

# **La tossina botulinica**

## **caratteristiche biochimiche, immunologiche e suo impiego**



**Alessandro Lozza**  
IRCCS Neurologico Casimiro Mondino  
Università di Pavia



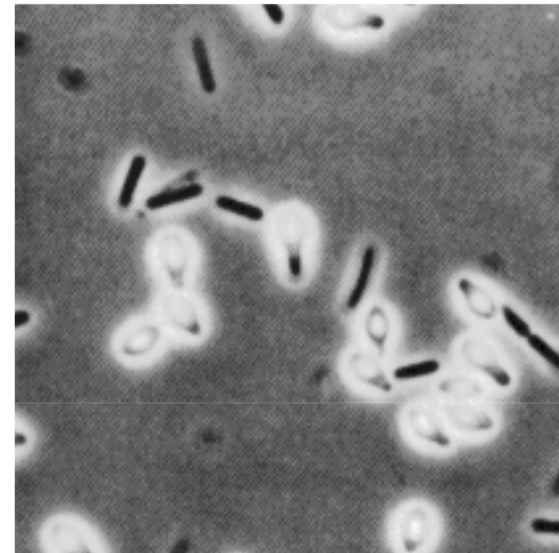
# Neurotossine

- La neurotossina è una sostanza che inibisce l'azione dei neuroni
- La neurotossina botulinica è la tossina più potente attualmente conosciuta
- In piccole dosi è efficace per il trattamento di varie patologie caratterizzate dalla contrazione involontaria dei muscoli



# *Clostridium botulinum*

- Le tossine botuliniche sono prodotte dal batterio *Clostridium botulinum*:
  - batterio anaerobico le cui spore si trovano comunemente nel suolo
  - il batterio cresce a forma di bastoncino se una spora contamina il cibo in condizioni adatte:
    - temperatura  $>10^{\circ}\text{C}$
    - anaerobiche (assenza di ossigeno)
    - acide (pH di 4,6 o superiore)
  - il batterio produce quindi altre spore, o implode, dissolvendo la membrana cellulare, e rilascia la tossina





# Neurotossine botuliniche

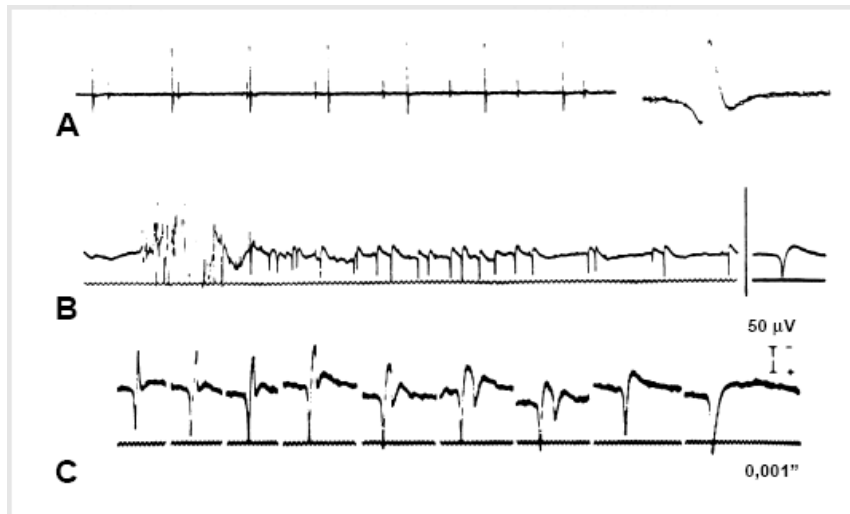
- Il *Clostridium botulinum* produce sette sierotipi diversi di neurotossine:
  - A, B, C1, D, E, F e G
  - ognuno dei quali vanta proprietà biochimiche diverse
- la forma purificata della neurotossina botulinica di tipo A è usata per scopo terapeutico insieme alla B



