

Diana Maria Fernandes Pereira

Intoxicação alimentar por *Clostridium botulinum*

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
orientada pela Professora Doutora Sara Domingues e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Junho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Diana Maria Fernandes Pereira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009009010, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 20 de Junho de 2014.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

À Coordenadora do Curso de Ciências Farmacêuticas.

À Orientadora Professora Doutora Sara Domingues,

Pela amabilidade e o apoio.

Aos professores do Curso de Ciências Farmacêuticas.

A todos que direta ou indirectamente contribuíram

Para a realização desta monografia

ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
ACh	Acetilcolina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CDC	“Center of Disease Control”
ELISA	“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”
FDA	“Food and Drug Administration”
FRET	“Fluorescence Resonance Energy Transfer”
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
SGB	Síndrome Guillain-Barré
VS	Vesícula Sinática

Índice

RESUMO	3
ABSTRACT	4
INTRODUÇÃO	5
1 - ASPETOS HISTÓRICOS	6
2 - BOTULISMO	7
2.1 Intoxicação alimentar	7
2.2 Botulismo infantil.....	7
2.3 Botulismo a partir de feridas.....	7
3 - AGENTE ETIOLÓGICO	8
3.1 Transmissão.....	9
4 - PATOGENIA	10
5 - SINTOMATOLOGIA	12
6 - DIAGNÓSTICO	12
6.1 Métodos <i>in vivo</i>	13
6.2 Métodos imunológicos	14
6.2.1 ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”).....	14
6.2.2 Citometria de fluxo	14
6.2.3 Imunoensaio electroquimioluminescente.....	14
6.2.4 Imuno-PCR.....	14
6.2.5 Teste de fluxo lateral.....	15
6.3 Métodos baseados na atividade de endopeptídase	15
6.3.1 Ensaio de fluorescência	15
6.3.2 FRET (“Fluorescence Resonance Energy Transfer”).....	15
6.3.3 Imunodeteção do produto clivado.....	16
7 - TRATAMENTO	16
7.1 Tratamento de suporte.....	16
7.2 Tratamento específico.....	16
7.2.1 Antitoxina.....	16
7.2.2 Terapêuticas alternativas	17
8 - PREVENÇÃO	19
9 - BENEFÍCIOS DA TOXINA BOTULÍNICA.....	20
CONCLUSÃO	22
BIBLIOGRAFIA	23

RESUMO

O botulismo alimentar ocorre devido à ingestão de uma toxina produzida por *Clostridium botulinum*, um bacilo anaeróbio Gram-positivo. É uma doença de extrema gravidade que provoca distúrbios digestivos e neurológicos, podendo levar à morte.

As neurotoxinas botulínicas constituem um grupo de sete (A-G) proteínas distintas, consideradas das toxinas mais tóxicas conhecidas.

Após a sua ingestão, a toxina liga-se aos terminais nervosos colinérgicos, onde, devido à sua atividade como endopeptidase, cliva as proteínas responsáveis pela libertação de acetilcolina para a fenda sináptica. Devido a esta ação a transmissão nervosa fica comprometida.

Um rápido e correto diagnóstico é essencial para um tratamento adequado e eficaz. Atualmente o método padrão de diagnóstico é o ensaio letal em murganhos. É um método que, apesar de ser muito sensível, é demorado, dispendioso e requer o sacrifício de muitos animais, sendo que, por estas razões, novos métodos estão a ser desenvolvidos.

O atual tratamento do botulismo consiste na administração de um anticorpo contra a neurotoxina botulínica. O anticorpo atua apenas extracelularmente, bloqueando a ação da toxina circulante, não neutralizando a toxina que já se encontra em meio intracelular. Novas terapêuticas têm sido estudadas de modo a tornar o tratamento do botulismo mais eficaz e seguro.

Numa outra perspetiva, a toxina botulínica pode ser utilizada em tratamentos terapêuticos e cosméticos relacionados com distúrbios musculares.

Palavras-chave: botulismo, neurotoxina botulínica, diagnóstico, tratamento.

