

DEDICATORIA

Dedico este paso a mi familia quienes me apoyaron durante mi proceso de formación profesional.

A mis docentes por sus conocimientos para culminar mi formación académica.

Y a todas las personas que participaron directa e indirectamente en mi vida para alcanzar este logro

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de estudiar

A mi familia por apoyarme todo este tiempo y alcanzar mis metas

*A la Universidad Colegio mayor de Cundinamarca por la formación profesional que
me brindó*

*A la docente Edith Hernández, quien me brindó su apoyo y sabiduría para
culminar este trabajo*

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
2. OBJETIVOS	15
2.1. OBJETIVO GENERAL	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. ANTECEDENTES	16
4. MARCO REFERENCIAL.....	18
4.1. <i>Clostridium</i>	18
4.1.1. Botulismo	20
5. TOXINA BOTULÍNICA	21
5.1. Serotipos de toxina botulínica.....	21
5.2. Genes codificantes de la toxina botulínica	21
5.3. Regulación de la producción de toxinas en <i>C. botulinum</i>	23
5.3.1. Estímulos ambientales y nutricionales	23
5.3.2. Sistemas de transducción de señales de dos componentes	23
5.3.3. Percepción de quórum.....	24
5.3.4. Factores sigma (σ) accesorios	24
5.4. Estructura de la toxina botulínica	24
5.5. Mecanismo de acción de la toxina botulínica	26
5.5.1. Unión a la membrana celular.....	26
5.5.2. Internalización a la neurona	27
5.5.3. Translocación de la toxina dentro del endosoma	27

5.5.4. Proteólisis de las proteínas SNARE específicas	28
6. APLICACIONES DE LA TOXINA BOTULÍNICA	28
6.1. Formulaciones de la toxina botulínica.....	29
6.1.1. Onabotulinumtoxin A	30
6.1.1.1. Manejo de Onabotulinumtoxin A	31
6.1.1.2. Inicio y duración del efecto	31
6.1.2. Abobotulinumtoxin A	32
6.1.3. Incobotulinumtoxin A.....	32
6.1.3.1. Difusión del producto	33
6.2. Fabricación del producto	33
6.3. Contraindicaciones generales previas al tratamiento	34
6.4. Consideraciones inmunológicas.....	34
6.5. Jeringas y agujas.....	35
6.6. Uso cosmético de la toxina botulínica.....	35
6.8.1. Toxina botulínica para arrugas periorales	35
6.8.1.1. Aplicación de la toxina botulínica en el músculo orbicular de la boca	36
6.8.1.2. Aplicación de la toxina botulínica en el músculo depresor del ángulo de la boca.....	36
6.8.1.3. Aplicación de la toxina botulínica en el músculo mentoniano.....	37
6.8.1.4. Aplicación de la toxina botulínica en las bandas del platisma	38
6.8.1.5. Aplicación de la toxina botulínica en el músculo cigomático mayor y menor	38
6.8.2. Toxina botulínica para arrugas periorculares	39

6.8.2.1.	Aplicación de la toxina botulínica en el músculo corrugador superciliar	39
6.8.2.2.	Aplicación de la toxina botulínica en el músculo frontal.....	40
6.8.2.3.	Aplicación de la toxina botulínica en el músculo orbicular de los ojos 40	
6.8.2.4.	Modificación farmacológica de las cejas	41
6.8.2.5.	Aplicación de la toxina botulínica en el músculo nasal.....	41
6.8.3.	Complicaciones de la aplicación de la toxina botulínica a nivel cosmético	42
6.8.3.1.	Complicaciones de inyectar los músculos de la zona periocular.....	42
6.8.3.1.1.	Ptosis del párpado, diplopía y estrabismo	42
6.8.3.1.2.	Xeroftalmia iatrogénica o síndrome de ojo seco	43
6.8.3.1.3.	Ptosis de la ceja	43
6.8.3.2.	Complicaciones de inyectar los músculos periorales	44
6.8.3.2.1.	Ptosis en los labios	44
6.8.3.2.2.	Deterioro en los músculos del cuello.....	44
6.8.3.3.	Complicaciones raras	45
6.9.	Otros usos de la toxina botulínica	45
7.	DISEÑO METODOLÓGICO	47
7.1.	Tipo de investigación	47
7.1.1.	Universo	47
7.1.2.	Población	47
7.1.3.	Muestra.....	47
7.2.	Criterios de selección de la bibliografía revisada.....	47
7.2.1.	Criterios de inclusión.....	47

7.2.2.	Criterios de exclusión	48
7.3.	Procedimientos	48
7.3.1.	Búsqueda de la información.....	48
7.3.2.	Selección de documentos	48
7.3.3.	Revisión bibliográfica	48
7.3.4.	Análisis de la información	49
8.	RESULTADOS	50
8.1.	Tipo de documento.....	50
8.2.	Año de publicación.....	50
8.3.	Idioma de publicación	51
8.4.	País de publicación	52
8.5.	Base de datos	53
8.6.	Tema de investigación	54
8.7.	Publicaciones sobre el gen <i>bont</i>	55
8.8.	Documentación relacionada con mecanismos de regulación.....	56
8.9.	Documentación relacionada con el mecanismo de acción.....	57
8.10.	Aplicaciones cosméticas de la toxina botulínica tipo A	58
8.11.	Complicaciones luego del tratamiento con la toxina botulínica tipo A	58
8.12.	Aplicaciones clínicas de la toxina botulínica tipo A.....	59
8.13.	Formulaciones empleadas a nivel cosmético.....	60
8.14.	Formulaciones empleadas a nivel clínico	61
9.	DISCUSIÓN.....	62
10.	CONCLUSIONES	68

RECOMENDACIONES	69
BIBLIOGRAFÍA.....	70

LISTADO DE FIGURAS

FIGURA 1. Estructura de la toxina botulínica.....	25
FIGURA 2. Jeringas y agujas.....	35
FIGURA 3. Puntos de inyección del músculo orbicular de la boca.....	36
FIGURA 4. Puntos de inyección del músculo depresor de la boca.....	37
FIGURA 5. Puntos de inyección del músculo mentoniano.....	37
FIGURA 6. Puntos de inyección del músculo platisma.....	38
FIGURA 7. Puntos de inyección de los músculos cigomáticos.....	39
FIGURA 8. Puntos de inyección del músculo corrugador.....	40
FIGURA 9. Puntos de inyección del músculo frontal.....	40
FIGURA 10. Puntos de inyección del músculo orbicular.....	41
FIGURA 11. Puntos de inyección del músculo nasal.....	41
FIGURA 12. Tipo de documento.....	50
FIGURA 13. Año de publicación.....	51
FIGURA 14. Idioma de publicación.....	52
FIGURA 15. País de publicación.....	53
FIGURA 16. Base de datos.....	54
FIGURA 17. Publicaciones según el tema.....	55
FIGURA 18. Tipos de gen <i>bont</i>.....	56
FIGURA 19. Mecanismo de regulación de la toxina botulínica.....	57
FIGURA 20. Mecanismo de acción.....	57
FIGURA 21. Aplicaciones cosméticas.....	58

FIGURA 22. Complicaciones.....	59
FIGURA 23. Aplicaciones clínicas.....	60
FIGURA 24. Formulaciones a nivel cosmético.....	61
FIGURA 25. Formulaciones a nivel clínico.....	61

LISTADO DE TABLAS

TABLA 1. Taxonomía de <i>Costridium</i>	18
TABLA 2. Especies representativas.....	18
TABLA 3. Tipos de botulismo.....	20
TABLA 4. Tipos de gen <i>bont</i>	22
TABLA 5. Receptores de la toxina botulínica.....	26
TABLA 6. Sitios de escisión.....	28
TABLA 7. Perfil de las formulaciones.....	29
TABLA 8. Aplicaciones clínicas de la toxina botulínica.....	45

RESUMEN

El tratamiento con toxina botulínica tipo A, es uno de los más empleados para mejorar arrugas gracias a que es efectivo y seguro, así como genera poco dolor en comparación con otros tratamientos estéticos. En Colombia y en el mundo, hay un aumento en la demanda del producto, siendo necesario un mayor número de documentos que informen a los pacientes. Por lo tanto, el propósito de este trabajo fue hacer una revisión bibliográfica sobre el uso de la toxina botulínica tipo A producida por *Clostridium botulinum* en el campo estético. La información recolectada de las fuentes bibliográficas fue clasificada por año, país, idioma, fuente, formato y temática. Las fuentes bibliográficas fueron conformadas por diversos tipos de documentos. El proceso de recolección de la información reportó el uso de diferentes formulaciones comerciales de la toxina botulínica tipo A, indicaciones de los fabricantes y efectos adversos de la aplicación de la toxina botulínica. También se reportaron los genes codificantes, la regulación en la producción, la estructura y mecanismo de acción de la toxina botulínica, lo cual es fundamental para comprender la fabricación y los efectos de las diferentes formulaciones. Finalmente se encontró que la mayoría de las investigaciones provenían de EE. UU., ya que según las estadísticas referenciadas, es el país con mayor demanda y por lo tanto, requería mayor cantidad de investigaciones. Esta revisión bibliográfica se enfoca en las generalidades del uso de la toxina botulínica tipo A en el campo cosmético, así como los diferentes parámetros para realizar el procedimiento.

Palabras clave: Toxina botulínica, *Clostridium botulinum*, Onabotulinumtoxin A, Abobotulinumtoxin A, Incobotulinumtoxin A.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias del género *Clostridium* generan esporas que permanecen en el ambiente por largos periodos. Pese a que su distribución es bastante amplia, la germinación de las esporas sólo se lleva a cabo en condiciones de anaerobiosis y en presencia de los requerimientos nutricionales necesarios. Algunas especies se pueden encontrar en restos de frutas descompuestos, cadáveres o en el suelo. Normalmente las infecciones ocurren de forma accidental por vía oral⁴¹. *C. botulinum* produce la toxina botulínica, la cual es una metaloproteasa dependiente del Zinc²⁶, cuya finalidad es inhibir la liberación de neurotransmisor acetilcolina para ocasionar botulismo. Sin embargo, el botulismo también puede ser causado por *C. baratii* y *C. butyricum*⁷.

El envejecimiento normalmente se presenta con la rigidez de los tejidos conectivos compuestos en su mayoría por colágeno como córneas, piel, pulmones, cartílago y arterias⁴. El envejecimiento de la piel puede ser causado por factores como el tabaquismo, la exposición al sol y la contaminación ambiental, en cuanto a ésta última, no sólo afecta la polución del aire exterior sino también la contaminación del aire en interiores provenientes por ejemplo de los combustibles fósiles usados para cocinar o aires acondicionados³. Actualmente la toxina botulínica es un neuromodulador muy importante en el campo estético gracias a su capacidad de mejorar la apariencia, y pese a los eventos adversos económicos globales, la aplicación de la toxina producida por *C. botulinum* ha ido en aumento desde el año 1991, cuando se implementó su uso en el área cosmética⁴⁶.

Su popularidad puede deberse a que la percepción de las arrugas por parte de los pacientes puede afectar su vida social⁶⁴. Los expertos sugieren que hay una retroalimentación negativa en otras personas al fruncir el ceño⁶⁰, y asimismo se ha observado una mayor actividad del músculo corrugador en mujeres con desordenes depresivos mayores. Por lo tanto, la toxina botulínica puede mejorar la apariencia e influir en los estados emocionales de las personas, lo cual fue corroborado en un

estudio, que evaluó 10 pacientes con depresión clínica, a los cuales se les inyectó la toxina en el entrecejo y en las líneas horizontales de la frente, luego de mejorar la apariencia, se redujeron los síntomas de la depresión en 9 pacientes. Así como en otros estudios se ha encontrado que los tratamientos de prevención de arrugas redujeron las emociones negativas, asimismo los pacientes que presentan mejoría suelen repetir el procedimiento⁶⁴. Cabe decir que en el mundo hay más de 121 millones de personas con depresión que podrían ser tratadas con toxina botulínica para mejorar su estado de ánimo⁴⁶.

La inyección de la toxina botulínica tipo A se ha convertido en el procedimiento mínimamente invasivo para correcciones estéticas más solicitado según cifras de la International Society of Aesthetic Plastic Surgery, aplicándose 5'033.693 veces en el año 2017⁷⁷. Según la American Society of Plastic Surgeons en Estados Unidos se realizaron 7'437.378 de aplicaciones en el año 2018⁷⁸. En Colombia en el año 2017 se inyectó la toxina botulínica 82.120 veces con fines estéticos, de los cuales 51,8% fueron realizados en hospitales, 25% en centros estéticos independientes, 23,1% en consultorios y 0,1% en sitios no especificados. La inyección de la toxina botulínica es muy popular en Colombia, siendo solicitado por el 97% de los pacientes que deseaban un procedimiento mínimamente invasivo para mejorar su apariencia, gracias a que es el procedimiento menos doloroso para eliminar las arrugas además causa pocos hematomas y tiene una rápida recuperación^{76, 77}. Asimismo, Colombia ocupa el séptimo lugar entre los países del mundo con más procedimientos estéticos realizados, de los cuales el 20% de los casos corresponde a pacientes extranjeros, y por lo tanto es una de las potencias en turismo médico^{77, 78}.

Pese a la gran demanda, hay pocas escalas de evaluación objetiva sobre la efectividad del producto. Muchos fabricantes comercializan sus productos con fotografías de pre y post-inyección sin tener en cuenta el intervalo del tiempo para la aparición de resultados. Finalmente los médicos son los responsables de los resultados exitosos, por lo que evalúan por metodologías independientes cada

producto antes de implementarse. La eficacia del tratamiento es subjetiva por parte de la percepción del profesional y del paciente³.

Además hay poca documentación disponible sobre el proceso de fabricación de las diferentes formulaciones de la toxina botulínica, cuyas variedades van en aumento. En los últimos años se ha buscado mejorar el método de aislamiento y purificación de la toxina botulínica de Schantz⁸⁰, del mismo modo que mejorar la composición del complejo proteico de la formulación original que había mostrado ser óptima en la investigación de Alan Scott en 1970⁸¹. Específicamente las características que se quisieran mejorar son la duración del efecto y la cantidad de albúmina sérica que se incluye como sustancias auxiliares. Por ejemplo, la formulación experimental RT002 demostró una mayor duración en el estudio fase II, alcanzando los 6 meses. También la formulación experimental DWP450, que se encuentra en fase III, se encuentra libre de albúmina^{80, 81}.

Teniendo en cuenta los datos mencionados anteriormente, se realizó una revisión bibliográfica sobre fuentes literarias encontradas en diversas bases de datos, en un periodo de tiempo comprendido entre los años 2012-2018, acerca de la aplicación de la toxina botulínica tipo A en el campo estético. Con la bibliografía recolectada se realizó una descripción sobre los genes codificantes y el mecanismo de acción de la toxina botulínica, así como se le da importancia a las diferentes aplicaciones de la toxina botulínica tipo A con fines estéticos. El desarrollo de esta revisión bibliográfica busca promover el conocimiento actualizado sobre el uso cosmético de la toxina botulínica, aportando un documento actualizado sobre las generalidades de la toxina botulínica tipo A empleada en el mejoramiento de las arrugas, ya que cada vez es más solicitado en el mundo, por lo que es de interés para la sociedad en general.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Revisar fuentes bibliográficas relacionadas con la aplicación de la toxina botulínica tipo A producida por *Clostridium botulinum* en el mejoramiento de las arrugas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir los genes implicados en la síntesis de los diversos tipos de toxinas botulínicas.
- Mencionar los mecanismos de regulación en la producción de la toxina botulínica.
- Describir el mecanismo de acción de la toxina botulínica en el sistema nervioso.
- Establecer los usos más frecuentes de la toxina botulínica tipo A producida por *C. botulinum* en el campo estético.
- Nombrar las complicaciones del uso de la toxina botulínica tipo A en el uso cosmético.

3. ANTECEDENTES

Se ha encontrado registros históricos que asociaban algunos alimentos preparados en condiciones anaerobias con parálisis por ejemplo, en el siglo X, el emperador bizantino Leo VI prohibió el consumo de salchichas de sangre o morcilla, las cuales se relacionaban con envenenamiento. No obstante, no fue sino hasta 1895 que Van Ermengem logró aislar la bacteria de un brote ocurrido en Bélgica. Luego en 1928 Snipe y Sommer aislaron la toxina botulínica tipo A e incluso fue considerada como arma biológica^{1, 88}.

Alan Scott en 1960 inyectó los músculos oculares de monos para desarrollar un tratamiento para estrabismo⁵³, y en 1970 inició el uso de la toxina botulínica como medicamento, posteriormente en 1989 fue aprobada por Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento del blefarospasmo, estrabismo y espasmo hemifacial¹. Su uso cosmético inicio en 1991, cuando se usó para corregir las líneas glabellares y luego se usó para otras áreas como las líneas horizontales de la frente. Las aplicaciones de la toxina botulínica aumentaron, y nuevas investigaciones demostraron que es un tratamiento seguro y generando un buen interés como neuromodulador^{1, 46}.

En el año 1992, se aplicó 10-20 U de la toxina botulínica tipo A en el músculo corrugador de 18 pacientes de raza caucásica que tenían entre 34 y 51 años para mejorar las arrugas del entrecejo. El tratamiento se repitió cada cuatro meses, y las complicaciones que ocurrieron fueron: un paciente tuvo ptosis de la ceja que duró 14 días, dos pacientes tuvieron dolor de cabeza por 1 día, y un paciente tuvo entumecimiento en la zona de la inyección que desapareció poco después. Finalmente se encontró que el tratamiento con la toxina botulínica es simple y efectivo para mejorar las arrugas del entrecejo⁸². Un año después Blitzler y colaboradores recomendaron el uso de la toxina botulínica tipo A, luego de que investigaron la eficacia de la toxina botulínica tipo A para corregir arrugas faciales causadas por distonías hiperfuncionales. El estudio se realizó con 26 pacientes con

edades entre los 32 y 84 años, a los que se inyectaron 1,25 a 10 U de la toxina botulínica en la cara. Los resultados se observaron a las 24 y 72 horas luego de la inyección, mostrando beneficio parcial o total de la toxina, en pacientes con espasmos hemifaciales o con arrugas causadas por músculos hiperfuncionales, cuyos efectos duraron de 3 a 6 meses⁸³.