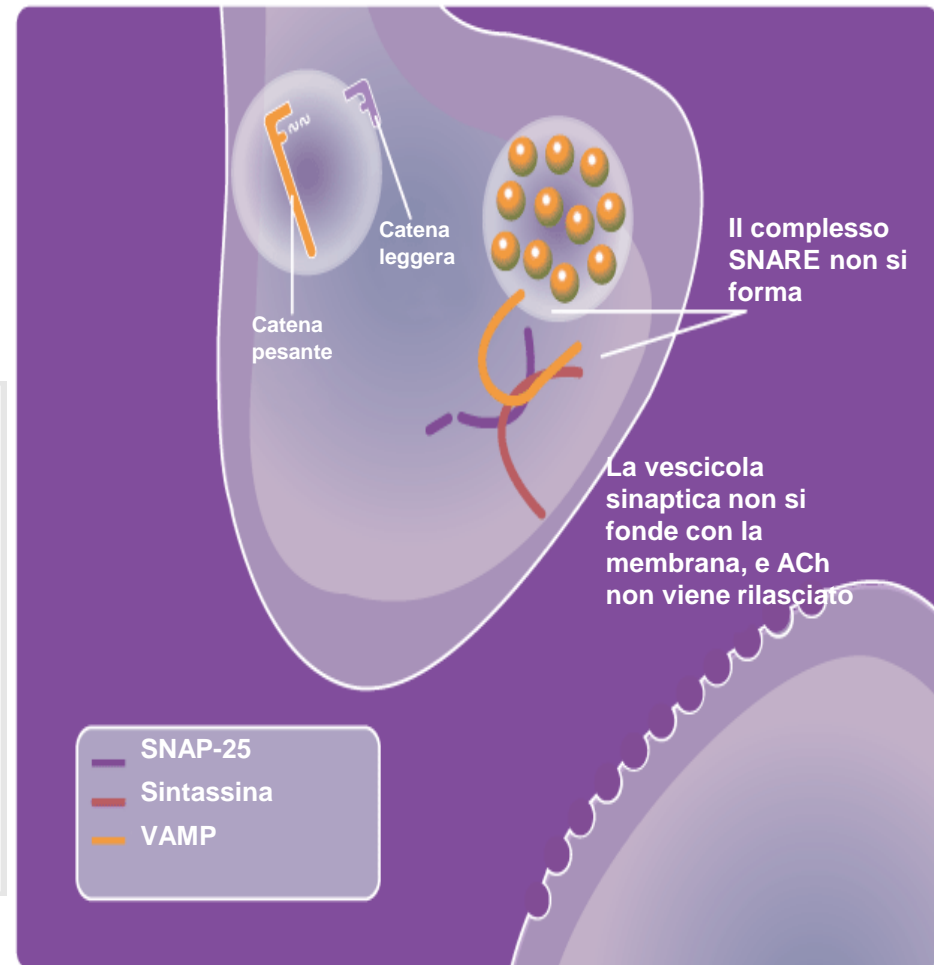
# Denervazione chimica

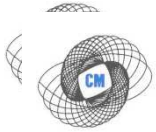
Una volta all'interno del terminale nervoso la Tossina A agisce clivando la SNAP-25

La formazione del complesso SNARE è imperfetta, quindi interferisce con l'esocitosi delle vescicole colinergiche e provoca la *chemodenervazione*



