificidad) y no neuronal (aprovechando el reconocimiento de algunos serotipos por las neuronas para dirigir otros fármacos)
3. Todavía se requiere una investigación más profunda de los aspectos compilados en este trabajo con el objetivo de mejorar los síntomas de un número creciente de condiciones clínicas.

Conclusions

Finally, the following conclusions are collected from the work:

1. Not only the pathological mechanisms of BoNT/A are being known in detail, but also, thanks to research in recent years, it has been successfully applied to numerous patients with various ailments and pathologies, mainly thanks to its ability to interrupt the fusion of cell vesicles to neuronal membranes, preventing the release of messengers and receptors.
2. The toxin modifications and its gene fusion with other serotypes and possibilities are allowing to draw a new way to treat diseases with neuronal origin (by improving the duration of the effect or specificity) and non-neuronal (taking advantage of the recognition of some serotypes by neurons to deliver other drugs)
3. Further research of the aspects compiled in this work is still needed in order to improve the symptoms of an increasing number of clinical conditions.

6. Bibliografía

1. Carter AT, Paul CJ, Mason DR, Twine SM, Alston MJ, Logan SM, et al. Independent evolution of neurotoxin and flagellar genetic loci in proteolytic *Clostridium botulinum*. *BMC Genomics* [Internet]. 2009 Mar 19 [cited 2021 May 12];10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19298644/>
2. Botulismo [Internet]. [cited 2021 May 9]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/botulism>
3. Carrillo-Marquez MA. Botulism. *Pediatr Rev* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2021 May 12];37(5):183–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27139326/>
4. Lacy DB, Tepp W, Cohen AC, DasGupta BR, Stevens RC. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity [Internet]. Vol. 5, *Nature Structural Biology*. *Nat Struct Biol*; 1998 [cited 2021 May 9]. p. 898–902. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9783750/>
5. botA - Botulinum neurotoxin type A precursor - *Clostridium botulinum* - botA gene & protein [Internet]. [cited 2021 May 9]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/PODPIO>
6. Fischer A, Sambashivan S, Brunger AT, Montal M. Beltless translocation domain of botulinum neurotoxin A embodies a minimum ion-conductive channel. *J Biol Chem* [Internet]. 2012 Jan 13 [cited 2021 May 18];287(3):1657–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22158863/>
7. Brunger AT, Breidenbach MA, Jin R, Fischer A, Santos JS, Montal M. Botulinum Neurotoxin Heavy Chain Belt as an Intramolecular Chaperone for the Light Chain. *PLoS Pathog* [Internet]. 2007 Sep 28 [cited 2021 May 18];3(9):e113. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17907800/>
8. botA - Botulinum neurotoxin type A precursor - *Clostridium botulinum* (strain Hall / ATCC 3502 / NCTC 13319 / Type A) - botA gene & protein [Internet]. [cited 2021 May 9]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/PODPI1>
9. CY L, JH G, MD P. SERS detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin serotypes A and B in buffer and serum: Towards the development of a biodefense test platform. *Anal Chim acta X* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2021 Sep 6];1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33186413/>
10. Pfam: Family: Peptidase_M27 (PF01742) [Internet]. [cited 2021 May 9]. Available from: https://pfam.xfam.org/family/Peptidase_M27
11. TC U, LM W, S S, WF F, JJ S, M S. Structure of the receptor binding fragment HC of tetanus neurotoxin. *Nat Struct Biol* [Internet]. 1997 [cited 2021 Sep 3];4(10):788–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9334741/>
12. FJ L, MA O. Secondary structural predictions for the clostridial neurotoxins. *Proteins* [Internet]. 1994 [cited 2021 Sep 3];20(4):293–300. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7731948/>
13. Nowakowska MB, Douillard FP, Lindström M. Looking for the X factor in bacterial pathogenesis: Association of orfX-p47 gene clusters with toxin genes in clostridial and non-clostridial bacterial species. *Toxins (Basel)* [Internet]. 2019 Dec 31 [cited 2021 May