En 1997 se determinó la dosis óptima de la toxina botulínica inyectando de 1.25 U a 25 U, divididas en alícuotas de 1.25-5 U por sitio de inyección, en 162 pacientes con edades entre los 21 y 78 años, en áreas como las líneas del platisma, arrugas nasolabiales, patas de gallo, arrugas del entrecejo y líneas horizontales de la frente. Los resultados se observaron entre las 24 y 72 horas luego de la inyección, encontrando que la dosis de la toxina aumenta con la edad del paciente, y que el efecto dura entre 3 y 6 meses, reapareciendo la movilidad del área muscular tratada así como de las arrugas⁸⁴. Finalmente fue aprobada por la FDA para tratar arrugas del entrecejo en el 2002. En el 2003, Carruthers y Carruthers usaron la formulación Onabotulinumtoxin A para tratar el área media e inferior del rostro, encontrando mejora en las arrugas periorales de los pacientes y en las líneas del cuello⁸⁵. Posteriormente se publicó una investigación similar en individuos coreanos, donde se inyectaba el músculo masetero, reduciéndolo 31% para adelgazar el rostro⁸⁶.

En el 2010, los miembros de International Board on Botulinum toxin Azzalure (IBBA) se reunieron para desarrollar un consenso sobre el manejo adecuado de Abobotulinumtoxin A en la región media y baja de la cara, así como su uso en el cuello⁸⁷.

4. MARCO REFERENCIAL

4.1. *Clostridium*

Las bacterias del género *Clostridium* son bacilos que ocasionalmente están abultados por esporulación, en su mayoría son Gram positivos y su clasificación taxonómica se describe en la tabla 1. Pueden ser proteolíticas o sacarolíticas, produciendo ácido (butírico y acético), gases (CO₂, H₂ y CH₄), alcohol y acetona. Varias especies fijan nitrógeno libre, son termófilas y/o presentan motilidad por flagelos peritricos. Pueden ser anaerobias estrictas o anaerobias facultativos. En su mayoría son catalasa negativo. Se encuentra comúnmente en el suelo y en el tracto intestinal del hombre y animales⁴¹.

Dominio	Bacteria
División	Firmicutes
Clase	Clostridia
Orden	Clostridiales
Familia	Clostridiaceae
Género	<i>Clostridium</i>

Tabla 1. Taxonomía de *Costridium*. Tomado de ³⁰.

Los estudios del gen *fliC* han demostrado gran divergencia entre las especies de *Clostridium*^{23, 39}, por lo que se aplica el criterio *Clostridium sensu stricto* para la designación de una especie del género *Clostridium*, el cual se basa en la secuencia del gen 16S rRNA del *C. butyricum* denominada “grupo de ARNr I”, de las cuales menos de 80 cumplen con el criterio *Clostridium sensu stricto*⁴⁴. A continuación se mencionan algunas especies representativas:

ESPECIE	DESCRIPCIÓN	ESPORAS	HABITAT
<i>C. butyricum</i>	Bacilos anaerobios estrictos, miden 0.7x5.0-7μ, y crecen entre 30-37°C	Ovoides subterminales	Común en leche agria y quesos

<i>C. novyi</i>	Bacilos anaerobios estrictos, que producen las toxinas α , β , γ , δ , ϵ & z .		
	Tipo A: miden 0.8-0.9x2.5-5.0 μ , crece entre 35-38°C	Grandes y ovoides subterminales	Suelo
	Tipo B: miden 1.2-2.0x10.0-14.0 μ , crecen entre 24-43°C	Ovoides subterminales	Suelo
	Tipo C: mide 1.5-2.0x8.0-10.0 μ , y no produce toxinas	Ovoides que abultan muy poco la célula	Osteomielitis bacilar de búfalo de agua
<i>C. limosum</i>	Bacilos anaerobios estrictos, crecen a 37°C, miden 0.7x3.0 μ . Puede causar metritis en visones de granja	Subterminales,	Barro e intestino animal
<i>C. sporogenes</i>	Bacilos anaerobios, crece entre 37-50°C, mide 0.6-0.8x3.0-7.0 μ .	Ovoides subterminales	Suelo fertilizado
<i>C. argentinense</i>	Bacilos anaerobios estrictos, proteolíticos y forman la toxina botulínica tipo G		
<i>C. kluyveri</i>	Bacilos anaerobios, miden 0.9-1.1x3.0-11.0 μ , crece entre 22-45°C y pH entre 4.8-9.2	Ovoides terminales que miden 1.3x1.8 μ	Barro de agua dulce y en rumen de vaca
<i>C. baratii</i>	Bacilos anaerobios estrictos, mide 0.5-1.9x1.6-10.2 μ , y crece entre 30-35°C	Esféricas u ovaladas terminales	
<i>C. botulinum</i>	Bacilos anaeróbicos estrictos que poseen varios factores de virulencia como tolerancia al frío y neurotoxinas ^{22, 29}		
	Grupo I: proteolíticas y mesófilas (crecen entre 35-40°C ⁵⁾ ^{14, 38} . La arginina es	Esporas de alta resistencia al calor	Suelo, intestino, sedimento marino o conservas contaminadas

	esencial para su crecimiento ¹¹		
	Grupo II: sacarolíticas y psicrotróficas (crecen entre 18-25°C ⁵)	Esporas de resistencia moderada al calor	Intestino humano
	Grupo III: mesófilas pero pueden crecer hasta 40°C		Intestino de aves, ganado y peces
	Grupo IV: no se han asociado con botulismo y son mesófilas (crecen a 37°C) ^{14, 38}		Autopsias y muestras ambientales

Tabla 2. Especies representativas de *Clostridium*. Adaptado de ^{41, 42, 43, 23, 34, 39,}

4.1.1. Botulismo

El botulismo es una enfermedad que afecta animales vertebrados y humanos^{23, 26}. Luego de que las esporas ingresen, la bacteria reinicia el ciclo de vida produciendo grandes cantidades de la toxina botulínica⁴ que ingresan al torrente sanguíneo y luego llegan a la unión neuromuscular²⁰. El primer síntoma es la parálisis de los músculos oculares, luego paraliza los músculos faciales²⁶ y finalmente ocurre la parálisis flácida descendente, paro cardiorrespiratorio o la muerte⁴. La dosis letal reportada para humanos está en el rango de 3000 U, menos de 1ng/kg de peso corporal¹⁶, y la tasa de mortalidad es de aproximadamente del 5 a 10% de los casos de botulismo²². Análisis de toxinas en sangre o heces, también se puede usar medios de cultivo²⁴. A continuación se presentan las diversas clases de botulismo:

TIPO	DESCRIPCIÓN	TRATAMIENTO
Alimentos	Causado por ingesta de alimentos contaminados con esporas y se previene con la cocción botulínica	Administración de la antitoxina y ventilación mecánica asistida
Intestinal	Sucede en niños >1 año y adultos por alteración de la flora intestinal, aumento de pH intestinal, infección postquirúrgica o fármacos contaminados	Administración de la antitoxina y ventilación mecánica asistida

Infantil	Ocorre por ingesta de esporas en bebés <12 meses, cuyo tracto gastrointestinal carece de flora competitiva y tiene pH alto	Administrar la antitoxina (BIG-IV/BabyBIG, 50 mg/kg Peso Corporal) por vía intravenosa
Heridas	Causado por la infección de <i>C. botulinum</i> en heridas contaminadas por el suelo o por astillas de madera.	Aplicar penicilina o vancomicina para eliminar la infección y administrar la antitoxina
Accidental	Ocorre por la aplicación de una dosis alta de toxina botulínica para tratamientos médicos o estéticos	Administrar antitoxina

Tabla 3. Tipos de botulismo. Adaptado de ^{22, 24, 29}.

5. TOXINA BOTULÍNICA

5.1. Serotipos de toxina botulínica

La toxina botulínica (BoNT) se clasifica en ocho serotipos que van desde la A hasta la H, los cuales pueden variar entre 25 y 45% (nucleótido) o 37 a 70% (aminoácido) entre sí^{13, 14}.

5.2. Genes codificantes de la toxina botulínica

El gen *bont* puede encontrarse en el clúster *ha* o el clúster *orfX*, que miden entre 12 y 15 kb, y nunca se transcribe en ambos clúster o grupos de genes mixtos^{13, 36}. El clúster *ha* contiene una unidad transcripcional, transcrita en dirección opuesta que comprende tres genes de hemaglutinina de diferente tamaño *ha70*, *ha17* y *ha33*²⁸, y otra unidad transcripcional que tiene el gen *ntnha* codificante de proteína no hemaglutinina no tóxica, seguido del gen *bont*. En medio de las dos unidades transcripcionales se encuentra gen *botR* codificante para el regulador positivo *factor sigma 70*. El clúster *orfX* contiene una unidad transcripcional que contiene tres marcos de lectura abiertos de función desconocida: *orfX1*, *orfX2* y *orfX3*, y el gen *p47* que no se le conoce una función en particular. También tiene otra unidad de

transcripción para el gen *ntnha* y el gen *bont*. El gen *botR* puede o no estar dentro de este clúster^{2, 11, 13}. A continuación se describen los distintos tipos de genes:

GEN	DESCRIPCIÓN	CLÚSTER	OPERÓN
<i>bont/A</i>	Pertenecen al Grupo I y tienen 8 subtipos. Está relacionado con <i>C. sporogenes</i>		
	A2, A3, A4, A6, A7 y A8	<i>orfX</i>	<i>arsC</i>
	A1 y A5	<i>ha</i>	<i>oppA/brnQ</i>
<i>bont/B</i>	Pertenecen al Grupo I excepto por B4 que pertenece al Grupo II y tiene 8 subtipos	<i>ha</i>	<i>oppA/brnQ</i>
<i>bont/C</i> y <i>bont/D</i>	Pertenece al Grupo III y produce las quimeras <i>bont/CD</i> y <i>/DC</i> . El gen <i>bont</i> se encuentra en bacteriófagos. Produce las toxinas C2 y C3. Está relacionado con <i>C. novyi</i>	<i>ha</i>	
<i>bont/E</i>	Pertenece al Grupo II y tiene 12 subtipos. El gen <i>bont</i> está asociado con una resolvasa que permite que copias del gen sean insertadas en un gen homólogo <i>rarA</i> . Puede ser producida por el Grupo VI de <i>C. butyricum</i>	<i>orfX</i>	<i>rarA</i>
<i>bont/F</i>	Pertenece al Grupo I excepto por F6 que pertenece al Grupo II y tiene 7 subtipos. Puede ser producida por el Grupo V de <i>C. baratii</i>		
	F1	<i>orfX</i>	<i>arsC</i>
	F4	<i>orfX</i>	<i>pulE</i>
	F6	<i>orfX</i>	<i>topB</i>
<i>bont/G</i>	Pertenece al Grupo IV y es producida por <i>C. argentinense</i>	<i>ha</i>	<i>oppA/brnQ</i>
<i>bont/H</i>	Pertenece al Grupo I y fue aislada de la cepa bivalente IBCA10-706 tipo B2h		

Tabla 4. Tipos del gen *bont*. Adaptado de ^{2, 5, 7, 13, 14, 18, 20, 22, 23, 28, 32, 34, 40, 45}.

5.3. Regulación de la producción de toxinas en *C. botulinum*

5.3.1. Estímulos ambientales y nutricionales

La producción de las toxinas botulínicas se ve afectada por la disponibilidad de varias fuentes de carbono y nitrógeno²⁸. En el caso de cepas del grupo II, estas pueden crecer y producir toxinas a temperaturas hasta de 3°C, mientras que las del grupo I no producen toxinas por debajo de los 10°C. En el caso de las cepas tipo A y B, la regulación está más relacionada con señales nutricionales, como la represión de la síntesis en presencia del aminoácido triptófano (Grupo II), así como de la arginina (Grupo I) y citrulina¹¹. Para el caso específico de los tipos B y E, la presencia de CO₂ y caseína en el medio, parecen estimular la expresión de *bont/B* y *bont/E*, aunque la tasa de crecimiento disminuya⁹. En el caso del pH se ha reportado que la expresión de *bont/A* es óptima a pH 7 y decrece a pH mayores o menores^{9, 17}. La presencia de glucosa es una señal nutricional que al mejorar el crecimiento, favorece la producción de altas concentraciones de toxina en cepas del Grupo II^{12, 21}. Dentro de los mecanismos de regulación general del metabolismo asociados a la producción de toxinas está el regulador global CodY que media la transición de la fase exponencial a la estacionaria y controla de forma positiva la producción de BoNT/A al unirse a la región promotora de *botR* y del operón *ntnh-bont*, reprimiendo el regulador negativo CBO_0787/CBO_0786^{12, 28, 29}.

5.3.2. Sistemas de transducción de señales de dos componentes

Se han descrito varios sistemas de transducción de dos componentes con 31 genes codificantes de proteínas^{10, 22}, que pueden regular positivamente (CLC_1093/CLC_1094, CLC_1914/CLC_1913 y CLC_0661/CLC_0663) o negativamente (CBO0786/CBO0787/CBO0789) la producción de toxinas botulínicas.

5.3.3. Percepción de quórum

Este tipo de regulación es mediado por el gen accesorio de regulación *agr* el cual codifica los genes *agrD1* y *agrD2*, que codifican una proteína de procesamiento y exportación de un péptido autoinductor (AIP) y el pre-péptido AIP¹⁰, y cuyas mutaciones resultan en una disminución en la producción de la toxina botulínica y la esporulación¹⁰. La expresión del gen *argD* aumenta a lo largo del crecimiento exponencial, alcanzando el máximo en la fase exponencial tardía y disminuyendo al alcanzar la fase estacionaria^{17, 21, 28}.

5.3.4. Factores sigma (σ) accesorios

BotR es una proteína de 21-22 kDa de unión a ADN, que dirige la ARN polimerasa para transcribir los operones²⁸, y se encuentra ausente en las cepas tipo E¹⁰. Este factor σ se encuentra involucrado en la regulación positiva de la producción de las toxinas botulínicas, las proteínas asociadas no tóxicas y de sí mismo^{17, 22, 28}, y su expresión está ligada a la transición entre la fase exponencial tardía e inicio de la fase estacionaria^{22, 28}. Asimismo las condiciones ácidas o alcalinas inhiben la expresión del gen *botR* y la transcripción de BoNT¹⁷.

5.4. Estructura de la toxina botulínica

Los genes de la toxina botulínica codifican para una cadena simple de polipéptidos inactivos de 150 kDa, que luego son cortados por proteasas y unidas por un enlace de disulfuro en una región altamente conservada, causando la activación farmacológica de la toxina. La toxina madura genera una cadena ligera (L) y una cadena pesada (H). Estas cadenas están unidas por un enlace disulfuro y un cinturón peptídico compuesto del extremo N-terminal de la cadena pesada, que rodea el dominio globular de la cadena ligera cubriendo parcialmente el sitio activo²⁶. La cadena pesada consta de un dominio aminoterminal (HN) de 50 kDa y un dominio carboxiterminal (HC) de 50 kDa^{26, 34}. El subdominio C-terminal (HC-C)

pesa 25 kDa es el punto de unión de la toxina con los polisialoganglósidos y a las proteínas de las vesículas sinápticas^{16, 26}. El subdominio N-terminal (HC-N) pesa 25 kDa e interactúa con los lípidos aniónicos de la membrana presináptica^{16, 26}. El dominio aminoterminal (HN) permite la translocación de la cadena ligera al citosol. La cadena ligera se caracteriza por la hidrólisis específica de diferentes enlaces peptídicos de las proteínas SNARE²⁶. En la figura 1 se observan los diferentes dominios que conforman la toxina botulínica:

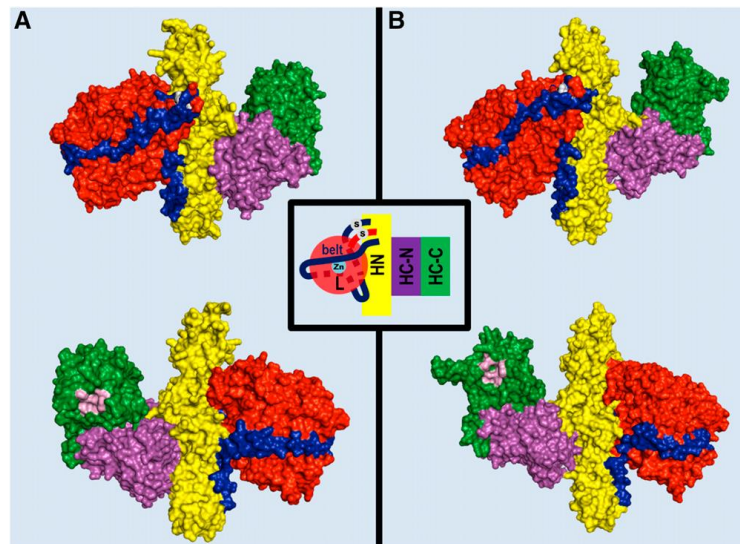


Figura 1. En la parte superior se encuentran las estructuras de las toxinas botulínica tipo A1 (A) y B1 (B), y el enlace disulfuro (blanco). En medio de las dos imágenes se observa un modelo simplificado con los tres dominios diferenciados: subdominio HC-C (verde), subdominio HC-N (púrpura), dominio HN (amarillo) y el dominio L (rojo). En las imágenes de la parte inferior se observan el sitio de unión (rosado) y el cinturón peptídico (azul). Tomado de ²⁶.

La toxina botulínica está acompañada de proteínas asociadas no tóxicas: la proteína hemaglutinina no tóxica (HA) y la proteína no hemaglutinina no tóxica (NTNH), con las cuales forma un complejo proteico². La proteína NTNH protege la toxina botulínica de ataques químicos o proteolíticos^{20, 26}. Las proteínas HA y OrfX forman complejos con los dímeros BoNT-NTNH³⁶ de 288 a 900 kDa^{28, 34}. HA posee varios sitios de unión a carbohidratos permitiendo la unión de la toxina a la mucosa intestinal y E-cadherina^{26, 36}.

5.5. Mecanismo de acción de la toxina botulínica

5.5.1. Unión a la membrana celular

Luego de que la toxina ingresa al organismo, pasa por circulación linfática y sanguínea e ingresa al líquido perineuronal sin atravesar la barrera hematoencefálica²⁶. El sitio de la toxina que se une al receptor, se encuentra en el dominio C-terminal de la cadena pesada (Hc), y concretamente se une a polisialogangliósidos específicos y al dominio luminal glicosilado de proteínas asociadas a vesículas (SV), los cuales se describen en la tabla 5^{15, 26, 33}.