EMG – segni di denervazione





# Tossine A e B



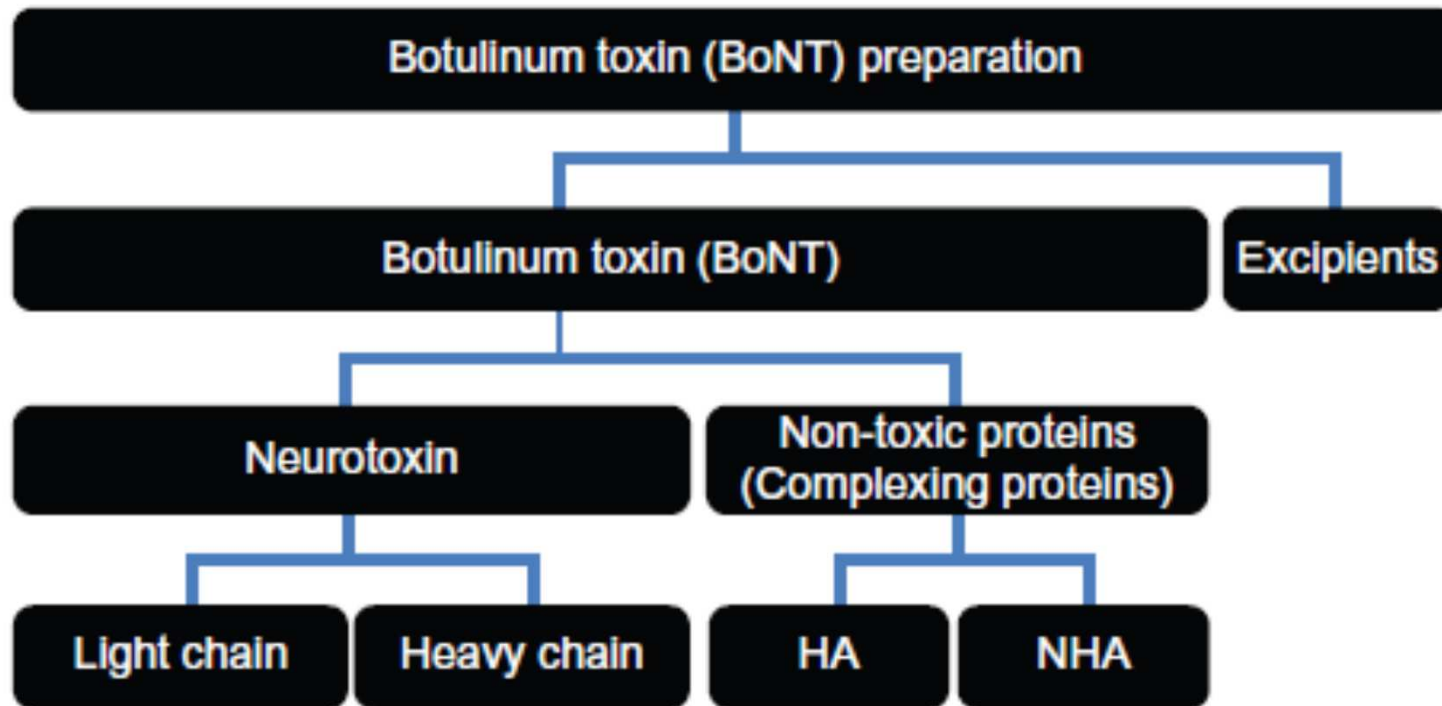


Brand name	Botox®	Dysport®	Xeomin®	Myobloc®/Neurobloc® <sup>a</sup>
<b>Generic name</b>	<b>OnabotulinumtoxinA</b>	<b>AbobotulinumtoxinA</b>	<b>IncobotulinumtoxinA</b>	<b>RimabotulinumtoxinB</b>
Manufacturer	Allergan Inc (USA)	Ipsen Ltd (UK)	Merz Pharmaceuticals GmbH (Germany)	Solstice Neurosciences Inc (USA)
Serotype	A	A	A	B
Target SNARE	SNAP-25	SNAP-25	SNAP-25	VAMP (synaptobrevin)
Packaging (units/vial)	100	500	50, 100	2500 (0.5 mL), 5000 (1 mL), 10,000 (2 mL)
<u>Pharmaceutical preparation</u>	Powder	Powder	Powder	Ready-to-use solution (5000 U/mL)
Stabilization	Vacuum drying	Freeze drying	Vacuum drying	pH reduction
<u>Complex size (kDa)</u>	900	300–900	150	700
<u>Complexing proteins</u>	O	O	X	O
Excipients (per vial)	HSA 500 ug NaCl 900 ug	HSA 125 ug Lactose 2500 ug	100 units/vial HSA 1 mg Sucrose (saccharose) 4.7 mg	HSA 0.5 mg/mL disodium succinate 0.01 M NaCl 0.1 M H <sub>2</sub> O Hydrochloric acid
<u>Biological activity in relation to Botox®</u>	1	1/3	1	1/40
<u>Specific activity (units/ng)</u>	20	40	167	75–125
<u>Storage of packaged product</u>	2°C–8°C	2°C–8°C	Room temperature	2°C–8°C
<u>Shelf life</u>	36 months	24 months	36–48 months	24 months
pH of reconstituted preparation	7.4	7.4	7.4	5.6
Storage once reconstituted	2°C–8°C for 24 hours	2°C–8°C for several Hours → 4 hours if stored at room temperature	2°C–8°C for 24 hours	For a few hours

Notes: <sup>a</sup>Myobloc® is the brand name in Canada, the United States, and Korea. Neurobloc® is the brand name in the European Union, Norway, and Iceland.  
Abbreviations: HSA, human serum albumin; VAMP, vesicle associated membrane protein.