ABSTRACT

The foodborne botulism occurs due to the ingestion of a toxin produced by *Clostridium botulinum*, a Gram-positive anaerobic bacillus. It is characterized as a disease that causes extremely severe neurological and digestive disturbances, which can end up in death.

The botulinum neurotoxins are a group of seven (A-G) distinct proteins, and are considered one of the most toxic known substances to humans.

After ingestion, the toxin binds to the cholinergic nerve terminals, where due to its activity as endopeptidase, cleaves the proteins responsible for the release of acetylcholine into the synaptic cleft. Due to this action nerve transmission is compromised.

A prompt and correct diagnosis is essential for proper and effective treatment. Currently the standard diagnostic method is mouse lethality bioassay. While this assay is sensitive, it is slow, expensive and requires the sacrifice of many animals. For these reasons new methods are being developed.

The current treatment of botulism is the administration of an antibody against botulinum neurotoxin. The antibody acts only extracellularly by blocking the action of circulating toxin, not neutralizing the toxin that is already in the intracellular environment. New therapies have been studied in order to make the treatment more effective and safe.

From another perspective, botulinum toxin can be useful in therapeutic and cosmetic treatments that are associated with muscular disorders.

Keywords: botulism, botulinum neurotoxin, diagnosis, treatment.

INTRODUÇÃO

Algumas doenças, apesar de serem antigas persistem até aos dias de hoje, podendo afetar toda a população. Neste grupo de doenças encontram-se as doenças transmitidas por alimentos.

As doenças transmitidas por alimentos podem ter diversos agentes causadores e diferentes sintomas e características, sendo que o denominador comum é a transmissão de microrganismos (ou as suas toxinas) através dos alimentos. Algumas originam sintomas leves, como diarreia, dores abdominais e febre, que se resolvem em questões de dias, enquanto outras podem ser mais graves, podendo mesmo resultar em morte.

As doenças transmitidas por alimentos dividem-se em infeções e em intoxicações.

As infeções alimentares, também chamadas de gastroenterites, são causadas pela ingestão de alimentos contaminados por microrganismos patogénicos, como é o caso das bactérias. Um exemplo muito conhecido de uma infeção alimentar é a Diarreia do Viajante. O tratamento deste tipo de infeções baseia-se em tratamento sintomático e em antibioterapia em casos mais graves.

As intoxicações alimentares resultam da ingestão de alimentos contaminados por toxinas. Nestes casos, normalmente o tratamento é sintomático, não se recorrendo a antibioterapia uma vez que não é o microrganismo que está presente mas sim a sua toxina. O botulismo é um dos casos mais graves de intoxicação alimentar, podendo conduzir à morte.

Um dos aspetos mais importantes no que se refere às doenças transmitidas por alimentos é a prevenção. É na prevenção que o farmacêutico, enquanto agente de saúde pública, deve ter um papel mais ativo, devendo educar e informar a população sobre as medidas de prevenção deste tipo de doenças.

A presente monografia pretende abordar a informação existente sobre a intoxicação alimentar por *Clostridium botulinum*, desde a sua primeira descrição ao seu uso como agente terapêutico, abordando também os sintomas, o diagnóstico e o tratamento do botulismo.

I - ASPETOS HISTÓRICOS

Nem sempre foi reconhecida a conexão entre o consumo de alimentos e consequente morte por paralisia devido ao botulismo. De facto, há poucos casos de botulismo reportados antes do séc. XVIII^{1,2}.

Descrições precisas do botulismo começaram a aparecer na literatura alemã quando o consumo de salsichas de sangue mal preservadas fez aumentar o número de mortes, tendo surgido o termo “veneno da salsicha”. Em 1815 o professor universitário Johann Autenrieth, depois de estudar os relatórios de várias mortes por intoxicação, listou os sintomas do “envenenamento por salsichas” e responsabilizou as donas de casa pela intoxicação devido à falta de higiene durante a sua preparação^{3,4}.