	Receptores	Tipo de toxina botulínica						
		A	B	C	D	E	F	G
Proteínas	Syt-I	+	+				-	+
	Syt-II		+				-	+
	SV2A	+	-		+	+	+	
	SV2B	+	-		+	+	+	
	SV2C	+	-		+	-	+	
Gangliósidos	GD1a		+			+	+	
	GD1b		+	+			-	
	GT1b	+	+		+	+	+	+
	GQ1a							
	GM1a		+				-	
	GM3						+	

Tabla 5. Receptores de los subtipos de neurotoxinas botulínicas. (+): Afinidad de la neurotoxina a proteínas/gangliósidos. (-): Ausencia de la afinidad de la neurotoxina a proteínas/gangliósidos. El espacio en blanco representa la falta de información disponible sobre la afinidad de la neurotoxina. Tomado de ¹⁵.

Además también hay proteínas asociadas a los complejos receptores como los reguladores de la exocitosis dependiente de calcio, sinaptofisina y sinaptogirina, y la proteína transmembranal ATPasa vacuolar, la cual bombea protones del citosol al medio externo de la vesícula disminuyendo el pH en el interior^{14, 15}.

5.5.2. Internalización a la neurona

Cuando ocurre la unión de la toxina por el gangliósido se generan movimientos laterales de la membrana causando que la toxina sea captada por los receptores de proteínas e interactuando con otras moléculas de unión, activando el transporte de la toxina a través de las vesículas, cuya formación está mediada por clatrina, y finalmente ingresando la toxina a la neurona. El aumento de la concentración de Ca^{2+} en el citosol presináptico, activa el anclaje y fusión de las vesículas a la membrana¹⁵. El número promedio de toxinas botulínicas tipo A por vesícula sináptica es de 1 a 2²⁶.

5.5.3. Translocación de la toxina dentro del endosoma

Inicialmente las vesículas poseen un pH neutro o están ligeramente ácidas, lo que evita la translocación de la toxina²⁶. La ATPasa vacuolar acidifica la vesícula^{26, 35}. El pH bajo hace que los grupos carboxilatos altamente conservados de la región que contiene el enlace de disulfuro en la cadena pesada se vuelvan altamente protonados²⁶. La toxina botulínica parcialmente protonada genera una interacción con la membrana de la carga negativa, permitiendo el ingreso de la proteína dentro de la cadena hidrocarbonada de la membrana. Luego la región N-terminal de la cadena pesada se inserta en la bicapa lipídica para translocar la cadena ligera al citosol^{15, 35}. Finalmente se reduce el enlace disulfuro de las cadenas por la tiorredoxina que coopera junto a la chaperona Hsp90 para plegar y liberar la cadena ligera^{26, 35}.

5.5.4. Proteólisis de las proteínas SNARE específicas

La cadena ligera hidroliza y escinde una proteína específica de las proteínas del complejo de receptores de proteínas de fijación soluble de N-etilmaleimida o SNARE^{15, 26, 28, 35}. La escisión de al menos una de las proteínas SNARE, evita liberar el neurotransmisor³⁵. En la tabla 6 se especifican los sitios de escisión de la toxina botulínica:

ISOFORMA SNARE	SITIO DE ESCISIÓN DE LA TOXINA BOTULÍNICA				
	BoNT/E		BoNT/A BoNT/C		
	↓		↓	↓	
SNAP-25 a, b	--QNRQIDR	IMEKADSNKTRIDEANQ	R	ATKMLGSG	
	BoNT/F5/FA	BoNT/F	BoNT/D	BoNT/B	BoNT/G
	≈	≈	≠	↓	↓
VAMP-1	--DKVL	ERDQ	K LSEDDRADALQAGASQ	FESSA	AKLKRKYWW
VAMP-2	--DKVL	ERDQ	K LSEDDRADALQAGASQ	FESSA	AKLKRKYWW
	BoNT/C				
	↓				
Syntaxina 1 A/C; 1B, 2 y 3	--EHAVDYVERAVSDTKK		AVKYQSKARRKKIM		

Tabla 6. Dianas enzimáticas y los sitios de escisión de las toxinas botulínicas. Tomado de ¹⁴.

6. APLICACIONES DE LA TOXINA BOTULÍNICA

La toxina botulínica ha sido usada tanto en múltiples aplicaciones médicas como en el área cosmética. Su principal uso a nivel estético es para corregir arrugas generadas por los movimientos repetitivos de los músculos faciales. Los efectos de su aplicación se observan luego de 3 a 7 días, tiene su efecto máximo a los 14 días tras la liberación de la tensión muscular y la atenuación de la piel que perdura de 3 a 6 meses, incluso el efecto puede perdurar luego de varias sesiones, sin disminuir la seguridad ni tampoco es necesario aumentar las dosis. Posteriormente se reactiva el proceso de reciclaje y regeneración de las uniones neuromusculares,

reapareciendo las arrugas^{3, 4}. Pese a que la toxina tiene efectos en la unión neuromuscular, no afecta a los miocitos, ya que en un estudio clínico se evaluó los efectos de inyectar 5 veces la cantidad recomendada en los pacientes, y no se encontró cambios permanentes en el tejido muscular, ni ocurrió atrofia o fibrosis, ni afectó la cicatrización^{4, 52}.

6.1. Formulaciones de la toxina botulínica

Actualmente hay tres agentes que contienen toxina botulínica tipo A en Estados Unidos: Onabotulinumtoxin A, Abobotulinumtoxin A y Incobotulinumtoxin A. También existe la formulación Rimabotulinumtoxin B que emplea la toxina tipo B, pero se ha encontrado que genera anticuerpos contra la toxina botulínica en los pacientes⁴. Las formulaciones difieren por el peso molecular, procesamiento, método de purificación, cepas productoras de la toxina y tamaño de la proteína. Estas diferencias determinan las características de cada formulación, causando que las dosis de las formulaciones no se pueden intercambiar^{3, 58}. Pero se puede conseguir un efecto similar al conocer la potencia de cada producto:

- 1 U Onabotulinumtoxin A : 2.5 a 5 U Abobotulinumtoxin A
- 1 U Onabotulinumtoxin A : 50 a 100 U Rimabotulinumtoxin B
- 1 U Onabotulinumtoxin A : 1 U Incobotulinumtoxin A

Para mantener estable las formulaciones se deben usar excipientes, por ejemplo en Onabotulinumtoxin A e Incobotulinumtoxin A se emplea la albúmina sérica como estabilizador y crioprotector, además de que previene la agregación de la toxina y mayor recuperación del producto de los envases de vidrio⁴⁰. En la tabla 7 se describen las características de cada formulación:

	Fecha de introducción	pH/Peso total	Serotipo/ Excipientes	Formulación
Onabotulinumtoxin A	1989	7/900 kDa	Toxina botulínica	Secado al vacío

			tipo A/Cloruro de sodio y albúmina	
Abobotulinumtoxin A	1991	7/>500 kDa	Toxina botulínica tipo A/Lactosa y albúmina	Congelado
Rimabotulinumtoxin B	2000	5.6/700 kDa	Toxina botulínica tipo B/Cloruro de sodio, succinato de sodio y albúmina	Solución
Incobotulinumtoxin A	2005	7/150 kDa	Toxina botulínica tipo A/Sacarosa y albúmina	Liofilizado

Tabla 7. Perfil de las principales formulaciones comerciales de las neurotoxinas botulínicas comerciales. Tomado de ^{15, 58}.

6.1.1. Onabotulinumtoxin A

Fue aprobada en el 2002 por la FDA para mejorar temporalmente líneas glabellares de nivel moderado a grave, asociadas con el movimiento de los músculos corrugador o procerus en personas de hasta 65 años. Aunque no está aprobada para la mejora de otras áreas, se ha encontrado referencias bibliográficas que informan sobre su aplicación en estas áreas^{4, 31}. Onabotulinumtoxin A ha mostrado ser efectivo en todas las razas²⁷.

6.1.1.1. Manejo de Onabotulinumtoxin A

Onabotulinumtoxin A se vende en viales de 50 U y 100 U, no contiene conservantes, debe conservarse refrigerado entre 2°C y 8°C una vez abierto y reconstituido el producto y debe usarse en las próximas 24 horas. Para aplicarse, se debe diluir el vial en 2.5 ml de solución salina al 0.9% a un vial de 100 U^{3, 31, 58}. Una vez abierto el envase cualquier contenido restante del producto debe ser desechado, sin embargo, muchos médicos manejan el producto fuera de las indicaciones de la etiqueta, reutilizando más de una vez el mismo vial reconstituido, argumentando que no emplean la misma aguja y jeringa en cada aplicación. Muchos médicos están en desacuerdo con esta práctica porque el producto no contiene ningún componente antimicrobiano, favoreciendo alguna posible contaminación del mismo³¹.

6.1.1.2. Inicio y duración del efecto

Según los estudios analizados el efecto inicia el día 7, y el efecto máximo se observó en el día 30. La máxima durabilidad de Onabotulinumtoxin A en el tratamiento de líneas glabellares y del canto lateral es de 3 a 6 meses en todas las razas^{27, 31}. La duración superior a 4 meses es más común en pacientes que reciben tratamientos en el transcurso de al menos un año pero puede generar dependencia de la dosis³¹.

6.1.1.3. Onabotulinumtoxin A y otros procedimientos estéticos

Durante casi una década se ha aplicado rellenos dérmicos o agentes voluminizadores para el rejuvenecimiento facial junto con neuromoduladores. Sin embargo, no hay indicaciones sobre el orden en que se deben aplicar o el tiempo que debe transcurrir para las inyecciones de cada componente, aun así es recomendable esperar el efecto del neuromodulador antes de aplicar algún tipo de relleno, ya que en muchos casos el solo efecto de la toxina es suficientemente satisfactorio. Se ha observado durante la práctica clínica que la terapia de

combinación de componentes es muy superior a los resultados que se obtienen con uno solo, como por ejemplo, se realizó un estudio en donde se evaluaba la terapia conjunta de Onabotulinumtoxin A con 24 mg/ml de gel de ácido hialurónico, y se concluyó que la combinación de ácido hialurónico con onabotulinumtoxinA presentaba una mayor mejoría en los sujetos tratados, que aplicar únicamente OnabotulinumtoxinA o ácido hialurónico³¹.

6.1.2. Abobotulinumtoxin A

En el año 2009 se aprobó para uso en pacientes con distonía cervical en adultos y líneas glabellares causadas por la actividad del músculo prócer y del corrugador en pacientes de 65 años o menos. Fuera de indicación se usa en arrugas nasales, líneas horizontales de la frente, patas de gallo y líneas del platisma⁴⁷. Tanto Onabotulinumtoxin A como Abobotulinumtoxin A tienen los mismos efectos clínicos después de aplicar la dosis adecuada, lo cual es importante en procedimientos en donde se usan las formulaciones sin importar las diferencias entre éstas. La potencia de Onabotulinumtoxin A es mayor que Abobotulinumtoxin A, por esto se debe realizar un factor de conversión del producto si se desea obtener los mismos resultados que con Onabotulinumtoxin A⁴. El inicio del efecto ocurre en un promedio de 12 a 72 horas luego de la aplicación, y dura entre 84-109 días⁴⁷.

6.1.3. Incobotulinumtoxin A

Fue aprobado por la FDA en el 2010 para tratar blefaroespasma y distonía cervical, y en 2011 para tratamiento de líneas glabellares moderadas a severas en adultos⁷¹. Este producto fue creado como una alternativa más segura a otras formulaciones, ya que posee menos contenido del complejo proteico (0,44 ng ⁷¹) y por lo tanto, es menos probable causar una respuesta inmunitaria del paciente, aunque un estudio comparó el Onabotulinumtoxin A junto con Incobotulinumtoxin A, y no se encontró diferencia en seguridad o en evitar generar anticuerpos^{4, 49, 62}. El producto se comercializa en viales de 50 U, los cuales se reconstituyen en 0.25 ml de solución

salina sin conservantes. No requiere refrigeración antes de la reconstitución del producto y debe administrarse dentro de las siguientes 24 horas luego de agregar la solución salina, almacenándolo en un refrigerador de 2-8°C. El efecto dura 120 días^{69, 71}. Actualmente hay un debate sobre la conversión de unidades de Onabotulinumtoxin A y Incobotulinumtoxin A, en donde varias investigaciones divergen sobre la potencia de Incobotulinumtoxin A⁷⁵.

6.1.3.1. Difusión del producto

Se cree que la difusión de Incobotulinumtoxin A es mayor debido a que la molécula activa tiene menor peso molecular que en otros productos (150 kDa ⁶²) y que puede llegar a causar mayores efectos adversos; Sin embargo, muchos experimentos refutan esta hipótesis, al demostrar que no hay diferencia en la difusión de OnabotulinumtoxinA, AbobotulinumtoxinA e IncobotulinumtoxinA, incluso a dosis altas⁷¹.

6.2. Fabricación del producto

La fabricación de producto inicia con la fermentación del medio por *C. botulinum* en atmósfera anaerobia en grandes lotes para que sintetice la toxina botulínica, luego se lisan las células para que liberen la toxina en el caldo bacteriano. La toxina puede permanecer de 150 kDa o ser cortada para obtener la estructura activada. Después está mezcla se separa y se purifica para aislar el complejo de la toxina, aunque en el caso de Incobotulinumtoxin A la toxina se somete a una purificación adicional para eliminar las PTC. El proceso de purificación es patentado y por lo tanto varía entre cada fabricante. El método de purificación de Schantz es usado para obtener Onabotulinumtoxin A, en el cual se repiten varios ciclos de precipitación y redisolución^{46, 67, 71}, mientras que el proceso de purificación de Abobotulinumtoxin A e Incobotulinumtoxin A se realiza por medio de una columna de cromatográfica^{67, 88}. Finalmente se le agregan los excipientes dependiendo de la formulación. Aunque

se produzca la misma toxina puede haber pequeñas diferencias en el producto final, ya que el proceso de fabricación se conoce como biosimilar^{71, 79}.

6.3. Contraindicaciones generales previas al tratamiento

No se debe administrar la toxina botulínica durante el embarazo o período de lactancia, tampoco debe administrarse cuando los pacientes sufren de glaucoma, trastornos neuromusculares relacionados con la transmisión de neurotransmisores en uniones neuromusculares como miastenia Gravis y síndrome miasténico de Lambert-Eaton, o enfermedades neurodegenerativas como esclerosis lateral amiotrófica. Si se está consumiendo antibióticos aminoglucósidos debe evitarse la administración, ya que potencia el efecto de la toxina botulínica. En condiciones de laboratorio se encontró que también hay interferencia con la administración de ciclosporina, penicilamina, quinina, anticolinesterásicos o antagonistas del calcio³.
⁴. Cuando el paciente toma medicamentos anticoagulantes como AINE, aceite de pescado o aspirina, si no hay contraindicaciones médicas, debe suspenderlo una semana antes del procedimiento para disminuir el dolor y el riesgo de hinchazón y/o hematomas. Antes de realizar la punción se debe limpiar con alcohol la zona para esterilizar, dejándolo secar para evitar que el alcohol inactive la toxina. Posteriormente se puede aplicar una bolsa con hielo o crema de tetracaína para desinflamar la zona⁶¹. El paciente no debe hacer ejercicio vigoroso durante las 24 horas siguientes para evitar que se elimine la neurotoxina del organismo³.

6.4. Consideraciones inmunológicas

La toxina botulínica puede ser menos efectiva cuando se genera una respuesta inmune por los pacientes. La razón por la que ocurre esta respuesta, es por el complejo proteico acompañante de la toxina, que al no ser parte del cuerpo humano, genera anticuerpos neutralizantes. La inducción de anticuerpos es una desventaja en el tratamiento de pacientes que requieren inyecciones frecuentes o altas dosis. Según las indicaciones, para evitar la formación de anticuerpos se deben inyectar

dosis pequeñas y aplicarlas distanciando cada uno de los sitios de inyección, así como aplicarlas cada 3 meses para reforzar las dosis³.

6.5. Jeringas y agujas

Las agujas empleadas durante el procedimiento son seleccionadas con base en las preferencias del profesional. Se puede emplear una aguja de calibre 32 en lugar de una de calibre 30 para reducir el dolor durante la inyección. Asimismo también pueden seleccionar la jeringa de acuerdo a las necesidades, como el volumen o la administración completa de la formulación⁶⁸. En la figura 2 se observa los distintos tipos de jeringas y agujas empleados:

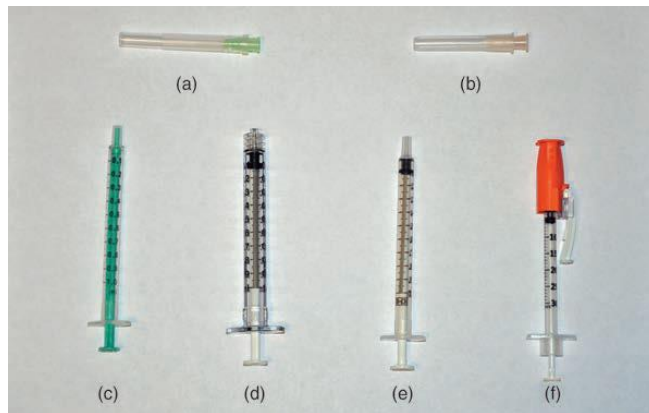


Figura 2. Jeringas y agujas. **(A)** Aguja calibre 32. **(B)** Aguja calibre 30. **(C)** Jeringa que evita desperdiciar el producto. **(D)** Jeringa que evita el desenganche de la aguja o fuga de medicamentos. **(E)** Jeringa de tuberculina. **(F)** Jeringa de insulina. Tomado de ⁶⁸.

6.6. Uso cosmético de la toxina botulínica

6.8.1. Toxina botulínica para arrugas periorales

Las arrugas de los labios son líneas periorales, paralelas o perpendiculares al borde bermellón. La causa principal son las contracciones musculares, ya sean voluntarias o involuntarias⁶¹. La toxina botulínica es efectiva para tratar las arrugas, aunque es recomendable combinar el tratamiento con rellenos^{4, 61}.

6.8.1.1. Aplicación de la toxina botulínica en el músculo orbicular de la boca

El músculo orbicular de la boca permite cerrar la boca, unir los labios con el arco alveolar y sobresalir los labios para besar o silbar. El movimiento de este músculo de forma prolongada conlleva a la formación de arrugas en forma de código de barras^{3, 4}. Para aplicarlo se usa en total de 4 a 6 U en 4 puntos distintos, aplicando de 1 a 2 U en cada parte, y se inyecta con la aguja apuntando de forma paralela a la superficie de la piel, de forma superficial en la dermis reticular, que no sobrepase la región dermosubcutánea. Las zonas en que se realiza el procedimiento son: en la parte lateral del labio, 3 a 5 mm arriba del borde del bermellón del labio superior o abajo del labio inferior; y a 1 cm del borde de la boca, en el límite entre *pars periferalis* y *pars marginalis* del músculo orbicular de la boca, sin tocar la columna de filtrado de la boca^{4, 61, 68}. En la figura 3 se observan los puntos de inyección para corregir arrugas en el músculo orbicular de la boca:



Figura 3. Sitios de inyección en el músculo orbicular de la boca para corregir arrugas periorales. Tomado de ⁶¹.