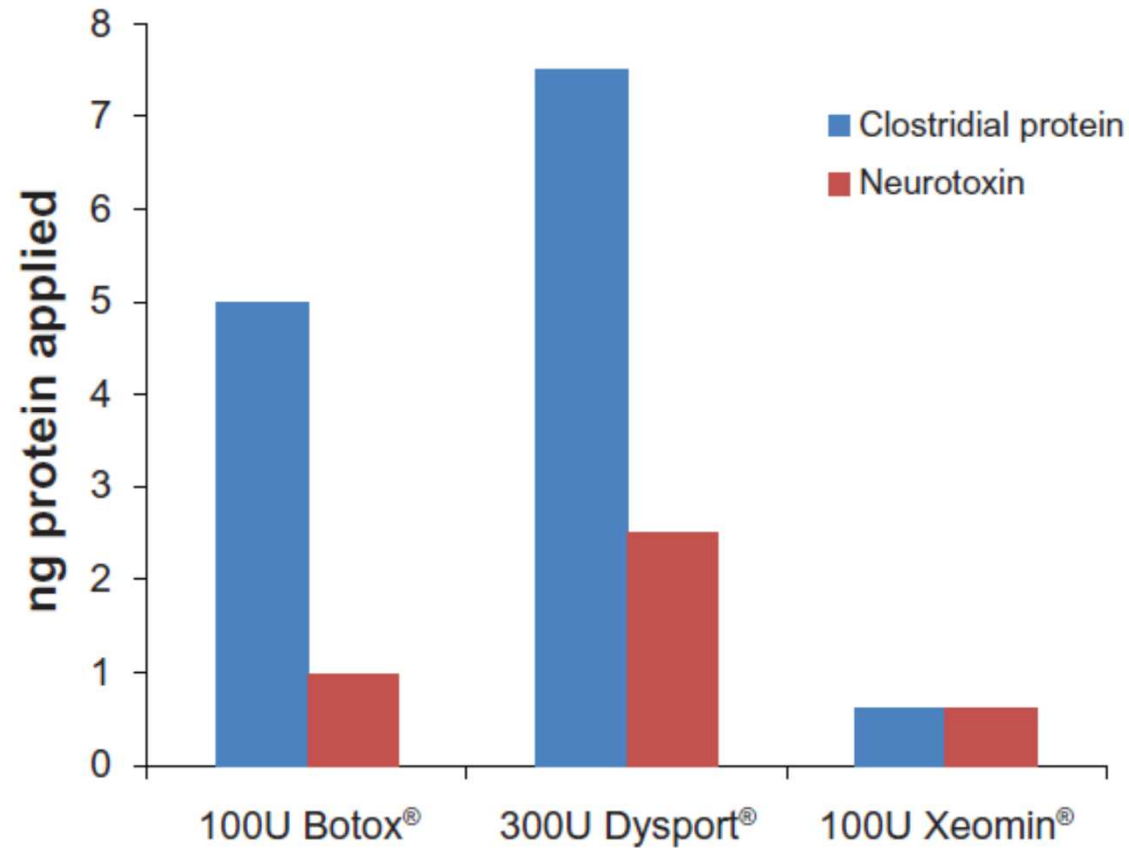
# La molecola nelle sue parti







# Resistenza: è importante la quota proteica?





# Resistenza alla tossina

## certezze e dubbi

- Tempo d'azione tossina A: rughe glabellari 2-3 gg., muscolo striato 6-7 gg., tremore 2 sett., iperidrosi 22 gg., tossina B 48 ore; durata 3 mesi circa.
- Non responders e resistenza secondaria alla tossina (Dressler et al. 2002 -  $694 \pm 519$  gg.); Failure rate (Dressler et al. 2006 1-5% BoNT A, 44% BoNT B).
- Test anticorpale scarsamente disponibile.
- Componente proteica: possibile immunogenicità diretta o in concorso (HA e NTHA).