- 18];12(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31906154/>
14. Carter AT, Peck MW. Genomes, neurotoxins and biology of *Clostridium botulinum* Group I and Group II. *Res Microbiol* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2021 May 18];166(4):303–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25445012/>
 15. Smith TJ, Hill KK, Xie G, Foley BT, Williamson CHD, Foster JT, et al. Genomic sequences of six botulinum neurotoxin-producing strains representing three clostridial species illustrate the mobility and diversity of botulinum neurotoxin genes. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2021 May 9];30:102–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25489752/>
 16. Smith TJ, Hill KK, Xie G, Foley BT, Williamson CHD, Foster JT, et al. Genomic sequences of six botulinum neurotoxin-producing strains representing three clostridial species illustrate the mobility and diversity of botulinum neurotoxin genes. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2021 May 18];30:102–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25489752/>
 17. Hill KK, Smith TJ. Genetic Diversity Within *Clostridium botulinum* Serotypes, Botulinum Neurotoxin Gene Clusters and Toxin Subtypes. In: *Current topics in microbiology and immunology* [Internet]. *Curr Top Microbiol Immunol*; 2012 [cited 2021 May 18]. p. 1–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23239346/>
 18. Smith TJ, Hill KK, Foley BT, Detter JC, Munk AC, Bruce DC, et al. Analysis of the neurotoxin complex genes in *Clostridium botulinum* A1-A4 and B1 strains: BoNT/A3, /Ba4 and /B1 clusters are located within plasmids. *PLoS One* [Internet]. 2007 Dec 5 [cited 2021 May 21];2(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18060065/>
 19. Dover N, Barash JR, Hill KK, Davenport KW, Teshima H, Xie G, et al. *Clostridium botulinum* Strain Af84 Contains Three Neurotoxin Gene Clusters: Bont/A2, bont/F4 and bont/F5. *PLoS One* [Internet]. 2013 Apr 12 [cited 2021 May 18];8(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23637798/>
 20. Raffestin S, Dupuy B, Marvaud JC, Popoff MR. BotR/A and TetR are alternative RNA polymerase sigma factors controlling the expression of the neurotoxin and associated protein genes in *Clostridium botulinum* type A and *Clostridium tetani*. *Mol Microbiol* [Internet]. 2005 Jan [cited 2021 May 18];55(1):235–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15612931/>
 21. Mascher G, Mertaola A, Korkeala H, Lindström M. Neurotoxin synthesis is positively regulated by the sporulation transcription factor Spo0A in *Clostridium botulinum* type E. *Environ Microbiol* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2021 May 18];19(10):4287–300. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28809452/>
 22. Connan C, Popoff MR. Two-component systems and toxinogenesis regulation in *Clostridium botulinum*. *Res Microbiol* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2021 May 9];166(4):332–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25592073/>
 23. Zhang Z, Korkeala H, Dahlsten E, Sahala E, Heap JT, Minton NP, et al. Two-Component Signal Transduction System CBO0787/CBO0786 Represses Transcription from Botulinum Neurotoxin Promoters in *Clostridium botulinum* ATCC 3502. *PLoS Pathog* [Internet]. 2013 [cited 2021 May 10];9(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23555260/>
 24. Genome Information [Internet]. [cited 2021 May 10]. Available from:

http://nucleix.mbu.iisc.ernet.in/cgi-bin/prombase/geneinf.cgi?ncbi=NC_009698

25. Theologis A. Plant hormones: More than one way to detect ethylene. *Curr Biol*. 1996 Feb 1;6(2):144–5.
26. Matak I, Bölcskei K, Bach-Rojecky L, Helyes Z. Mechanisms of botulinum toxin type A action on pain [Internet]. Vol. 11, *Toxins*. MDPI AG; 2019 [cited 2021 May 9]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31387301/>
27. Benefield DA, Dessain SK, Shine N, Ohi MD, Lacy DB. Molecular assembly of botulinum neurotoxin progenitor complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013 Apr 2 [cited 2021 May 18];110(14):5630–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23509303/>
28. Amatsu S, Fujinaga Y. Botulinum hemagglutinin: Critical protein for adhesion and absorption of neurotoxin complex in host intestine. In: *Methods in Molecular Biology* [Internet]. Humana Press Inc.; 2020 [cited 2021 May 9]. p. 183–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32306327/>
29. Lee K, Gu S, Jin L, Le TTN, Cheng LW, Strotmeier J, et al. Structure of a Bimodular Botulinum Neurotoxin Complex Provides Insights into Its Oral Toxicity. *PLoS Pathog* [Internet]. 2013 Oct [cited 2021 May 18];9(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24130488/>
30. Ferrari A, Manca M, Tugnoli V, Pini LA. Pharmacological differences and clinical implications of various botulinum toxin preparations: A critical appraisal. *Funct Neurol* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2021 May 18];33(1):7–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29633692/>
31. A J, M L. Use of botulinum toxin in Parkinson’s disease. *Parkinsonism Relat Disord* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2021 Sep 1];59:57–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30579818/>
32. Fujinaga Y, Sugawara Y, Matsumura T. Uptake of Botulinum Neurotoxin in the Intestine. In: *Current topics in microbiology and immunology* [Internet]. *Curr Top Microbiol Immunol*; 2012 [cited 2021 May 18]. p. 45–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23239348/>
33. Do TP, Hvedstrup J, Schytz HW. Botulinum toxin: A review of the mode of action in migraine [Internet]. Vol. 137, *Acta Neurologica Scandinavica*. Blackwell Publishing Ltd; 2018 [cited 2021 May 9]. p. 442–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29405250/>
34. (PDF) BOTOX-WHY WHEN WHERE [Internet]. [cited 2021 Sep 6]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/334545067_BOTOX-WHY_WHEN_WHERE
35. Bajohrs M, Rickman C, Binz T, Davletov B. A molecular basis underlying differences in the toxicity of botulinum serotypes A and E. *EMBO Rep* [Internet]. 2004 Nov [cited 2021 May 9];5(11):1090–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15486565/>
36. Huang X, Wheeler MB, Kang YH, Sheu L, Lukacs GL, Trimble WS, et al. Truncated SNAP-25 (1-197), like botulinum neurotoxin A, can inhibit insulin secretion from HIT-T15 insulinoma cells. *Mol Endocrinol* [Internet]. 1998 [cited 2021 May 18];12(7):1060–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9658409/>
37. Y L, T L, W L. Botulinum Neurotoxin Therapy for Depression: Therapeutic Mechanisms and Future Perspective. *Front psychiatry* [Internet]. 2021 Apr 23 [cited 2021 Aug 28];12.

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33967844/>

38. YH L, BJ C, CH L. Mechanism of Action of Botulinum Toxin A in Treatment of Functional Urological Disorders. *Toxins (Basel)* [Internet]. 2020 [cited 2021 Aug 17];12(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32085522/>
39. J M, J W, M S, JO D. TNF α induces co-trafficking of TRPV1/TRPA1 in VAMP1-containing vesicles to the plasmalemma via Munc18-1/syntaxin1/SNAP-25 mediated fusion. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Feb 18 [cited 2021 Sep 6];6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26888187/>
40. P T, S P. Botulinum toxin in movement disorders. *Neurol India* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2021 Sep 1];66(Supplement):S79–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29503330/>
41. L S, Y T, W K, Z R, Z R, W H. Efficacy and possible mechanisms of botulinum toxin treatment of oily skin. *J Cosmet Dermatol* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2021 Aug 30];18(2):451–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30697928/>
42. Y L, J L, X L, CJ S, QL Z, ZH W, et al. Antidepressant-Like Action of Single Facial Injection of Botulinum Neurotoxin A is Associated with Augmented 5-HT Levels and BDNF/ERK/CREB Pathways in Mouse Brain. *Neurosci Bull* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2021 Aug 28];35(4):661–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30900142/>
43. AC M, M F. Direct and indirect evidences of BDNF and NGF as key modulators in depression: role of antidepressants treatment. *Int J Neurosci* [Internet]. 2019 Mar 4 [cited 2021 Aug 28];129(3):283–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30235967/>
44. BR G, M B, R N, PJ C, CJ H. Early changes in emotional processing as a marker of clinical response to SSRI treatment in depression. *Transl Psychiatry* [Internet]. 2016 [cited 2021 Sep 3];6(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27874847/>
45. J T, W X, B X, L R, W T, C C, et al. Involvement of normalized NMDA receptor and mTOR-related signaling in rapid antidepressant effects of Yueju and ketamine on chronically stressed mice. *Sci Rep* [Internet]. 2015 Aug 28 [cited 2021 Sep 3];5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26315757/>
46. R E, O W, N M, MBH Y, W B, H S. The involvement of BDNF-CREB signaling pathways in the pharmacological mechanism of combined SSRI- antipsychotic treatment in schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2021 Sep 3];27(5):470–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28410959/>
47. S G, F O, M G. Transient CREB-mediated transcription is key in direct neuronal reprogramming. *Neurogenes (Austin, Tex)* [Internet]. 2017 Jan [cited 2021 Sep 3];4(1):e1285383. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28321434/>
48. JC B, G P, F F. Deeper than skin deep - The effect of botulinum toxin-A on emotion processing. *Toxicon* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2021 Aug 28];118:86–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27130038/>
49. S I, I M, A D, A S, M M, F P, et al. Effects of botulinum toxin type A facial injection on monoamines and their metabolites in sensory, limbic and motor brain regions in rats. *Neurosci Lett* [Internet]. 2016 Mar 23 [cited 2021 Aug 28];617:213–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26876447/>