6.8.1.2. Aplicación de la toxina botulínica en el músculo depresor del ángulo de la boca

El músculo depresor del ángulo de la boca tira de las comisuras de la boca hacia abajo, generando arrugas de marioneta⁴. Se debe aplicar de 2-8 U en una sola inyección por lado de la cara⁶⁸. Se realiza en el tercio inferior de este músculo, específicamente 1.5 cm por debajo de la comisura oral y 1 cm lateral a la proyección

del músculo como se observa en la figura 4. Se debe inyectar con la aguja de forma lateral a la superficie de la piel y es recomendable estirar la piel y sostener el músculo durante el procedimiento⁴.

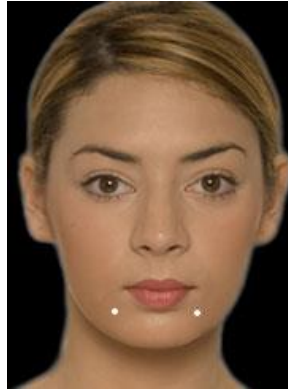


Figura 4. Sitios de inyección en el músculo depresor de la boca para corregir arrugas periorales. Tomado de ⁶⁸.

6.8.1.3. Aplicación de la toxina botulínica en el músculo mentoniano

El músculo mentoniano está encargado de levantar el mentón y elevar el labio inferior para beber. La contracción prolongada produce pliegues entre la parte prominente de la mandíbula y el labio inferior, además con la pérdida de grasa subcutánea y colágeno se forman hoyuelos en la barbilla. Se debe inyectar 5 U por sitio, en dos puntos distintos pero simétricos sobre la protuberancia de la barbilla, ubicada a 5 mm de la línea media de la barbilla y 1 cm encima del borde inferior de la mandíbula. Los puntos de inyección se observan en la figura 5. Es recomendable inyectarlo intramuscularmente o por vía subcutánea ^{4, 61, 68}.



Figura 5. Sitios de inyección en el músculo mentoniano para corregir los hoyuelos del mentón. Tomado de ⁶¹.

6.8.1.4. Aplicación de la toxina botulínica en las bandas del platismo

Las bandas del músculo platismo trabajan conjuntamente con otros para facilitar la expresión facial al halar las esquinas el labio inferior. Las fibras musculares se unen con el sistema músculo aponeurótico superficial, por lo que los tirones hacia debajo del cuello pueden causar bandas verticales, y la piel laxa del cuello causa líneas horizontales. Para realizar el procedimiento el paciente debe estirar el cuello y las bandas más grandes se deben inyectar superficialmente con un total de 14 a 20 U en 2 a 10 puntos separados por varios centímetros, como se observa en la figura 6^{3, 67, 68}.



Figura 6. Sitios de inyección en el músculo platismo para corregir las bandas. Tomado de ⁶⁷.

6.8.1.5. Aplicación de la toxina botulínica en el músculo cigomático mayor y menor

El músculo cigomático mayor permite reír y masticar, y el músculo cigomático menor trabaja junto con el cigomático mayor para permitir el pliegue nasolabial. El movimiento muscular genera patas de gallo. Para corregirlas se debe inyectar 2.5 U justo en medio de la comisura bucal y el pómulos, 2.5 U por debajo del punto medio entre la comisura bucal y el pómulos, y 1.95 U en el músculo elevador del labio superior y del ala de la nariz^{3, 88}, como en la figura 7.

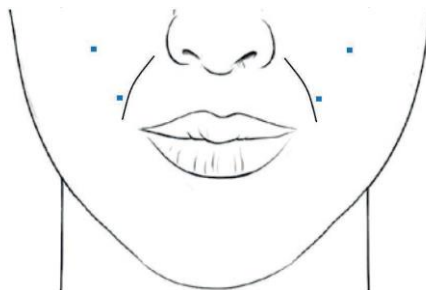


Figura 7. Sitios de inyección en los músculos cigomáticos y del músculo elevador del labio superior y del ala de la nariz. Tomado de ⁸⁸.

6.8.2. Toxina botulínica para arrugas periorcarias

Las mejores áreas de aplicación para reducir efectos miméticos son las líneas periorbitales, las líneas frontales y glabellares. Para corregir arrugas y pliegues muy profundos es menos efectivo⁴. La toxina botulínica funciona mejor con las arrugas formadas por un solo músculo o que en mayor parte trabajan solos para funcionar, como el músculo prócer, frontal, entre otros³.

6.8.2.1. Aplicación de la toxina botulínica en el músculo corrugador superciliar

El músculo corrugador superciliar hala de la parte media de la ceja y la piel hacia la parte inferior, formando las arrugas verticales del entrecejo. También colabora con el músculo depresor superciliar, que deprime las cejas y el músculo prócer, que hala de la piel que hay en medio de las cejas hacia abajo³. El movimiento constante causa arrugas llamadas líneas glabellares. Antes de inyectar se debe pedir al paciente que frunza el ceño, para palpar la porción más sobresaliente del músculo corrugador y prócer. Posteriormente se aplica un total de 20 a 40 U en 2 puntos de inyección para cada músculo corrugador (izquierdo y derecho), y un solo punto de inyección para el músculo prócer, los cuales deben separarse por 1 cm^{68, 69, 73, 74}, como en la figura 8. Cabe decir que la dosis varía ligeramente según el tono muscular del paciente^{63, 70}.

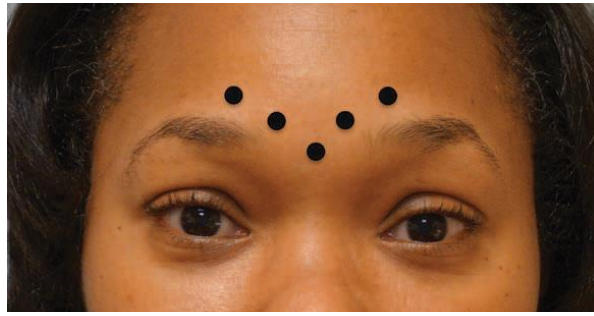


Figura 8. Sitios de inyección para los músculos prócer y corrugador. Tomado de ⁷⁵.

6.8.2.2. Aplicación de la toxina botulínica en el músculo frontal

El músculo frontal eleva las cejas y mueve el cuero cabelludo hacia la parte anterior. Las fibras del músculo frontal están en dirección vertical, por lo que las arrugas en la frente son líneas horizontales³. Se deben inyectar de forma subcutánea o intramuscular un total de 25 a 30 U en 4 a 8 puntos de inyección⁶⁸, distanciados por 1,5 a 2 cm en patrón de U o V^{3, 65, 72}. En algunos casos pueden requerir retoques cuando las arrugas de la frente son hiperdinámicas. En la figura 9 se observan los puntos de inyección en el músculo frontal con toxina botulínica:



Figura 9. Puntos de inyección en el músculo frontal. Tomado de ⁸⁸.

6.8.2.3. Aplicación de la toxina botulínica en el músculo orbicular de los ojos

Este músculo permite cerrar los ojos, así como también se activa con la sonrisa, por lo que su contracción prolongada hipertrofia las fibras musculares y causa arrugas cantales laterales o coloquialmente “patas de gallo”^{3, 4}. Se aplican de 8 a 20 U distribuidas en 3 a 4 puntos distanciados por 1 cm⁶⁹, 1 a 2 cm por debajo del punto medio del músculo orbicular de los ojos, alejándose del borde de la cavidad orbitaria;

1 cm por encima del cigomático; y 0,5 cm debajo de la parte lateral de la ceja, como se observa en la figura 10^{60, 68}.

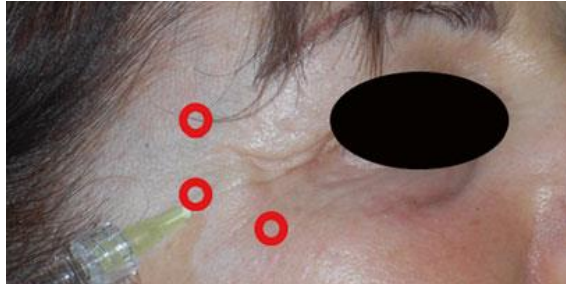


Figura 10. Los tres puntos de inyección elegidos deben tener igual distancia siguiendo el borde exterior de la órbita. La distancia de la inyección al borde orbital lateral debe ser de 1 cm. Tomado de ⁴.

6.8.2.4. Modificación farmacológica de las cejas

Las cejas pueden caerse por la pérdida de elasticidad en la frente, por lo que la toxina botulínica se aplica para relajar los músculos depresores de la ceja: el músculo corrugador superciliar, la porción superolateral del músculo orbicular de los ojos y el músculo prócer. Cuando se disminuye la función en la región superolateral del músculo orbicular, se observa un levantamiento de 1 a 3 mm de la ceja^{3, 66}.

6.8.2.5. Aplicación de la toxina botulínica en el músculo nasal

Este músculo dilata la nariz para aumentar el volumen del aire hacia el interior. Su movimiento constante forma arrugas en la parte del dorso superior nasal llamadas líneas del conejo. Para corregirlo se inyecta 2 a 4 U en cada lado, 1 cm arriba de las arrugas⁸⁸, como se observa en la figura 11:



Figura 11. Puntos de inyección para corregir las arrugas de conejo. Tomado de ⁸⁸.

6.8.3. Complicaciones de la aplicación de la toxina botulínica a nivel cosmético

Los efectos adversos son similares en todas las formulaciones, en su mayoría son debilidad muscular, dolor de cabeza, y reacciones locales en la zona de punción (eritema, prurito, hematoma o erupciones), pero también se han reportado raros casos relacionados con botulismo relacionados con la dosis administrada. La correcta gestión médica durante el procedimiento debe disminuir el riesgo del procedimiento⁴.

6.8.3.1. Complicaciones de inyectar los músculos de la zona periocular

6.8.3.1.1. Ptosis del párpado, diplopía y estrabismo

Los músculos del movimiento ocular son cercanos a los músculos que son inyectados para corregir las líneas glabellares y las líneas del canto lateral. El efecto adverso más reportado en esta zona es la ptosis del párpado^{3, 4}, causado por inyectar la toxina muy diluida en el músculo prócer, difundiéndola por el septo orbitario hasta el músculo elevador del párpado superior causando la caída de 1 a 2 mm del párpado. La mayor parte de los casos suelen solucionarse en 2 a 4 semanas, pero si los síntomas incluyen deficiencia visual grave debe realizarse una evaluación por parte del especialista oftalmológico⁴. El tratamiento consiste en agentes midriáticos que estimulen el músculo de Muller, como Neo-sinefrina 2.5% o Iopidina 0.5% para corregir parcialmente la ptosis hasta la resolución del efecto en 2 a 4 semanas⁶⁶. Para disminuir el riesgo de la aparición de ptosis, se puede usar más concentrada la solución de las toxinas botulínicas y realizar un masaje suave permitirá la rápida absorción del producto⁴.

La diplopía es la percepción de una imagen duplicada luego de la aplicación de la toxina botulínica. Principalmente ocurre cuando se desea corregir las líneas del canto lateral, y el personal encargado punciona el músculo recto lateral del ojo, así

como realizar punciones excesivas en el músculo prócer o nasal paraliza el músculo recto medio del ojo. Generalmente este efecto se corrige cuando se regeneran las uniones neuromusculares, pero si el caso es grave debe realizarse la revisión de un médico oftalmólogo⁴.

El estrabismo ocurre por la parálisis de los músculos extraoculares. El paciente debe ser valorado por médico oftalmólogo inmediatamente, ya que si no se corrige puede presentarse disfunción visual permanente o a largo plazo. Para corregir la visión el médico puede indicar el uso de parches oculares, para cubrir el ojo afectado o recetar lentes con prismas durante 3 a 6 meses⁴.

6.8.3.1.2. Xeroftalmia iatrogénica o síndrome de ojo seco

La glándula lagrimal está próxima a los puntos de inyección para corregir las líneas del canto lateral, por lo que puede llegar a comprometerse la producción de lágrimas. La gravedad de la xeroftalmia es directamente proporcional a la dosis aplicada y la edad del paciente. Los pacientes presentan irritación ocular en las semanas posteriores al tratamiento y presentan mejoría apenas termina el efecto de la toxina botulínica, sin embargo puede ocurrir queratitis crónica o úlceras corneales. Esto se puede evitar inyectando poca cantidad de la toxina en el canto lateral o evitando inyectar dentro de la cresta orbital⁴.

6.8.3.1.3. Ptosis de la ceja

La ptosis de la ceja ocurre inmediatamente después de la inyección del músculo frontal con una solución diluida de la toxina o realizando masajes agresivos luego de la punción. Para evitar este efecto, se debe usar la solución de la toxina más concentrada y palpar el músculo antes de realizar el procedimiento⁴.

La pseudoptosis ocurre por la caída del exceso de piel frontal fotodañada o en pacientes de edad avanzada. El médico debe advertir al paciente sobre el grado de elasticidad de la piel para evitar una apariencia desfavorable en el paciente.

También aparecer edema tisular, el cual desaparece de 24 a 48 horas luego de la inyección⁴.

Otro efecto adverso ocurre cuando se inyecta con más cantidad el músculo prócer que el músculo frontal, causando una elevación exagerada del entrecejo en comparación con la parte media de la ceja, alterando las expresiones faciales normales⁴.

6.8.3.2. Complicaciones de inyectar los músculos periorales

6.8.3.2.1. Ptosis en los labios

La ptosis del labio superior ocurre luego de la inyectar la zona bajo el músculo orbicular de la boca, o alrededor de los músculos cigomáticos menor y mayor. La ptosis del labio inferior ocurre cuando se inyecta inadecuadamente un músculo depresor o se difunde la toxina botulínica por la administración de gran cantidad. Los pacientes experimentan dificultad al comer y hablar, además de goteos de saliva⁴. Para corregir este defecto se puede aplicar 1-2 U de toxina botulínica en el músculo contralateral al afectado⁶¹.

6.8.3.2.2. Deterioro en los músculos del cuello

Los efectos adversos que se presentan son debilidad en el área anterior del cuello, disfagia, voz ronca y deterioro de la función muscular, cuyas causas pueden ser puncionar los músculos más profundos del cuello o infiltración de la toxina botulínica hacia otras áreas. Esto se puede evitar inyectando una solución más concentrada e inyectando los músculos más superficiales con la aguja de forma perpendicular a la superficie de la piel⁴.

6.8.3.3. Complicaciones raras

La inyección de la rama frontal y parietal de la arteria temporal superficial genera pseudoaneurismas, los cuales son masas dolorosas y pulsátiles que crecen sobre el sitio de inyección. Ocasionalmente se encuentra un soplo auscultado en la masa. El tratamiento se realiza por intervención quirúrgica de un cirujano vascular⁴.

6.9. Otros usos de la toxina botulínica

La toxina botulínica es muy efectiva para tratar síndromes de terminales nerviosas colinérgicas hiperactivas²⁶. A continuación se describen algunos de estos síndromes:

SÍNDROME	DESCRIPCIÓN	TRATAMIENTO BoNT	COMPLICACIONES
Rinitis alérgica	Es una enfermedad de la mucosa nasal mediada por IgE tras la exposición a alérgenos ³⁷	Inyección del tabique o cornete nasal. Infusión en las fosas nasales ³⁷	La dosis excesiva puede causar la parálisis de los músculos orofaríngeos ³⁷
Distonía del pie	Contracción muscular involuntaria y repetitiva de pie ⁴⁸	Inyección en los músculos afectados del pie ⁴⁸	
Estrabismo	Desviación de los ojos causado por problemas en los músculos extraoculares ⁴⁶	Inyectar de 5 a 10 U en los músculos extraoculares en pacientes mayores de 12 años ^{46, 59}	
Espasmo palpebral	Cierre repetido e involuntario de los párpados por espasmos en el músculo orbicular ⁵⁷	Inyectar entre 12-14 U en el músculo orbicular ⁵⁶	Ptoxis, lagofthalmos, ojo seco, hematomas, fotofobia, ectropión y diplopía ^{49, 52, 56}
Distonía cervical	Contracciones involuntarias de los	Inyectar los músculos afectados del cuello y hombros ^{46, 55}	

	músculos del cuello y hombros ⁴⁶		
Vejiga hiperactiva	Frecuente urgencia urinaria por la hiperactividad del músculo detrusor ^{25, 58}	Aplicar 100-500 U de Onabotulinumtoxin A por inyección intravesical ^{25, 58}	Retención urinaria aguda, residuos >200 ml, hematuria e infección urinaria ^{25, 58}
Acalasia	Contracción del esfínter esofágico inferior causando disfagia ⁵⁴	Relajar los músculos del esfínter esofágico inferior con toxina botulínica tipo A ⁵⁴	
Hiperhidrosis primaria	Exceso de sudor por la hiperactividad en la secreción de la glándula ecrina ⁶⁸	Inyectar 50 a 100 U de Onabotulinumtoxin A por axila, en distintos sitios distanciados por 1 a 2 cm ⁶⁸	Tromboflebitis superficial en las venas torácicas y debilidad en las manos ⁴
Sialorrea	Incapacidad de retener la saliva por una exacerbación del reflejo esófago-salivar ⁵³	Inyectar 2 U/Kg de toxina botulínica tipo A en las glándulas submaxilares y parótidas ⁵³	
Disfonía espasmódica	Descoordinación en las cuerdas vocales causando espasmos en la laringe ⁵⁰	Inyección bilateral en los músculos espásticos con dosis menores a 2.5 U ⁵⁰	Disfagia y resistencia en pacientes mayores a 65 años ⁵⁰
Distonía oromandibular	Es la contracción involuntaria de los músculos masticatorios ⁵¹	Inyectar con 15 a 25 U los músculos masticatorios ⁵¹	
Cistitis intersticial	Pacientes con dolor vesical y frecuencia urinaria, sin causa patológica ²⁵	Inyectar 100 U de la toxina botulínica de manera intravesical ²⁵	Disuria, hematuria y esfuerzo para orinar ²⁵

Tabla 8. Aplicaciones clínicas de la toxina botulínica. Adaptado de ^{25, 46, 51}.