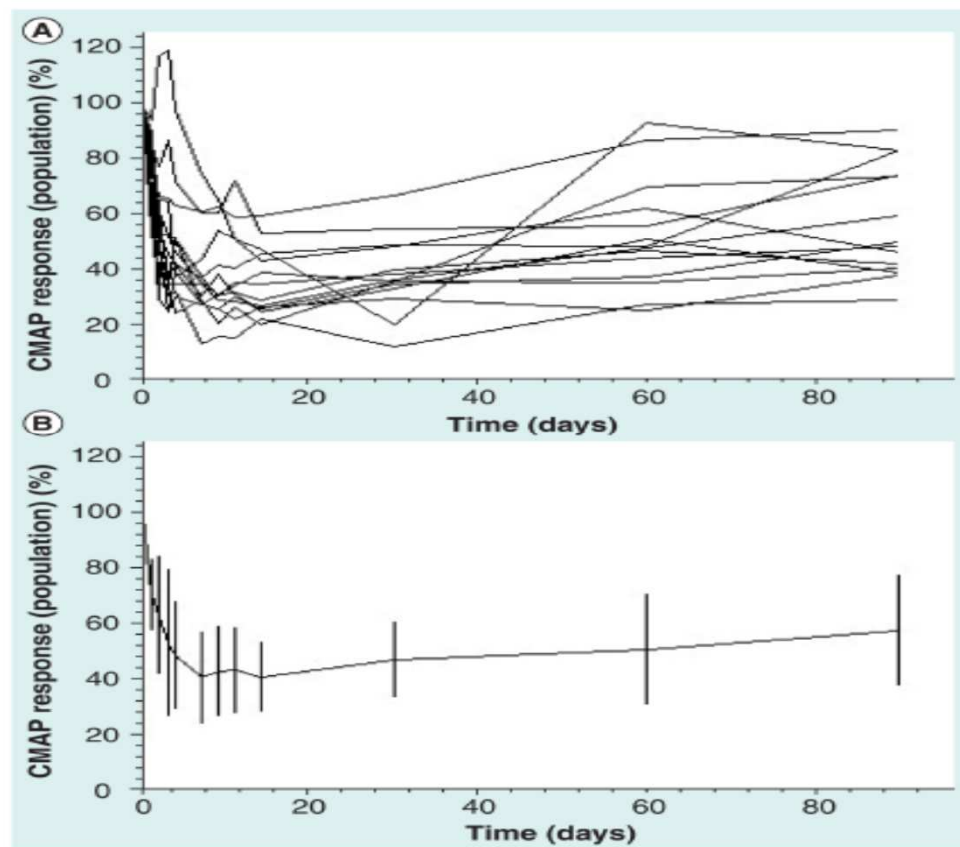


# Resistenza alla tossina: possibili concause tecniche

- Preparazione della tossina: agitare o no? (Shome et al. 2010 – BoNT A agitata 48 gg. 30/min).
- Ph della soluzione fisiologica e del muscolo, terapie concomitanti (4-aminochinoline).
- Difficoltà e errori di iniezione (sede, localizzazione, ipotrofia).
- Diffusione e effetti sistemici (dose, morfologia muscolare, vascolarizzazione).



# Risposta alla tossina



Test di risposta alla tossina nel muscolo EDB

Lebeda et al. 2011; Expert Rev Neurotherapy

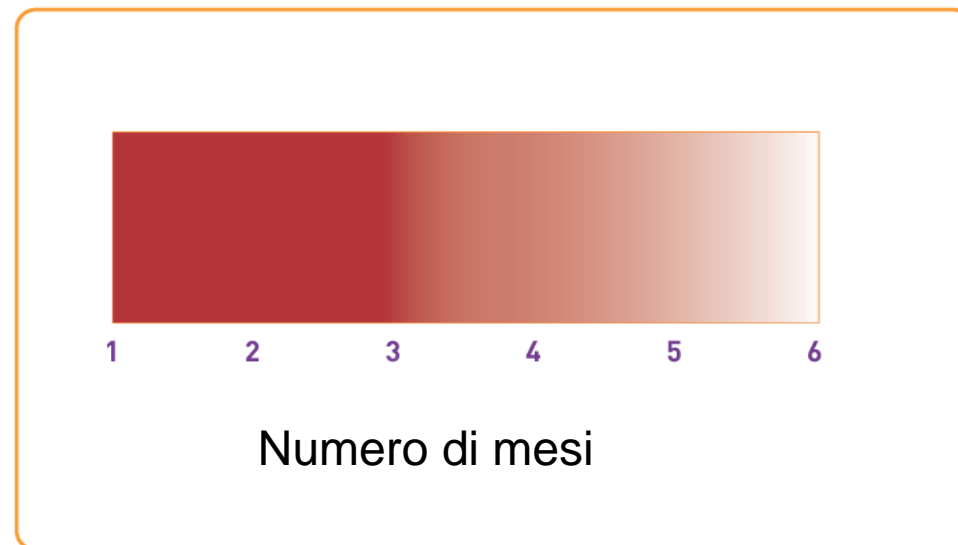
4 U Botox vs. 4 U Xeomin

Riduzione CMAP max ottenuta al 7° giorno (Jost et al. 2005) e duratura nel tempo.



# Durata d'azione della tossina A

- Per mantenere l'effetto clinico è quindi necessario generalmente ripetere le iniezioni solamente tre o quattro volte l'anno.
- Col tempo le dosi e gli intervalli tra le terapie possono variare e l'entità e durata del sollievo differiscono da un paziente all'altro.
- Il trattamento a lungo termine ha dimostrato di essere sicuro e può essere ripetuto a tempo indeterminato.
- Iniezioni troppo ravvicinate possono facilitare resistenza.





# Le distonie



Distonia cervicale



Distonia arto superiore



Distonia arto inferiore

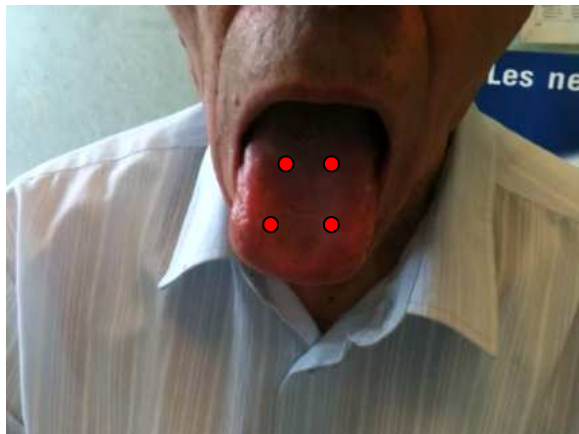




Paziente affetta da blefarospasmo e definita “resistente”:



# Movimenti involontari della lingua: tremore

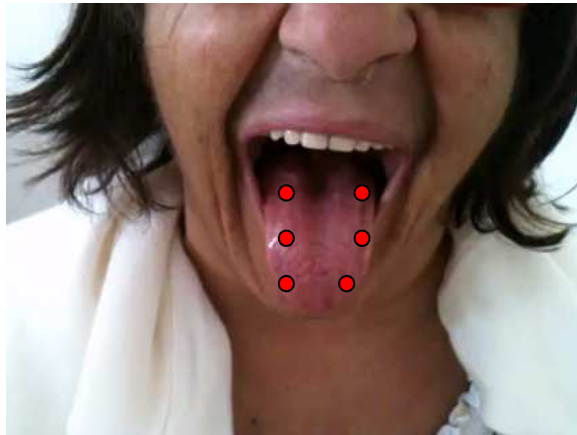


Paziente con disfagia per iniezione sottomentale





# Movimenti involontari della lingua: discinesia - distonia buccale



Paziente con disfagia per iniezione sottomentale



# iniezione con guida elettrostimolata

Utile per identificare il movimento  
selettivo dei muscoli di piccole  
dimensioni

Non fornisce informazione morfologica

Paziente non collaborante





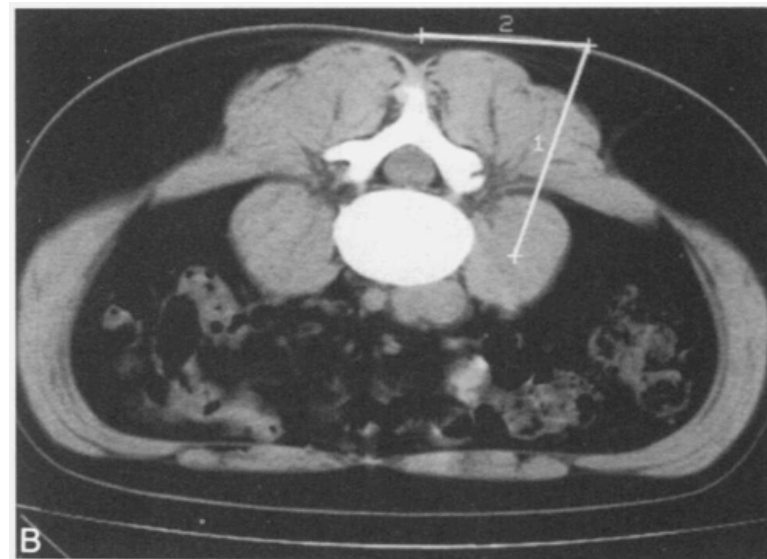
# Iniezione con guida TAC

Utile per identificare morfologicamente i muscoli profondi (piriforme, psoas)

Fornisce informazioni sulle caratteristiche tissutali (fibrosi)

Non fornisce informazione sull'iperattività elettrica

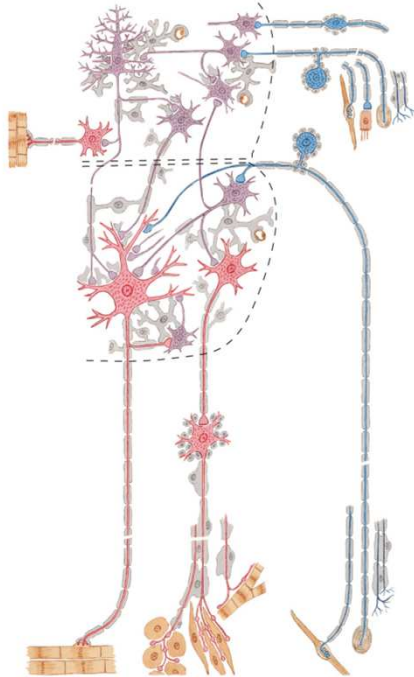
Invasiva, esposizione a raggi, utile in paziente non collaborante





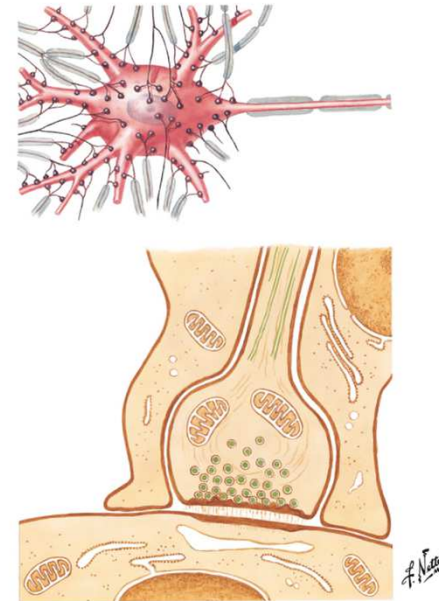
# Le sinapsi “non motorie”

Tipi di neuroni



F. Natta

Morfologia della sinapsi



F. Natta

La complessa rete sinaptica del SNC e SNP e la importanza dei canali  $Ca^{++}$  e della Acetilcolina rende idea di come le neurotossine botuliniche possano agire in più punti ( scialorrea, disautonomie, dolore, etc..) e quanta potenzialità vi possa essere nella loro applicazione.