50. E R, A P, K P-B, J M. Botulinum Toxin Type A-A Modulator of Spinal Neuron-Glia Interactions under Neuropathic Pain Conditions. *Toxins (Basel)* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2021 Aug 28];10(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29614835/>
51. S B, G D. TRP Channels and Migraine: Recent Developments and New Therapeutic Opportunities. *Pharmaceuticals (Basel)* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2021 Aug 17];12(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30970581/>
52. M S, C T. Implications of Transient Receptor Potential Cation Channels in Migraine Pathophysiology. *Neurosci Bull* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 Aug 28];37(1):103–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32870468/>
53. V V, S M, A M, JB D, PA M. Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J Physiol* [Internet]. 2001 Aug 1 [cited 2021 Sep 1];534(Pt 3):813–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11483711/>
54. RQ S, YJ T, NB L, JY Y, Q L, WD W. Calcitonin gene-related peptide receptor activation produces PKA- and PKC-dependent mechanical hyperalgesia and central sensitization. *J Neurophysiol* [Internet]. 2004 Nov [cited 2021 Sep 3];92(5):2859–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15486424/>
55. Fleming KC, Volcheck MM. Central Sensitization Syndrome and the Initial Evaluation of a Patient with Fibromyalgia: A Review. *Rambam Maimonides Med J* [Internet]. 2015 Apr 29 [cited 2021 Sep 3];6(2):e0020. Available from: [/pmc/articles/PMC4422459/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26984967/)
56. X Z, AM S, V N, MF B, R B. Extracranial injections of botulinum neurotoxin type A inhibit intracranial meningeal nociceptors' responses to stimulation of TRPV1 and TRPA1 channels: Are we getting closer to solving this puzzle? *Cephalalgia* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2021 Aug 31];36(9):875–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26984967/>
57. M K, GT S, S K, TB B, CP S. Botulinum toxin A inhibits ATP release from bladder urothelium after chronic spinal cord injury. *Neurochem Int* [Internet]. 2004 Dec [cited 2021 Sep 2];45(7):987–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15337297/>
58. H S-B, J P, HH K, GW L, K M, J N. Botulinum toxin A detrusor injections reduce postsynaptic muscular M2, M3, P2X2, and P2X3 receptors in children and adolescents who have neurogenic detrusor overactivity: a single-blind study. *Urology* [Internet]. 2013 May [cited 2021 Aug 17];81(5):1052–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23419459/>
59. M M, D M, T F, J J, S T, T M, et al. Mice lacking M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but still viable. *J Neurosci* [Internet]. 2002 Dec 15 [cited 2021 Aug 22];22(24):10627–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12486155/>
60. BI K, K A. Botulinum Toxin Treatment of Blepharospasm, Orofacial/Oromandibular Dystonia, and Hemifacial Spasm. *Semin Neurol* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2021 Sep 6];36(1):84–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26866500/>
61. C R-E, MR P. Engineering Botulinum Neurotoxins for Enhanced Therapeutic Applications and Vaccine Development. *Toxins (Basel)* [Internet]. 2020 Dec 22 [cited 2021 Sep 6];13(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33374954/>
62. M N, YR Y, J M, J W, JO D. A SNAP-25 cleaving chimera of botulinum neurotoxin /A and