7. DISEÑO METODOLÓGICO

7.1. Tipo de investigación

Es una investigación de tipo mixto que incluye el enfoque cuantitativo y cualitativo, este último específicamente de categoría descriptiva. Ambos enfoques permiten tener una perspectiva más amplia con respecto al tema, ya que por medio de la revisión literaria de artículos de diversas bases de datos se pretende hacer énfasis en las generalidades del uso de la toxina botulínica tipo A en el campo estético, así como realizar un análisis estadístico con las diversas fuentes bibliográficas.

7.1.1. Universo

Referencias bibliográficas relacionadas con el género *Clostridium*.

7.1.2. Población

Referencias bibliográficas relacionadas con *Clostridium botulinum* y sus aplicaciones.

7.1.3. Muestra

Diferentes fuentes bibliográficas relacionadas con aplicación de la toxina botulínica tipo A de *Clostridium botulinum* en el campo estético.

7.2. Criterios de selección de la bibliografía revisada

7.2.1. Criterios de inclusión

La literatura revisada fue aceptada por que cumple con la información necesaria para ser clasificados bibliográficamente en una base de datos. Asimismo deben tener información relacionada con el uso de la toxina botulínica tipo A en el campo estético que haya sido publicada en inglés entre los años 2012-2018.

7.2.2. Criterios de exclusión

No se incluyeron las fuentes bibliográficas que no trataran temas relacionados con la aplicación de la toxina tipo A en el campo estético, así como aquella bibliografía publicada en años anteriores al 2012 o que fuera publicada en un idioma distinto al inglés.

7.3. Procedimientos

7.3.1. Búsqueda de la información

Para realizar la recolección de la información se consultaron documentos técnicos en las bases de datos Pubmed, Science Direct, Scielo, Springerlink, Redalyc.org y NCBI, teniendo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión. La búsqueda se hizo por medio de los siguientes descriptores en las bases de datos que se mencionaron anteriormente: *C. Botulinum*, Botulinum toxin type A, Botox in rhytids, Safety of botulinum toxin, entre otros términos relacionados con el uso de la toxina botulínica tipo A en el campo estético.

7.3.2. Selección de documentos

Los documentos fueron descargados en formato pdf o fueron consultados en línea, y se procedió a realizar la lectura de las diferentes fuentes bibliográficas que contenían las generalidades de *Clostridium botulinum*, tipos de toxina botulínica, genes codificantes para toxinas botulínicas, mecanismo de acción, aplicaciones clínicas y estéticas, y efectos adversos, entre otros.

7.3.3. Revisión bibliográfica

Se registró una síntesis de las fuentes bibliográficas analizadas en el presente documento, y se clasificaron en una base de datos teniendo en cuenta las siguientes

categorías: tipo de documento, base de datos, país, año de publicación, tema y autor, y se procedió a realizar un análisis estadístico.

7.3.4. Análisis de la información

Con la base de datos elaborada se realizó un análisis con estadística básica descriptiva por Excel.

8. RESULTADOS

A continuación se presentan los datos estadísticos con base en los resultados de la revisión bibliográfica realizada para desarrollar el presente documento.

8.1. Tipo de documento

Se consultó un total de 88 referencias bibliográficas, que en su mayoría corresponden a artículos científicos (82%). El tipo de documento con menor acceso de consultas corresponde a páginas web (3%), como se observa en la figura 12.

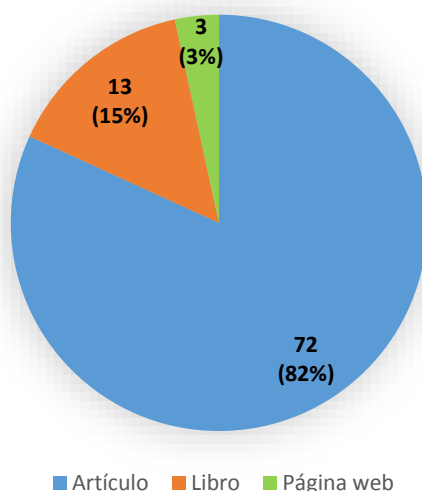


Figura 12. Porcentaje de documentos según el tipo de documento consultado.

8.2. Año de publicación

Los resultados mostraron que la mayoría de los documentos consultados fueron publicados en el año 2017 (18,2%). Los documentos publicados en los años 1992, 1993, 1997, 2003, 2005 o 2010 corresponden a las fuentes bibliográficas consultadas con menor acceso (1,1%), como se observa en la distribución de los datos de la figura 13.

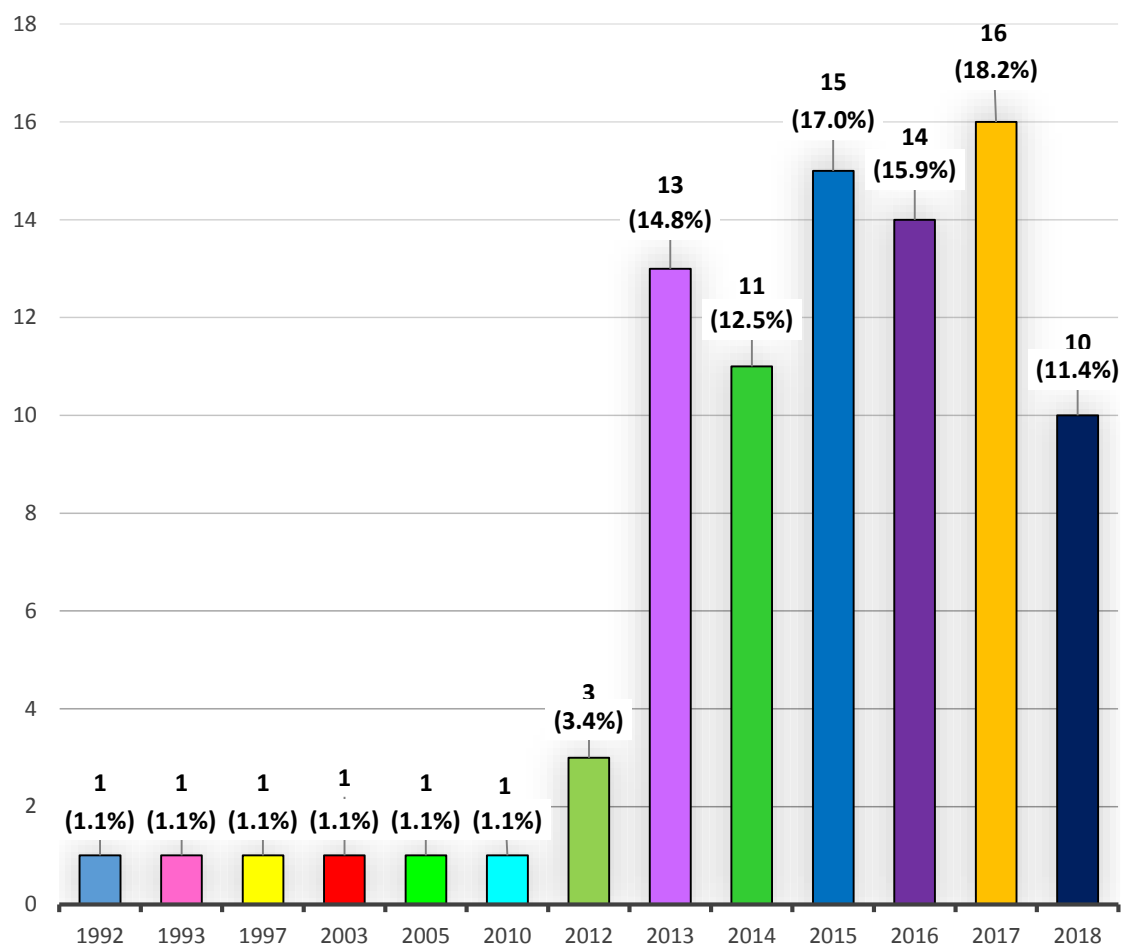


Figura 13. Porcentaje de documentos según el año de publicación de las referencias bibliográficas consultadas.

8.3. Idioma de publicación

Todas las publicaciones se encontraron en el idioma inglés (100%), ya que la investigación se limitó a fuentes bibliográficas que se encontraran en inglés, porque la mayor parte de la información científica actualizada se encuentra en este idioma. Los datos estadísticos se observan en la figura 14.

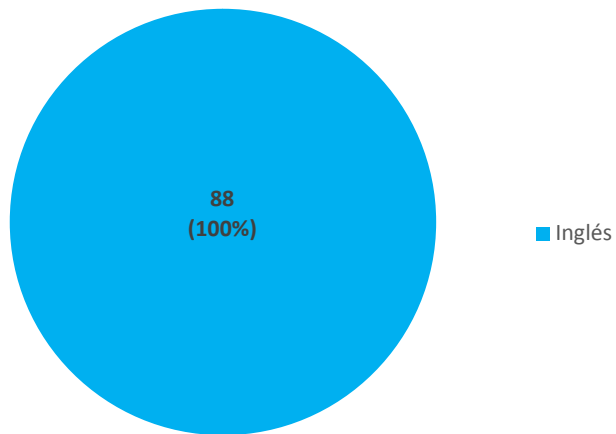


Figura 14. Porcentaje de publicaciones según el idioma de la fuente bibliográfica.

8.4. País de publicación

EE.UU. es el país con mayor cantidad de fuentes revisadas para realizar este trabajo (38,6%). Los países con menor cantidad de accesos son México, Portugal, Corea, España, Suecia, Tailandia, Rusia y Suiza (1,1%). Los datos se pueden observar en la figura 15.

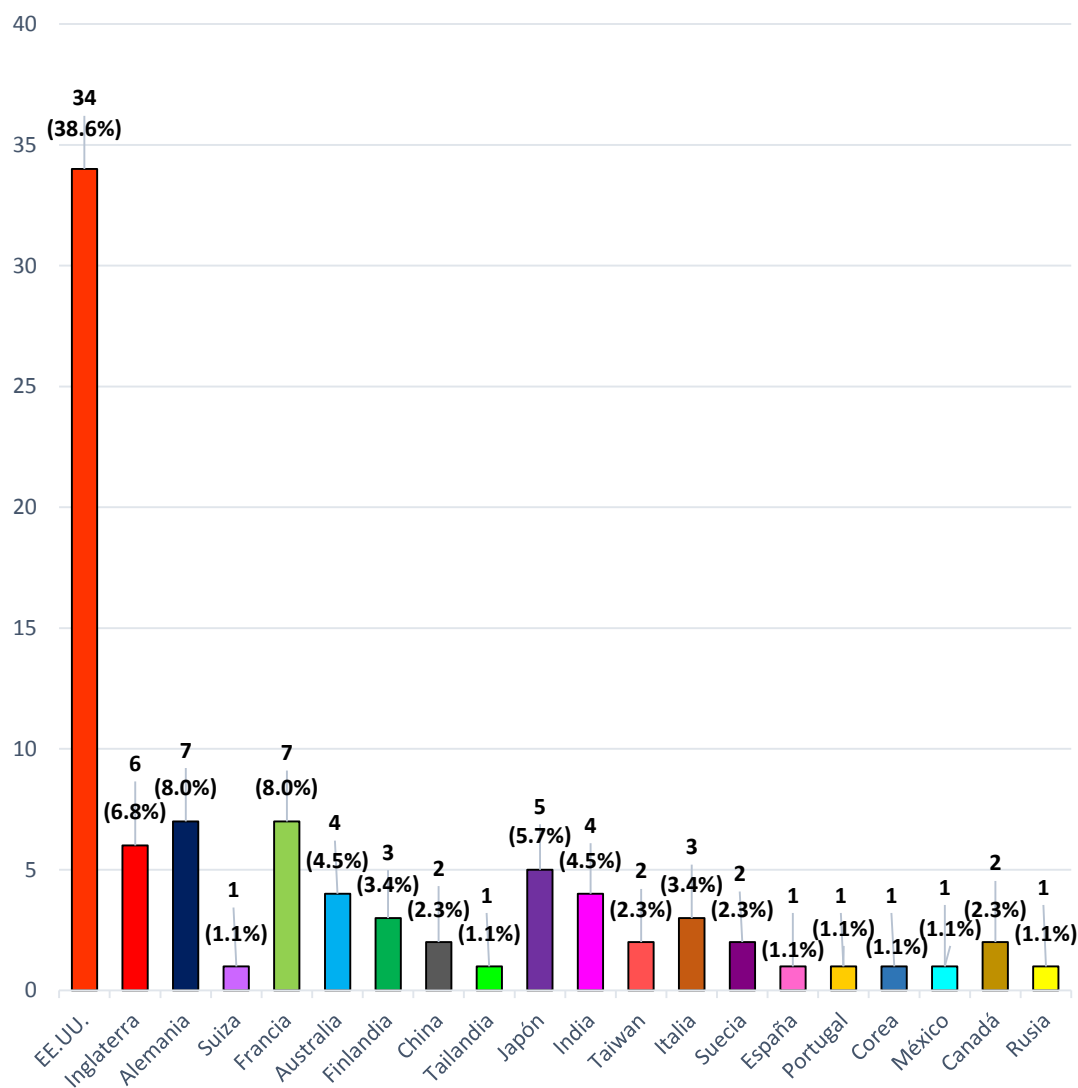


Figura 15. Porcentaje de documentos según el país de publicación de las referencias consultadas.

8.5. Base de datos

El análisis estadístico mostró una gran cantidad de documentos provenientes de Pubmed (40,9%). Las bases de datos de las que provienen menor cantidad de documentos consultados son ASMScience, NCBI, Cambridge Core, ISAPS y ASPs (1,1%). Los datos se encuentran en la figura 16.

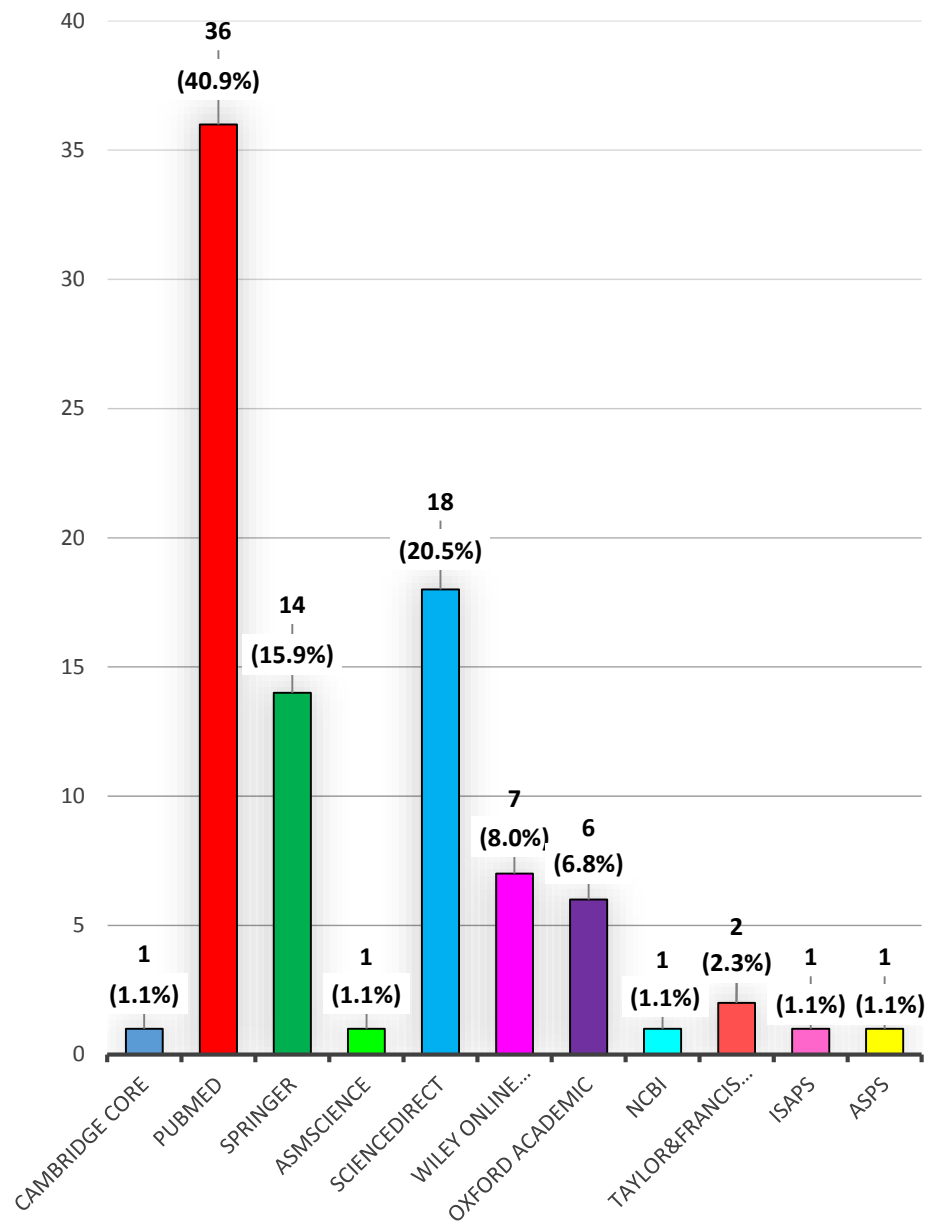


Figura 16. Porcentaje de documentos según la base de datos consultada.

8.6. Tema de investigación

Los datos estadísticos presentados en la figura 17 muestran una gran cantidad de trabajos de investigación enfocados en la aplicación cosmética de la toxina

botulínica, siendo el tema mayormente consultado (27,3%), contrario a la información relacionada con la taxonomía de *C. botulinum* (1,1%).