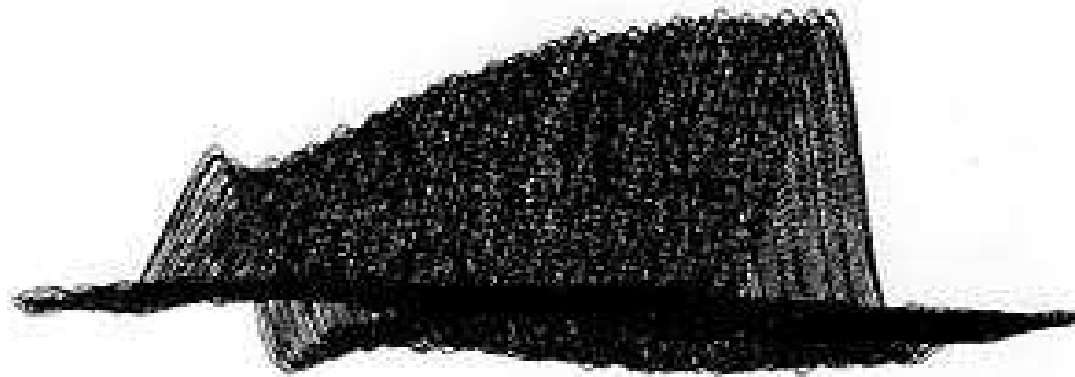
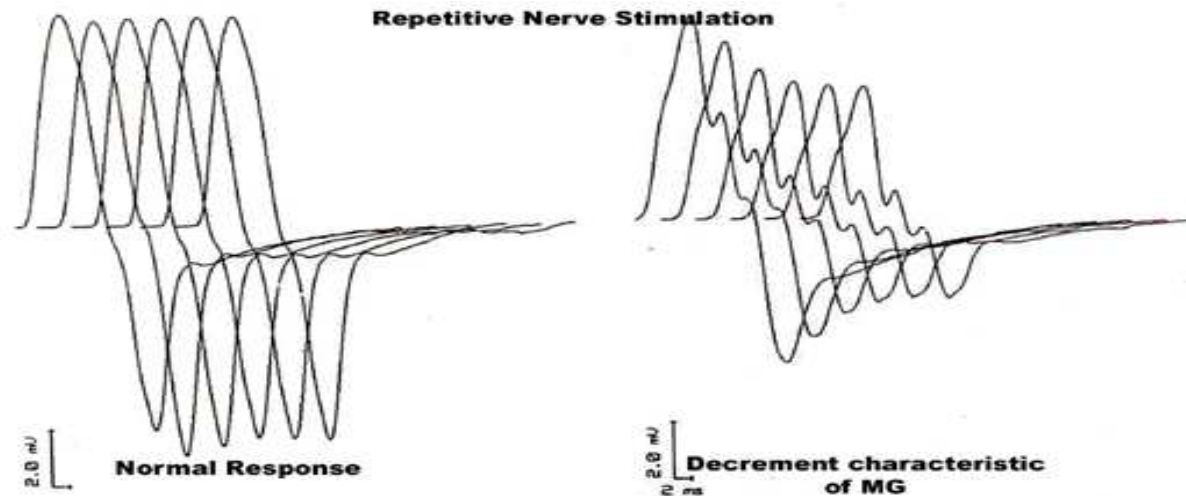


# Diffusione sistemica

- Nota informativa AIFA (2007): la diffusione della tossina in aree distanti dal sito di somministrazione produce sintomi di debolezza muscolare, disfagia e polmonite da aspirazione.
- Le tossine botuliniche agiscono inibendo il rilascio dell'acetilcolina a livello delle giunzioni neuromuscolari o colinergiche e determinano una denervazione parziale reversibile dei muscoli o delle ghiandole eccrine sede d'iniezione. Questa loro azione spiega anche le possibili reazioni avverse segnalate.
- I pazienti che hanno già disturbi neurologici o difficoltà a deglutire hanno un rischio maggiore di presentare tali effetti avversi e pertanto devono essere trattati e controllati con estrema cautela qualora richiedano l'utilizzo di tossina botulinica.
- I pazienti o le persone che li assistono devono essere informati sul possibile rischio di diffusione della tossina e avvisati di rivolgersi immediatamente a un medico in caso di comparsa di disturbi di deglutizione, di linguaggio o di respirazione.