/E prevents TNF α -induced elevation of the activities of native TRP channels on early postnatal rat dorsal root ganglion neurons. *Neuropharmacology* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2021 Sep 6];138:257–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29906413/>

63. J W, J M, GW L, TH Z, A S, MO B, et al. Novel chimeras of botulinum neurotoxins A and E unveil contributions from the binding, translocation, and protease domains to their functional characteristics. *J Biol Chem* [Internet]. 2008 Jun 20 [cited 2021 Sep 6];283(25):16993–7002. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18400760/>
64. JA C, JR P, LM F, JD B, MJ D, SJ F, et al. Inhibition of vesicular secretion in both neuronal and nonneuronal cells by a retargeted endopeptidase derivative of *Clostridium botulinum* neurotoxin type A. *Infect Immun* [Internet]. 2000 May [cited 2021 Sep 6];68(5):2587–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10768948/>

7. Anexos

Year	Author/Institution	Botulinum Toxin, Commercial Designation
1988	Allergan	Oculinum (BoNT/A): clinical trials
1993	Montecucco and Schiavo	SNAP-25, molecular target of botulinum toxin type A
1995	MHRA	Approves Dysport® (abobotulinumtoxinA, Ipsen)(~5 ng/500 mouse LD50) for strabismus in UK
2000	FDA	Approves Botox® (onabotulinumtoxinA, Allergan) for cervical dystonia
2001		Botox® approval for cosmetic procedures in Canada and New Zealand Approves first type B toxin, NeuroBloc® for cervical dystonia
2002	FDA	Approves Botox® for cosmetic therapy (Australia, Switzerland, Taiwan, and Singapore)
2003	AFSSAPS	Approves Botox as Vistabel® (France)
2003	FDA	Approves Myobloc® (rimabotulinumtoxinB, Solstice Neuroscience) for cervical dystonia Neurobloc®
2004	FDA	Approves Botox® for primary axillary hyperhidrosis (severe underarm sweating)
2006	MHRA	Approves Botox as Vistabel® for treatment of glabellar lines
2006	-	Xeomin® (incobotulinumtoxinA, Merz) licensed in Germany for blepharospasm and cervical dystonia in adults
2006	Korean FDA	Neuronox® (Medy-Tox) approval for blepharospasm
2009	MHRA FDA	Approves Azzalure® for treatment of glabellar lines approves Dysport® for glabellar lines and cervical dystonia
2010	FDA	Approves Botox® to treat chronic migraine, adult upper limb spasticity, and specific form of urinary incontinence Approves Xeomin® for cervical dystonia and blepharospasm
2011	FDA	Approves Xeomin® to treat bladder detrusor over-activity in patients with neurologic conditions

Anexo 1. Tabla de soluciones comerciales basadas en toxina botulínica, sus usos clínicos aprobados e institución reguladora

2011	FDA	Approves Xeomin® (incobotulinumtoxinA) as Bocouture® for glabellar lines in adult patients
2012	NHS UK	Approves Botox® to treat chronic migraine
2013	Korea FDA	Approves Nabota® (Daewoongs Pharmaceuticals) approves Botox® for overactive bladder and lateral canthal lines
2014	China	BoNT/A product also approved as Lantox® and Prosigne® (Lanzhou Institute of Biological Products, China)
2015	FDA	FDA Approval of Xeomin® (incobotulinumtoxinA) and Dysport® (AbobotulinumtoxinA) for adult upper limb spasticity
2017		Approval of Botox® and Dysport® to treat adult lower limb spasticity and Dysport® only to treat children lower limb spasticity
2018	FDA	FDA approves Xeomin® for sialorrhea Nabota® (Korea 2014) approved by FDA in 2019 Distributed in USA since 2018 as Jcuveau®
2019	FDA	Approves Botox® for pediatric upper limb spasticity Approves Jcuveau® for glabellar lines

FDA, Food and Drug administration; MHRA, Medicines and Healthcare Product Regulatory Agency; AFSSAPS, French Agency for the Safety of Health products (currently ANSM) (Modified from Rasetti-Escargueil et al. [30] and Whitcup [31].

Anexo 2. Tabla de soluciones comerciales, instituciones y usos clínicos (continuación)