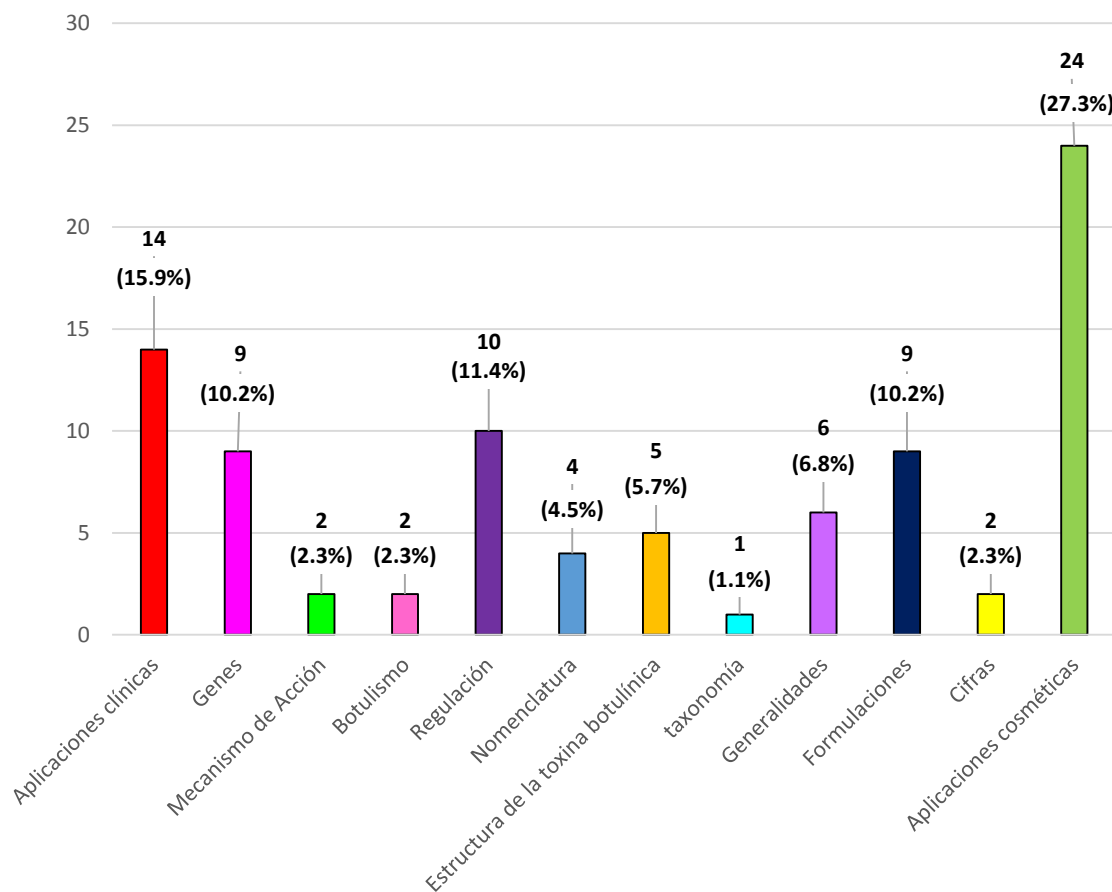


Figura 17. Porcentaje de publicaciones relacionadas con el uso de la toxina botulínica tipo A producida por *C. botulinum* en el área cosmética.

8.7. Publicaciones sobre el gen *bont*

La mayoría de los documentos consultados relacionados con el gen *bont* corresponden a los tipos C y D (17,1%). Los documentos relacionados con el gen *bont/G* tienen una menor cantidad de consultas (5,7%), como se observa en la figura 18.

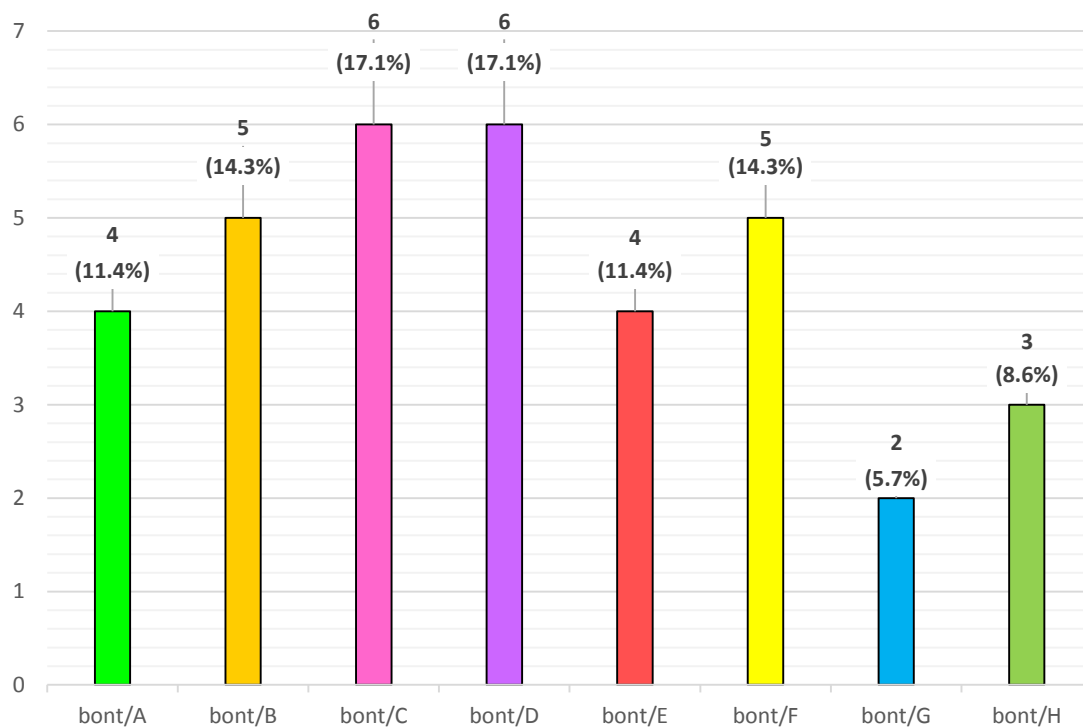


Figura 18. Porcentaje de documentos relacionados con el gen *bont*.

8.8. Documentación relacionada con mecanismos de regulación

En la figura 19 se observa que los mecanismos de regulación más informados en las referencias consultadas son la regulación por BotR y la disponibilidad de nutrientes (19%), mientras que el pH es factor menos informado para la regulación en la producción de la toxina botulínica (10%).

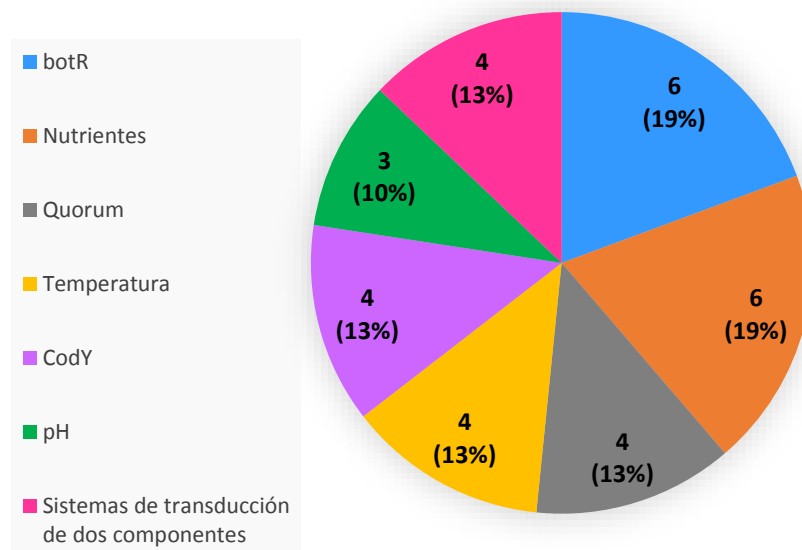


Figura 19. Porcentaje de documentos relacionados con los mecanismos de regulación en la producción de la toxina botulínica.

8.9. Documentación relacionada con el mecanismo de acción

En la figura 20 se observan los resultados de los documentos relacionados con el mecanismo de acción de la toxina botulínica, los cuales muestran que no se obtuvieron datos estadísticos relevantes

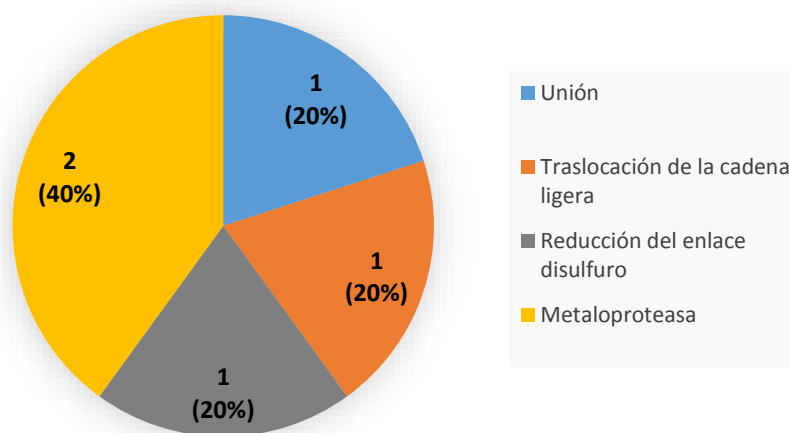


Figura 20. Porcentaje de documentos relacionados con el mecanismo de acción de la toxina botulínica.

8.10. Aplicaciones cosméticas de la toxina botulínica tipo A

Según los datos de la figura 21, la mayoría de los documentos consultados sobre los usos cosméticos de la toxina botulínica tratan sobre el mejoramiento de las arrugas del entrecejo (26%). La elevación de las cejas es el tratamiento cosmético con toxina botulínica tipo A con menos accesos (4%).

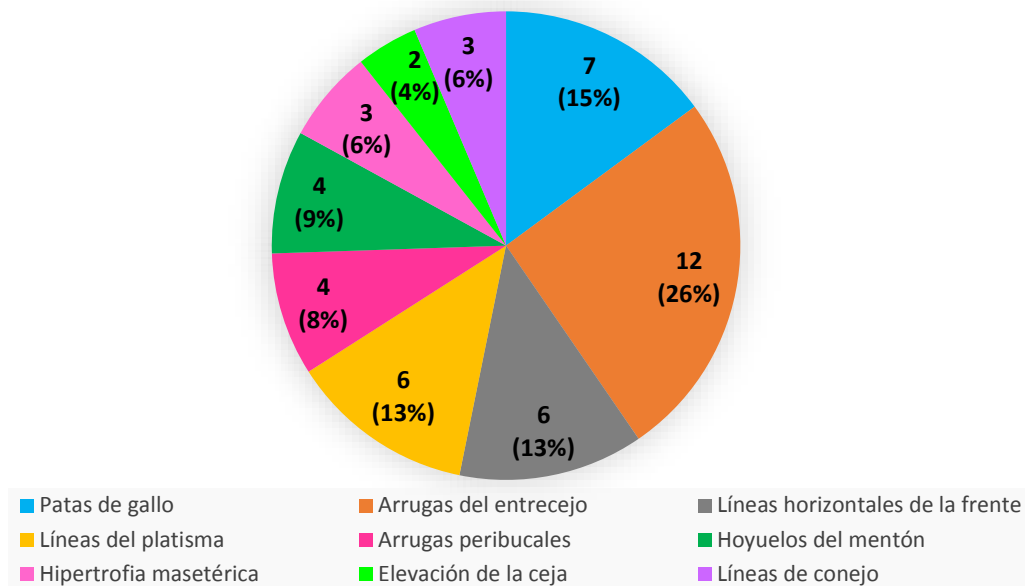


Figura 21. Porcentaje de aplicaciones de la toxina botulínica tipo A en el área cosmética.

8.11. Complicaciones luego del tratamiento con la toxina botulínica tipo A

La mayoría de complicaciones informadas corresponden a la ptosis del párpado (28%), mientras que las complicaciones con menos publicaciones fueron ptosis de la ceja, xeroftalmia, disfagia y visión borrosa (4%). Los datos se observan en la figura 22.

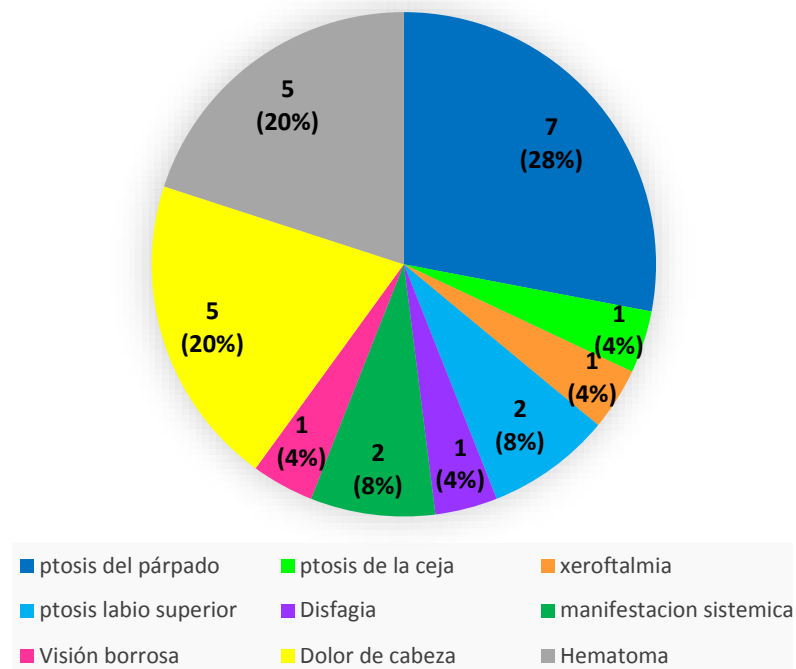


Figura 22. Porcentaje de complicaciones luego del tratamiento cosmético con la toxina botulínica tipo A.

8.12. Aplicaciones clínicas de la toxina botulínica tipo A

En cuanto a las aplicaciones clínicas no se obtuvieron datos estadísticos relevantes, los cuales se pueden observar en la figura 23.

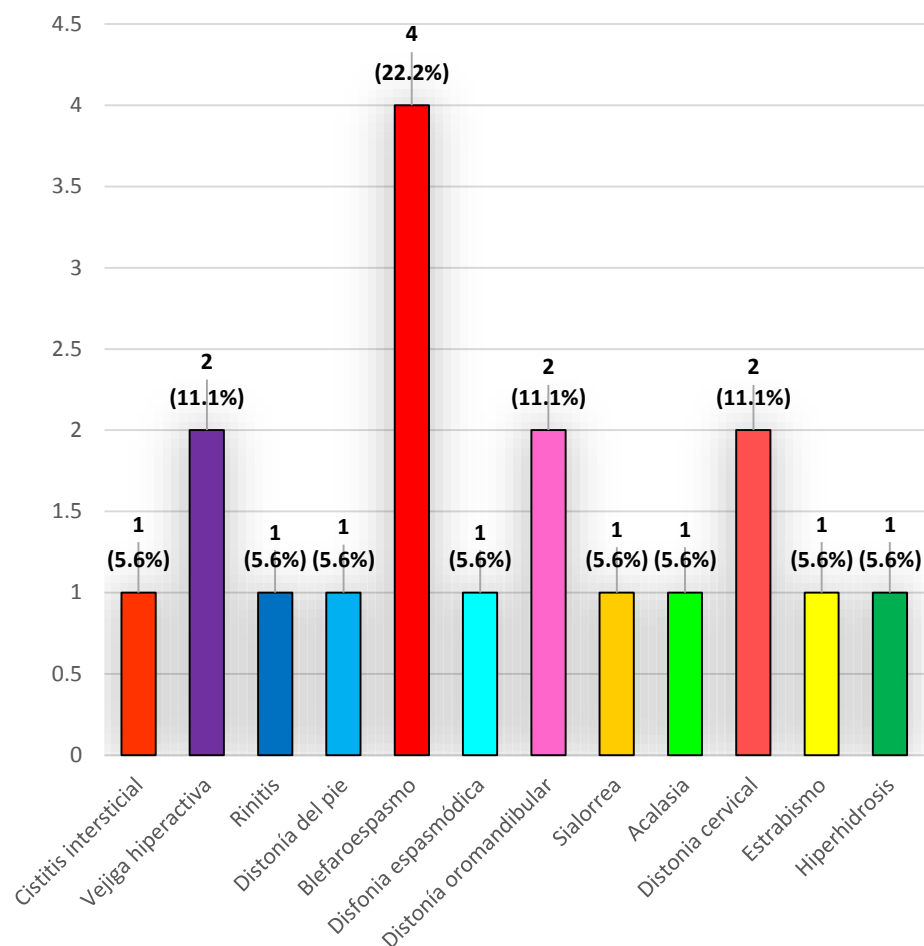


Figura 23. Porcentaje de aplicaciones clínicas de la toxina botulínica tipo A.

8.13. Formulaciones empleadas a nivel cosmético

El análisis estadístico mostró que la formulación más empleada para tratamientos estéticos fue Onabotulinumtoxin A (48%), y la formulación menos usada es Rimabotulinumtoxin A (0%). Los datos se observan en la figura 24.

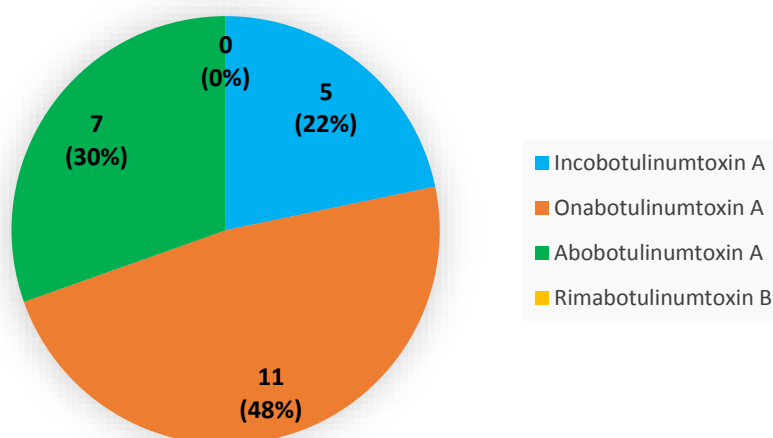


Figura 24. Porcentaje de formulaciones empleadas en las aplicaciones cosméticas de la toxina botulínica tipo A.

8.14. Formulaciones empleadas a nivel clínico

Los datos de la figura 25 muestran que la formulación más usada en tratamientos clínicos fue Onabotulinumtoxin A (65%), y la formulación menos usada es Rimabotulinumtoxin B (7%).

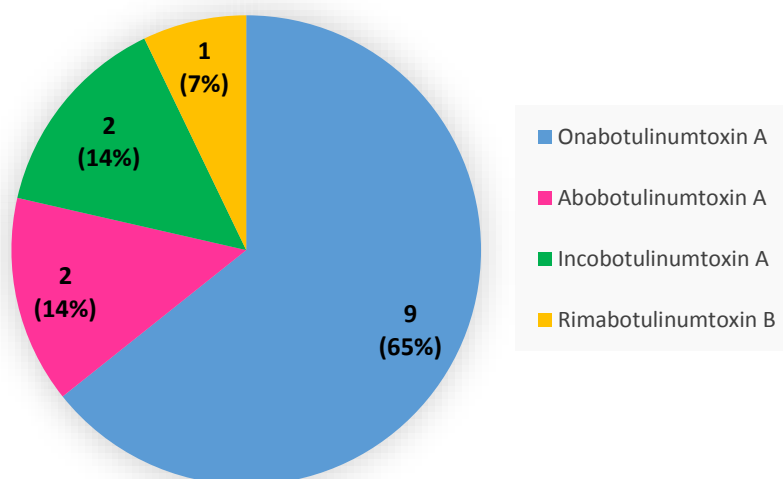


Figura 25. Porcentaje de formulaciones empleadas en las aplicaciones clínicas de la toxina botulínica tipo A.