# Stimolazione ripetitiva







# SFEMG – studio trasmissione

## Distant effects of locally injected botulinum toxin: A double-blind study of single fiber EMG changes

Dr., MD Dale J. Lange, Dr., MD, FRCP(C)  
Michael Rubin, MD Paul E. Greene, MD Un J.  
Kang, RN Carol B. Moskowitz, MD Mitchell F.  
Brin, MD Robert E. Lovelace, MD Stanley  
Fahn

Article first published online: 13 OCT 2004

DOI: 10.1002/mus.880140711

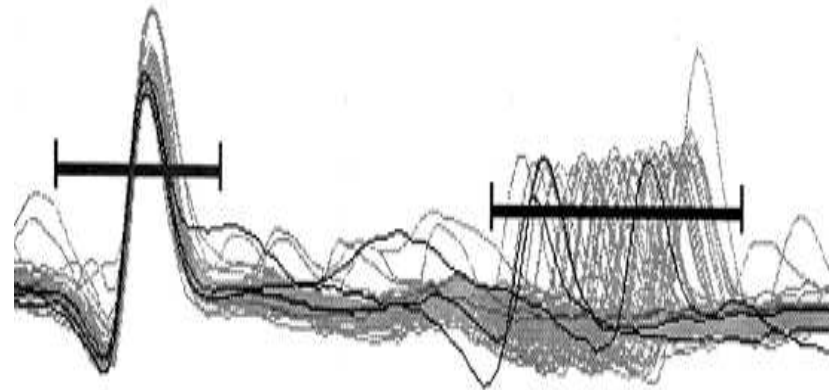
Copyright © 1991 John Wiley & Sons, Inc.

Issue

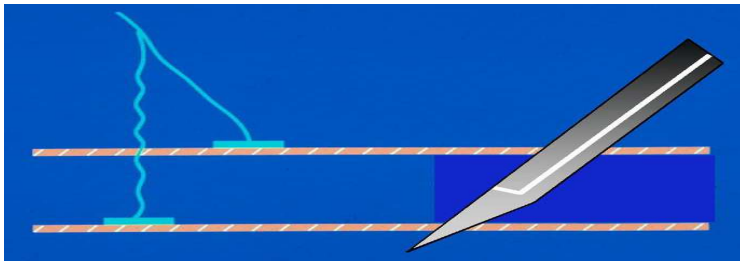


Muscle & Nerve

Volume 14, Issue 7, pages  
672-675, July 1991



## SFEMG - Jitter

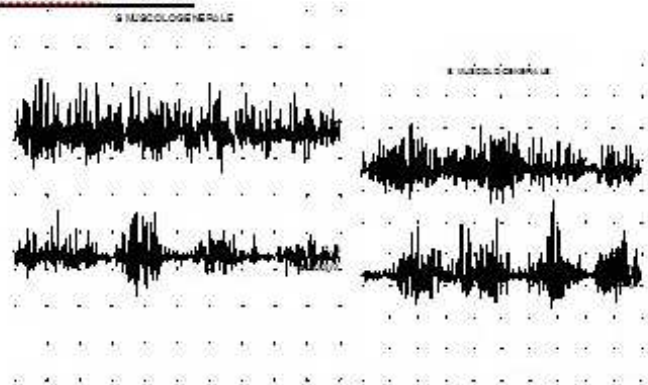


In muscoli distanti dalla sede di iniezione si può evidenziare un allungamento medio del jitter di SFEMG anche senza significativi disturbi.



# Il referto terapeutico

## Needle EMG



**S'inocula mediante guida EMG con ago-cannula monopolare, tossina botulinica tipo A nei seguenti muscoli:**

**Splenio di sinistra: 20 U**

**Splenio di destra: 20 U**

**Long. capitis di sinistra: 10 U**

**Long. capitis di destra: 10 U**

**Totale tossina inoculata: 60 U**

**Controllo ed eventuale ripetizione terapia tra 4-5 mesi, salvo diversa indicazione clinica.**





# Conclusioni

- Tossina farmaco sicuro ed efficace nelle distonie.
- La possibilità di variare molecola e l'uso di una guida strumentale possono ridurre problemi di risposta, diffusione eccessiva, effetti sistemici.
- I test neurofisiologici possono essere utilizzati a scopo diagnostico, terapeutico, per la valutazione della resistenza o degli effetti sistemici.