9. DISCUSIÓN

Los resultados de las estadísticas obtenidos a partir de las referencias bibliográficas concuerdan con el objetivo planteado inicialmente: la identificación de diferentes fuentes bibliográficas relacionadas con el uso de la toxina botulínica tipo A producida por *Clostridium botulinum* en el campo estético. El análisis realizado a la clasificación de la bibliografía según el tipo de documento, muestra que la mayor cantidad corresponde a artículos científicos. En esta revisión, todas las fuentes bibliográficas consultadas correspondientes a artículos se encuentran en las bases de datos internacionales, las cuales algunas son de acceso libre, como Pubmed, y otras tienen un costo para el acceso del recurso bibliográfico, por ejemplo ScienceDirect, Springer, Wiley Online Library, entre otras. Cabe decir que para este trabajo se tuvo acceso a todas las fuentes bibliográficas requeridas. Muchos de los artículos consultados, son documentos técnicos y científicos emitidos o respaldados por centros de investigación, encaminados en el desarrollo de los conocimientos científicos sobre la toxina botulínica. Principalmente se accedieron a artículos de las bases de datos Pubmed (40,9%), ScienceDirect (20,5%) y Springer (15,9%). Pubmed se caracteriza por albergar documentos de acceso rápido y gratuito, razón por la cual es la base de datos más consultada para la elaboración de este trabajo, no obstante ScienceDirect y Springer disponían de varios artículos sobre investigaciones relevantes relacionadas con la toxina botulínica, por lo que también se accedió a la información de éstas. Algunos de los porcentajes menores de acuerdo al acceso de las bases de datos, se debieron a que proveían de otro tipo de documento.

Los recursos literarios provenientes de libros, cuyas cifras resultantes del análisis de la revisión bibliográfica generaron porcentajes significativos (15%), fueron una pieza clave en cuanto a información sobre protocolos relacionados con la inyección de la toxina botulínica tipo A para correcciones estéticas^{3, 4} y tratamientos clínicos¹, así como información relacionada con las generalidades de *C. botulinum*⁴¹.

Respecto a las referencias bibliográficas consultadas que obtuvieron un porcentaje bajo (3%), no se pueden desestimar ya que fueron importantes en cuanto a la información recolectada, y son conformadas por páginas web pertenecientes a Instituciones que realizan análisis estadísticos a nivel nacional e internacional sobre los usos cosméticos de la toxina botulínica tipo A^{77, 78}, y la descripción taxonómica de *C. botulinum*³⁰.

Se puede notar que el número de investigaciones enfocadas en la toxina botulínica presenta una tendencia a aumentar con los años, y que a partir del año 2013 estas investigaciones tuvieron un aumento considerable. El año 2017, representa uno de los años en los que se más se publicó información respecto a la toxina botulínica tipo A (18,2%). En este año Jones y colaboradores⁶⁹ evaluaron la eficacia de la corrección con Incobotulinumtoxin A de las arrugas del entrecejo en personas del género masculino, y Shafik-Elridy y colaboradores⁶⁰ compararon la potencia de las formulaciones Onabotulinumtoxin A y Abobotulinumtoxin A en la corrección de patas de gallo. En otros años se observó un porcentaje menor, en especial antes del 2010, pero no se puede afirmar que en estos años no se investigó, ya que estos datos no abarcan la totalidad de las publicaciones para los años mencionados, sino que fue mucho menos relevante con respecto a años posteriores. Esto probablemente se debe a que en esa época las propiedades de la toxina botulínica aún se estaba investigando, y no había sido aprobada sino para la mejora clínica de ciertas enfermedades, por lo que muchos documentos eran principalmente investigaciones sobre los efectos de la toxina botulínica en humanos^{82, 83, 84}. Posteriormente, en el año 2002 la FDA aprobó Onabotulinumtoxin A para el uso estético en humanos³¹, así como en el 2009 también se aprobó Abobotulinumtoxin A, lo cual inició investigaciones sobre la comparación de las propiedades de las diversas formulaciones⁶⁰.

Se encontró que EE.UU. es el país que más ha publicado información relacionada con la toxina botulínica tipo A (38,6%). Esto concuerda con la información obtenida en las cifras del ISAPS y ASPS^{77, 78}, y la respuesta desde el ámbito científico que se ha dado al aumento en la demanda de la aplicación de la toxina botulínica para correcciones estéticas en EE.UU. Sin embargo, pese a que Colombia es uno de los países en donde más se aplica la toxina botulínica⁷⁷, no se accedió a información publicada en este país, probablemente porque la investigación se limitó a documentos en inglés.

La mayoría de consultas realizadas fueron trabajos de investigación enfocados en las aplicaciones cosméticas de la toxina botulínica (27,3%), causado por el aumento de la demanda del producto^{77, 78} e investigaciones sobre las propiedades y manejo de la toxina botulínica^{31, 47, 62, 71}, así como por el enfoque temático del presente documento. Otros enfoques investigativos significativos fueron las aplicaciones clínicas de la toxina botulínica (15,9%) y la regulación de la producción de la toxina botulínica (11,4%), lo cual pudo deberse a que en el año 2007 se logró secuenciar el genoma completo de *C. botulinum*, permitiendo ser analizado por múltiples centros de investigación que antes no podían tener acceso a las cepas porque *C. botulinum* puede ser usado en bioterrorismo², así como en el año 2011 se aprobó la formulación Incobotulinumtoxin A, la cual no contiene complejos proteicos que inmunicen a los pacientes que requieran grandes dosis para tratamientos clínicos⁷¹.

Actualmente hay dos tipos de toxinas que presentan más investigación, codificadas por los genes *bont/A* y *bont/C*. En el análisis estadístico se encontró que el mayor número de investigaciones consultadas correspondían a los tipos C y D (17,1%), causado por el aumento en las investigaciones de estos tipos, ya que se han encontrado involucrados en brotes de botulismo en Europa²³. El tipo A obtuvo un porcentaje menor en esta investigación (11,4%), pese a ser un serotipo muy investigado por estar vinculado a la mayoría de casos de botulismo y ser empleado en la fabricación de productos farmacéuticos^{6, 31, 47, 62, 71}, probablemente se debe a

la mayor cantidad de investigaciones realizadas en los serotipos del Grupo III. Los tipos B y F alcanzaron un mayor porcentaje que el tipo A (14,3%), porque en algunas referencias revisadas los genes estaban clasificados por grupos de *C. botulinum*, y los tipos B y F son producidos por cepas pertenecientes a varios grupos^{2, 5, 7, 13}, lo que aportó una mayor cantidad de información sobre los genes de estos tipos de toxinas.

Los resultados obtenidos de los mecanismos de regulación en la producción de la toxina botulínica muestran que los nutrientes y el regulador BotR (19%), son los mecanismos de regulación más informados en la literatura revisada. La regulación por los nutrientes varía de acuerdo al tipo de toxina que produce la cepa, por ejemplo se reprime la producción de las toxinas en cepas del Grupo I en presencia de citrulina y del Grupo II en presencia del triptófano¹¹. En cambio el regulador BotR tiene acción bajo las mismas condiciones en todas las cepas, específicamente en la fase exponencial tardía^{22, 28}. El pH es el mecanismo de regulación menos informado (10%), pese a que la producción de la toxina botulínica es óptima a pH 7.0^{9, 17}, no mucha de la literatura recolectada aborda este tema, lo cual probablemente se debe al objetivo de esta investigación. Con respecto a los documentos relacionados con el mecanismo de acción de la toxina botulínica no se llegó a obtener resultados importantes, porque no es el enfoque temático en este trabajo.

En esta investigación se encontró que la toxina botulínica tipo A es más usada para mejora de las arrugas del entrecejo (26%), lo cual puede ser causado porque la FDA sólo aprobó la toxina botulínica tipo A para mejora de las líneas del entrecejo y del canto lateral⁴⁶, por lo tanto la mayoría de las investigaciones pueden estar enfocadas en aplicación del producto en esta área, así como se presume que el incremento también puede estar relacionado con las preferencias estéticas de los pacientes⁷⁶. Otros procedimientos estéticos como la corrección de la hipertrofia maseterina fueron menos consultados (6%), sin embargo puede estar relacionado a que es un procedimiento más realizado en personas asiáticas por su anatomía^{77, 85}, y por lo tanto

no hay tanta información disponible en idioma inglés sobre este procedimiento, además no se encuentra dentro de las indicaciones de la FDA⁴⁶. Los reportes relacionados con las líneas horizontales de la frente y del platisma (13%), y con las patas de gallo (15%), tuvieron un porcentaje de consultas menor. Actualmente hay mayor demanda de aplicación de la toxina botulínica para correcciones estéticas por pacientes entre los 35-50 años⁷⁷, cuyo objetivo es prevenir los signos de la edad o disminuir las arrugas, lo cual está relacionado con la imagen que proyectan las personas frente a la sociedad⁷⁶, esto conlleva que su uso se extienda a otras áreas del cuerpo, como son la corrección de las bandas del platisma y las líneas horizontales de la frente, que aunque no han sido aprobadas por la FDA para su uso, existe literatura que respalda su aplicación en estas zonas^{4, 46, 88, 89}. En cuanto a las aplicaciones clínicas de la toxina botulínica no se obtuvieron resultados relevantes, ya que no es el enfoque investigativo de este trabajo.

El efecto adverso más comúnmente reportado fue la ptosis del párpado (28%), lo cual concuerda con varios reportes, y generalmente es causado por la difusión local del producto desde la zona inyectada^{3, 4}. También se encontró un porcentaje significativo de reportes sobre cefalea (20%) y ptosis del labio superior (8%). La ptosis del labio superior es causada por la difusión del producto paralizando los músculos cigomático mayor y menor, elevador del labio superior, elevador del labio superior y del ala de la nariz, y elevador del ángulo de la boca⁴, y la cefalea es el efecto adverso más informado por los pacientes, pero se presume que es sólo un efecto al dolor de la inyección³. El riesgo de que ocurra un efecto adverso puede minimizarse al evitar diluir en exceso la toxina botulínica, así como utilizando técnicas electromiográficas para tener una mayor precisión en punto indicado de inyección^{3, 4}. Cabe decir que también hay que tener en cuenta el tono muscular, ya que las mujeres tienen menor tono muscular que los hombres, y según las cifras de la ISAPS, la mayoría de los pacientes son de género femenino^{76, 77}, por lo tanto una dosis excesiva causaría efectos secundarios. Otras complicaciones con menos reportes, pero que pueden tener consecuencias graves sin tratamiento adecuado fueron xeroftalmia, disfagia y ptosis de la ceja (4%). Estos

efectos adversos quizá no fueron tan reportados por causa del entrenamiento del personal especializado que realizó los procedimientos en las investigaciones. Cuando no se tratan a tiempo estos problemas puede ocurrir úlceras en la córnea por xeroftalmia, dificultad para comer o botulismo^{4, 6}.

Según el análisis estadístico, la formulación más empleada es Onabotulinumtoxin A, tanto en el campo estético (48%) como clínico (65%), esto puede estar justificado en que es la formulación más antigua y famosa del mercado, lo cual puede causar preferencia por parte de los especialistas y los pacientes³¹. En el área clínica se recomendó el uso de Incobotulinumtoxin A para tratamientos que requerían grandes volúmenes, por su menor inmunogenicidad en los pacientes^{62, 71}, y en los resultados del análisis estadístico se encontró que es la segunda formulación más empleada junto con Abobotulinumtoxin A (14%), contrario al bajo porcentaje de su empleo a nivel cosmético en las publicaciones (22%), probablemente porque es el producto más reciente en el mercado, así como se cree que puede llegar a difundirse más fácilmente a otras áreas del cuerpo por su bajo peso molecular o que se requiere mayor cantidad del producto en comparación con Onabotulinumtoxin A, pese a lo informado en algunos artículos^{49, 55}. Abobotulinumtoxin A es la segunda formulación más empleada en las referencias revisadas a nivel estético (30%). Probablemente sea menos usado que Onabotulinumtoxin A, porque requiere mayor cantidad de dosis para obtener los mismos beneficios⁴⁷. Cabe decir que hay referencias bibliográficas que evaluaron conjuntamente la seguridad de las tres formulaciones, y se concluyó que no había diferencia alguna entre las formulaciones pese a las mejoras que se les había realizado^{46, 49, 72}.

Finalmente, se puede encontrar que el tipo de toxina botulínica que se emplea principalmente para la manufactura del producto es el tipo A, ya que es el tipo más investigado y que ha demostrado generar menos inmunogenicidad^{4, 31, 47, 62, 71}.

10. CONCLUSIONES

- El país que más documentos evidencio relacionados con la toxina botulínica tipo A fue EE.UU. (38,6%).
- Los genes mayormente descritos en la literatura son *bont/C* y *bont/D* (17,1%).
- Las investigaciones sobre la regulación de la producción de la toxina botulínica por medio de la disponibilidad de nutrientes y el regulador BotR, son las más reportadas en la literatura (19%).
- La formulación de toxina botulínica tipo A más usada es Onabotulinumtoxin A, tanto en el área cosmética (48%) como clínica (65%).
- El uso más frecuente de la toxina botulínica tipo A en el campo estético es la mejora cosmética de las arrugas del entrecejo (26%).
- Se puede decir que la ptosis del párpado es la complicación más reportada (28%), lo cual se correlaciona con la frecuente aplicación de la toxina botulínica tipo A para corregir arrugas del entrecejo (26%).

RECOMENDACIONES

1. Realizar investigaciones sobre la formulación Incobotulinumtoxin A para aclarar sus efectos en comparación a otras formulaciones.
2. Realizar trabajos prácticos donde se combine los conocimientos del especialista junto con electromiografía para aumentar la precisión del punto de inyección.
3. Fomentar más investigaciones relacionadas con la toxina botulínica tipo A en Colombia, ya que es uno de los países del mundo en donde más se aplica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Truong D, Hallett M, Zachary C, Dressler D. Manual Of Botulinum Toxin Therapy. 2nd Ed. Nueva York: Cambridge University Press; 2014.
2. Carter A, Peck M. Genomes, neurotoxins and biology of *Clostridium botulinum* Group I and Group II. Res Microbiol. 2015; 166(4):303-317.
3. Scuderi N, Toth BA. International Textbook of Aesthetic Surgery. Berlin: Springer Nature; 2016.
4. Fabbrocini G, De Padova MP, Tosti A. Nonsurgical lip and eye rejuvenation techniques. 1a ed. Suiza: Springer International Publishing; 2016.
5. Stringer S, Carter A, Webb M, Wachnicka E, Crossman L, Sebahia M, Peck M. Genomic and physiological variability within Group II (non-proteolytic) *Clostridium botulinum*. BCM Genomics. 2013; 14(333):1-18.
6. Doyle MP, Buchanan RL. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. 4th ed. Washington D.C.: ASM Press; 2013.
7. Hill KK, Xie G, Foley BT, Smith TJ. Genetic diversity within the botulinum neurotoxin-producing bacteria and their neurotoxins. Toxicon. 2015; 107(Part A):2-8.
8. Connan C, Denève C, Mazuet C, Popoff M. Regulation of toxin synthesis in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*. Toxicon. 2013; 75 (3): 90-100.
9. Connan C, Popoff M. Two-component systems and toxinogenesis regulation in *Clostridium botulinum*. Research in Microbiology, Elsevier. 2015; 166(4): 332-343.
10. Carter G, Cheung J, Larcombe S, Lyras D. Regulation of toxin production in the pathogenic clostridia. Molecular Microbiology. 2014; 91(2): 221–231.
11. Fredrick C, Lín G, Johnson E. Regulation of Botulinum Neurotoxin Synthesis and Toxin Complex Formation by Arginine and Glucose in *Clostridium botulinum* ATCC 3502. Appl Environ Microbiol. 2017; 83(13): 1-11.

12. Zhang Z, Dahlsten E, Korkeala H, Lindström M. Positive regulation of botulinum neurotoxin gene expression by CodY in 2 *Clostridium botulinum* ATCC 3502. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014; 80(24):7651-7658.
13. Hill K, Smith TJ. Genetic Diversity Within *Clostridium botulinum* Serotypes, Botulinum Neurotoxin Gene Clusters and Toxin Subtypes. En: Rummel A, Binz T, editores. *Botulinum Neurotoxins, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Vol 364. Berlin: Springer; 2013. p 1-20.
14. Peck MW, Smith TJ, Anniballi F, Austin JW, Bano L, Bradshaw M, Cuervo P, Cheng LW, Derman Y, Dorner BG, Fisher A, Hill KK, Kalb SR, Korkeala H, Lindstrom M, Lista F, Lúquez C, Mazuet C, Pirazzini M, Popoff MR, Rossetto O, Rummel A, Sesardic D, Singh BR, Stringer SC. Historical perspectives and guidelines for botulinum neurotoxin subtype nomenclature. *Toxins*. 2017; 9(38):1-21.
15. Peng Chen Z, Morris G, Rodriguez R, Wagle Shukla A, Tapia-Núñez J, Okun M. Emerging Opportunities for Serotypes of Botulinum Neurotoxins. *Toxins*. 2012; 4(11):1196-1222.
16. Zhang Y, Gardberg AS, Edwards TE, Sankaran B, Robinson H, Varnum SM, Buchko GW. Structural insights into the functional role of the Hcn sub-domain of the receptor-binding domain of the botulinum neurotoxin mosaic serotype C/D. *Biochimie, Elsevier*. 2013; 95(7):1379-1385.
17. Li T, Tian R, Cai K, Wang Q, Chen F, Fang H, Luo S, Li Z, Wang D, Hou X, Wang H. The effect of pH on growth of *Clostridium botulinum* type A and expression of *bontA* and *botR* during different growth stages. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2013; 10(8):692-697.
18. Woudstra C, Le Maréchal C, Souillard R, Anniballi F, Auricchio B, Bano L, Bayon-Auboyer MH, Koene M, Mermoud I, Brito RB, Lobato FCF, Silva ROS, Dorner MB, Fach P. Investigation of *Clostridium botulinum* group III's mobilome content. *Anaerobe, Elsevier*. 2018; 49(): 71-77.
19. Wongrattanakamon P, Nimmanpipug P, Sirithunyalug B, Jiranusornkul S. Molecular modeling elucidates the cellular mechanism of synaptotagmin

- SNARE inhibition: a novel plausible route to anti-wrinkle activity of botox-like cosmetic active molecules. *Mol Cell Biochem.* 2018; 442(1-2):97-109.
20. Suzuki T, Nagano T, Niwa K, Uchino M, Tomizawa M, Sagane Y, Watanabe T. Construction of “Toxin Complex” in a Mutant Serotype C Strain of *Clostridium botulinum* Harboring a Defective Neurotoxin Gene. *Current Microbiology.* 2017; 74(1):49-54.
 21. Carter GP, Larcombe S, Jayawardena D, Awad MM, Songer JG, Lyras D. Expression of the large clostridial toxins is controlled by conserved regulatory mechanisms. *Int J Med Microbiol.* 2014; 304(8):1147-1159.
 22. Chellapandi P, Prisilla A. *Clostridium botulinum* type A-virulome-gut interactions: A systems biology insight. *Human Microbiome Journal, Elsevier.* 2018; 7-8():15-22.
 23. Woudstra C, Le Maréchal C, Souillard R, Bayon-Auboyer MH, Anniballi F, Auricchio B, De Medici D, Bano L, Koene M, Sansonetti MH, Desoutter D, Hansbauer EM, Dorner MB, Dorner BG, Fach P. Molecular Gene Profiling of *Clostridium botulinum* Group III and Its Detection in Naturally Contaminated Samples Originating from Various European Countries. *Applied and Environmental Microbiology.* 2015; 81(7):2495-2505.
 24. Long SS. Part III: Etiologic Agents of Infectious Diseases. En: Long SS, Fischer M, Prober CG, editores. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases.* 5th Ed. EE.UU.: Elsevier; 2018. p 999-1006.
 25. Kuo YC, Kuo HC. Adverse Events of Intravesical OnabotulinumtoxinA Injection between Patients with Overactive Bladder and Interstitial Cystitis- Different Mechanisms of Action of Botox on Bladder Dysfunction?. *Toxins.* 2016; 8(3):-.
 26. Pirazzini M, Rossetto O, Eleopra R, Montecucco C. Botulinum neurotoxins: biology, pharmacology and toxicology. *Pharmacol Rev.* 2017; 69(2): 200-235.
 27. Harii K, Kawashima M, Furuyama N, Lei X, Hopfinger R, Lee E. OnabotulinumtoxinA (Botox) in the Treatment of Crow’s Feet Lines in Japanese Subjects. *Aesthetic Plastic Surgery.* 2017; 41(5):1186-1197.

28. Ihekweba AEC, Mura I, Walshaw J, Peck MW, Barker GC. An Integrative Approach to Computational Modelling of the Gene Regulatory Network Controlling *Clostridium botulinum* Type A1 Toxin Production. PLOS computational biology. 2016; 12(11):1-23.
29. Dahlsten E, Isokallio M, Somervuo P, Lindstrom M, Korkeala H. Transcriptomic Analysis of (Group I) *Clostridium botulinum* ATCC 3502 Cold Shock Response. PLOS ONE. 2014; 9(2):1-13.
30. *Clostridium botulinum* [Internet]. NCBI Taxonomy Browser. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=696040>
31. Nahai F, Lorenc P, Kenkel J, Fagien S, Hirmand H, Nestor M, Sclafani A, Sykes J, Waldorf H. A review of onabotulinumtoxinA (Botox). Aesthetic Surgery Journal. 2013; 33(1):9-12.
32. Barash JR, Arnon SS. A Novel Strain of *Clostridium botulinum* That Produces Type B and Type H Botulinum Toxins. The Journal of Infectious Diseases. 2013; 209(2):183-191.
33. Stern D, Weisemann J, Le Blanc A, von Berg L, Mahrhold S, Piesker J, Laue M, Lippa PB, Dorner MB, Dorner BG, Rummel A. A lipid-binding loop of botulinum neurotoxin serotypes B, DC and G is an essential feature to confer their exquisite potency. PLOS Pathog. 2018; 14(5):1-25.
34. Sakaguchi Y, Suzuki T, Yamamoto Y, Nishikawa A, Oguma K. Genomics of *Clostridium botulinum* group III strains. Res Microbiol, Elsevier. 2015; 166(4):318-325.
35. Pirazzini M, Tehran DA, Leka O, Zanetti G, Rossetto O, Montecucco C. On the translocation of botulinum and tetanus neurotoxins across the membrane of acidic intracellular compartments. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). 2016; 1858(3):467-474.
36. Gustafsson R, Berntsson RP-A, Martínez-Carranza M, Tekle GE, Odegrip R, Johnson EA, Stenmark P. Crystal structures of OrfX2 and P47 from a Botulinum neurotoxin OrfX-type gene cluster. FEBS Lett. 2017; 591(22):3781-3792.

37. Aoishi K, Takahashi H, Hato N, Gyo K, Yokota M, Ozaki S, Suzuki M. Treatment of allergic rhinitis with intranasal infusion of botulinum toxin type A in mice. *Life Sciences, Elsevier*. 2016; 147():132-136.
38. Grenda T, Kukier E, Kwiatek. Methods and difficulties in detection of *Clostridium botulinum* and its toxins. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2014; 17(1)195-205.
39. Giordani F, Fillo S, Anselmo A, Palozzi AM, Fortunato A, Gentile B, Tehran DA, Ciammaruconi A, Spagnolo F, Pittiglio V, Anniballi F, Auricchio B, De Medici D, Lista F. Genomic characterization of Italian *Clostridium botulinum* group I strains. *Infection, genetics and evolution, Elsevier*. 2015; 36():62-71.
40. Takehara M, Takagishi T, Seike S, Oda M, Sakagushi Y, Hisatsune J, Ochi S, Kobayashi K, Nagahama M. Cellular Entry of *Clostridium perfringens* Iota-Toxin and *Clostridium botulinum* C2 Toxin. *Toxins*. 2017;9(8):1-9.
41. Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki K. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 5, parts A & B. 2nd ed. Nueva York: Springer-Verlag; 2012.
42. Bistrom A, Moisander-Jylha AM, Heinikainen S, Pelkola K, Raunio-Saarnisto M. Isolation of *Clostridium limosum* from an outbreak of metritis in farmed mink. *Acta Vet Scand*. 2016; 58(49):2-4.
43. Weimer PJ, Stevenson DM. Isolation, characterization, and quantification of *Clostridium kluyveri* from the bovine rumen. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012; 94(2):461–466.
44. Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe, Elsevier*. 2016; 40():95-99.
45. Woudstra C, Le Maréchal C, Souillard R, Bayon-Auboyer MH, Mermoud I, Desoutter D, Fach P. New insights into the genetic diversity of *Clostridium botulinum* Group III through extensive genome exploration. *Front. Microbiol*. 2016; 7(757):1-10.

46. Carruthers J, Carruthers A, Dover JS, Alam M. Procedures in Cosmetic Dermatology. 4th ed. China: Elsevier; 2018.
47. Nahai F, Lorenc P, Kenkel JM, Fagien S, Hirmand H, Nestor MS, Sclafani AP, Sykes JM, Waldorf HA. A review of AbobotulinumtoxinA (Dysport). Aesthetic Surgery Journal. 2013; 33(1):13-17.
48. Datta Gupta A, Visvanathan R. Botulinum toxin for foot dystonia in patients with Parkinson's disease having deep brain stimulation: a case series and a pilot study. J Rehabil Med. 2016;48(6):559-562.
49. Kollewe K, Mohammadi B, Köller S, Pickenbrock H, Dengler R, Dressler D. Blepharospasm: long-term treatment with either Botox, Xeomin or Dysport. J Neural Transm, Springer. 2015; 122(3):427-431.
50. Rosow DE, Pechman A, Saint-Victor S, Lo K, Lundy DS, Casiano RR. Factors Influencing Botulinum Toxin Dose Instability in Spasmodic Dysphonia Patients. Journal of Voice. 2015; 29(3):352-355.
51. Teemul TA, Patel R, Kanatas A, Carter LM. Management of oromandibular dystonia with botulinum A toxin: a series of cases. Br J Oral Maxillofac Surg, Science Direct. 2016; 54(10):1080-1084.
52. Ababneh OH, Cetinkaya A, Kulwin DR. Long-term efficacy and safety of botulinum toxin A injections to treat blepharospasm and hemifacial spasm. Clinical and Experimental Ophthalmology. 2014; 42(3):254-261.
53. Chan KH, Liang C, Wilson P, Higgins D, Allen GC. Long-term safety and efficacy data on botulinum toxin type A: an injection for sialorrhea. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg. 2013; 139(2):134-138.
54. Hooft N, Schmidt ES, Bremner RM. Achalasia in pregnancy: Botulinum toxin A injection of lower esophageal sphincter. Hindawi Publishing Corporation. 2015;():-.
55. Dressler D, Tacik P, Adib Saberi F. Botulinum toxin therapy of cervical dystonia: comparing onabotulinumtoxinA (Botox®) and incobotulinumtoxinA (Xeomin®). J Neural Transm (Vienna). 2014; 121(1):29-31.

56. Martínez-Ramírez D, Giugni JC, Hastings E, Wagle Shukla A, Malaty IA, Okun MS, Rodríguez RL. Comparable Botulinum Toxin Outcomes between Primary and Secondary Blepharospasm: A Retrospective Analysis. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*. 2014; 4(286):1-7.
57. Pandey S, Sharma S. Botulinum toxin in Meige's syndrome: A video-based case series. *Neurol India*. 2018; 66(1):71-76.
58. Ravindra P, Jackson BL, Parkinson RJ. Botulinum toxin type A for the treatment of non-neurogenic overactive bladder: does using onabotulinumtoxinA (Botox®) or abobotulinumtoxinA (Dysport®) make a difference?. *BJU Int*. 2013; 112(1):94-99.
59. Merino PS, Vera RE, Mariñas LG, Gómez de Liaño PS, Escribano JV. Botulinum toxin for treatment of restrictive strabismus. *Journal of Optometry*. 2017; 10(3):189-193.
60. Shafik Elridy A, Eldin Zaki RG, Fazwy Elshinawy R. Comparison of the Clinical Efficacy of Abobotulinumtoxin A (ABO) and Onabotulinumtoxin A (ONA) in the Treatment of Crow's Feet Wrinkles: A Split-Face Study. *Seminars in Ophthalmology*. 2017; 33(2):1-9.
61. Del Río Navarrete MP. Botulinum Toxin for Mentum and Perioral Area. En: Issa M, Tamura B, editores. *Botulinum Toxins, Fillers and Related Substances. Clinical Approaches and Procedures in Cosmetic Dermatology*. Alemania: Springer; 2017. p 1-10.
62. Nahai F, Lorenc P, Kenkel JM, Fagien S, Hirmand H, Nestor M, Sclafani A, Sykes JM, Waldorf HA. IncobotulinumtoxinA in clinical literature. *Aesthetic Surgery Journal*. 2013; 33(1):23-34.
63. Rostedt Punga A, Alimohammadi M, Fagrell D, Nyberg F, Rees D, Wong C. A Randomized, Comparative Study to Evaluate Efficacy and Safety of Two Injection Volumes of AbobotulinumtoxinA in Treatment of Glabellar Lines. *Dermatol Surg*. 2016; 42(8):967-976.
64. Trindade de Almeida A, Carruthers J, Cox SE, Goldman M, Wheeler S, Gallagher C. Patient Satisfaction and Safety With Aesthetic

OnabotulinumtoxinA After At Least 5 Years: A Retrospective Cross-Sectional Analysis of 4,402 Glabellar Treatments. *Dermatologic Surgery*. 2015; 41():S19-S28.

65. Susmita A, Devi Kolli NN, Meka S, Chakravarthi SP, Kattimani VS, Lingamaneni KP, Shaik LS. An Evaluation of Use of Botulinum Toxin Type A in the Management of Dynamic Forehead Wrinkles - A Clinical Study. *J Clin Diagn Res*. 2016; 10(10):127-131.
66. Robinson DM, Horne DF, Rohrer TE. Shaping of the Eyebrows with Botulinum Toxin Type A (BoNT-A). En: Hartstein ME, Massry G, Holds J, editores. *Pearls and Pitfalls in Cosmetic Oculoplastic Surgery*. Nueva York: Springer; 2015. p 413-415.
67. Kühne U, Imhof M. IncobotulinumtoxinA (Xeomin/Bocouture). En: Cohen J, Ozog D, editores. *Botulinum toxins: Cosmetic and Clinical Applications*. 1st ed.: John Wiley & Sons Ltd.; 2017. p 79-95.
68. Emer JJ, Axibal E, Marmur ES, Waldorf H. OnabotulinumtoxinA (Botox) in Dermatology. En: Cohen J, Ozog D, editors. *Botulinum toxins: Cosmetic and Clinical Applications*. 1st ed.: John Wiley & Sons Ltd.; 2017. p 357-367.
69. Jones D, Kerscher M, Geister T, Hast M, Weissenberger P. Efficacy of IncobotulinumtoxinA for the Treatment of Glabellar Frown Lines in Male Subjects: Post-Hoc Analyses From Randomized, Double-Blind Pivotal Studies. *Dermatologic Surgery*. 2017; 43():S235-S241.
70. Ascher B, Kestemont P, Boineau D, Bodokh I, Stein A, Heckmann M, Dendorfer M, Pavicic T, Volteau M, Tse A, Picaut P, Rzany B. Liquid Formulation of AbobotulinumtoxinA Exhibits a Favorable Efficacy and Safety Profile in Moderate to Severe Glabellar Lines: A Randomized, Double-Blind, Placebo- and Active Comparator-Controlled Trial. *Aesthetic Surgery Journal*. 2018; 38(2):183-191.
71. Nahai F, Lorenc P, Kenkel JM, Fagien S, Hirmand H, Nestor SM, Sclafani AP, Sykes JM, Waldorf HA. Incobotulinumtoxin A (Xeomin). *Aesthetic Surgery Journal*. 2013; 33(1):18-22.

72. Pavicic T, Prager W, Klöppel M, Ravichandran S, Galatoire O. IncobotulinumtoxinA use in aesthetic indications in daily practice: a European multicenter, noninterventional, retrospective study. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2015; 8():135-142.
73. Streker M, Luebberding S, Krueger N, Harrington L, Kerscher M. Patient-Reported Outcomes After IncobotulinumtoxinA Treatment for Upper Facial Wrinkles. *Dermatologic Surgery*. 2015; 41():29-38.
74. Gubanova E, Haddad Tabet M, Bergerova Y, Moiseieva O, Chemeris A, Sanches E, Sharova A, Rodríguez Pose L, Raymond R, Prygova I, Carlisle I. Assessment of Subject and Physician Satisfaction after Long-Term Treatment of Glabellar Lines with AbobotulinumtoxinA (Dysport®/Azzalure®): Primary Results of the APPEAL Noninterventional Study. *Aesthetic Plastic Surgery*. 2018; 42(6): 1672–1680.
75. Wilson A, Chang B, Taglienti A, Chin B, Chang C, Folsom N, Percec I. A Quantitative Analysis of OnabotulinumtoxinA, AbobotulinumtoxinA, and IncobotulinumtoxinA: A Randomized, Double-Blind, Prospective Clinical Trial of Comparative Dynamic Strain Reduction. *Plast Reconstr Surg*. 2016; 137(5):1424-1433.
76. Berkowitz D. Botox Nation. Changing the face of America. New York University Press. 2017.
77. The International Study on Aesthetic/Cosmetic Procedures Performed in 2016 [Internet]. ISAPS International Society of Aesthetic Plastic Surgery. Disponible en: https://www.isaps.org/wp-content/uploads/2019/03/ISAPS_2017_International_Study_Cosmetic_Procedures_NEW.pdf
78. Plastic Surgery Statistics Report 2017 [Internet]. ASPS American Society of Plastic Surgeons. Disponible en: <https://www.plasticsurgery.org/documents/News/Statistics/2018/plastic-surgery-statistics-report-2018.pdf>

79. Pickett A. Botulinum Toxin as a Clinical Product: Manufacture and Pharmacology. En: Foster KA, editores. Clinical Applications of Botulinum Neurotoxin. Vol 5. EE.UU.: Springer; 2014. p 7-49.
80. Garcia-Murray E, Velasco-Villasenor ML, Acevedo B, Luna S, Lee J, Waugh JM, Hornfeldt CS. Safety and efficacy of RT002, an injectable botulinum toxin type A, for treating glabellar lines: results of a phase 1/2, open-label, sequential dose-escalation study. *Dermatol Surg*. 2015; 41(Suppl 1):S47-S55.
81. Paul Lorenc Z. Abstract: DWP-450, Purified Botulinum Toxin Type A, for the Treatment of Moderate-to-Severe Glabellar Lines in Adult Subjects: Results from Two Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Single Dose Phase III Safety and Efficacy Studies. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2017; 5(9 Suppl):193-194.
82. Carruthers J, Carruthers A. Treatment of glabellar frown lines with *C. botulinum*-A exotoxin. *J Dermatol Surg Oncol*. 1992; 18(1):17-21.
83. Blitzer A, Brin MF, Keen MS, Aviv JE. Botulinum toxin for the treatment of hyperfunctional lines of the face. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1993; 119(9):1018-1022.
84. Blitzer A, Binder WJ, Aviv JE, Keen MS, Brin MF. The management of hyperfunctional facial lines with botulinum toxin. A collaborative study of 210 injection sites in 162 patients. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1997; 123(4):389-392.
85. Carruthers J, Carruthers A. Aesthetic botulinum A toxin in the mid and lower face and neck. *Dermatol Surg*. 2003; 29(5):468-476.
86. Kim NH, Chung JH, Park RH, Park JB. The use of botulinum toxin type A in aesthetic mandibular contouring. *Plast Reconstr Surg*. 2005; 115(3):919-930.
87. Ascher B, Talarico S, Cassuto D, Escobar S, Hexsel D, Jaén P, Monheit GD, Rzany B, Viel M. International consensus recommendations on the aesthetic usage of botulinum toxin type A (Speywood Unit)-Part I: Upper facial wrinkles. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010; 24(11):1278-1284.

88. Dorizas A, Krueger N, Sadick NS. Aesthetic uses of the botulinum toxins.
Dermatol Clin. 2014; 32(1):23-36.

89.