A primeira descrição completa dos sintomas do botulismo foi feita pelo físico e poeta alemão Justinus Kerner em 1820. Esta incluía a descrição precisa de todos os sintomas musculares e detalhes clínicos de vários distúrbios característicos do botulismo, tais como a midríase, diminuição das secreções e paralisia. Depois de efetuar várias experiências em animais e até em si próprio, Kerner demonstrou que a toxina atua interrompendo a transmissão nervosa, criando três hipóteses: (1) a toxina desenvolve-se em salsichas em condições anaeróbicas, (2) a toxina atua no sistema nervoso sistémico autónomo e motor, e (3) a toxina é letal em pequenas doses. Para além disso, Kerner reconheceu o potencial terapêutico da toxina, que, quando usada em pequenas doses, poderia reduzir ou bloquear a hiperatividade ou hiperexcitabilidade do sistema nervoso autónomo e motor^{3,4}.

O termo botulismo surgiu da palavra latina “*botulus*” que significa salsicha, e não devido à morfologia da bactéria (bacilo) que apenas mais tarde foi descoberta. A bactéria foi isolada e caracterizada, bem como a sua toxina, pelo professor de microbiologia van Ermengem em 1895, após a ocorrência de um surto de botulismo. Van Ermengem chamou-lhe “*Bacillus botulinus*” sendo mais tarde renomeada para “*Clostridium botulinum*”^{3,4,5}.

2 - BOTULISMO

O botulismo é uma doença causada pela neurotoxina botulínica produzida pela bactéria *Clostridium botulinum*.

2.1 Intoxicação alimentar

É a forma clássica de botulismo, mais frequente, e ocorre devido ao consumo de alimentos contaminados com a neurotoxina pré formada. Dependendo da dose ingerida o período de incubação pode variar entre 12 a 72h^{6,7,8}. É sobre o botulismo enquanto intoxicação alimentar que é desenvolvido este trabalho. A taxa de incidência desta doença é baixa, mas a mortalidade é elevada principalmente se o diagnóstico e tratamento apropriado não ocorrer rapidamente. A doença pode ser fatal em 5 a 10% dos casos⁶.

2.2 Botulismo infantil

Afeta principalmente bebês com menos de 1 ano e ocorre devido à ingestão de esporos que após germinarem originam células da bactéria produtoras de toxina. Uma vez que a microflora intestinal destes é pouco desenvolvida, os esporos podem germinar e formar uma cultura produtora da toxina no intestino. Está relacionada principalmente com o grupo I de *C. botulinum* uma vez que a sua temperatura ótima de crescimento e consequente produção de toxina é próxima da temperatura corporal⁷.

As manifestações clínicas normalmente começam por obstipação, seguida de fraqueza muscular e paralisia da boca e garganta, o que dificulta a alimentação⁹. O diagnóstico é feito pela cultura de amostras de fezes e pela detecção da toxina nas mesmas. O principal tratamento é o suporte nutricional e respiratório, não sendo necessário o uso de antitoxina^{7,8,10}.

2.3 Botulismo a partir de feridas

É uma forma rara de botulismo, tendo porém aumentado entre os consumidores de drogas injetáveis, devido ao uso de seringas contaminadas e de heroína impura. Ocorre devido à germinação de esporos e crescimento de *C. botulinum* em abscessos ou feridas profundas que apresentem as condições anaeróbicas necessárias. As manifestações clínicas são semelhantes às da intoxicação alimentar, excluindo os sintomas gastrointestinais. O período

de incubação é em média de 7 dias. O diagnóstico deve ser feito por cultura anaeróbica de amostras e exsudatos das feridas e pesquisa serológica da toxina. O tratamento deve incluir suporte respiratório, remoção cirúrgica da área afetada, antibioterapia e administração de antitoxina^{7,8}.

3 - AGENTE ETIOLÓGICO

Clostridium botulinum é um bacilo grande, Gram-positivo, móvel, que se desenvolve em condições anaeróbicas e é capaz de produzir esporos, que são resistentes ao calor. Pode estar presente no solo e água¹¹.

Os esporos produzidos por *C. botulinum* são dos mais resistentes conhecidos entre os agentes bacterianos, e a sua germinação nos alimentos é promovida por condições anaeróbicas⁷.

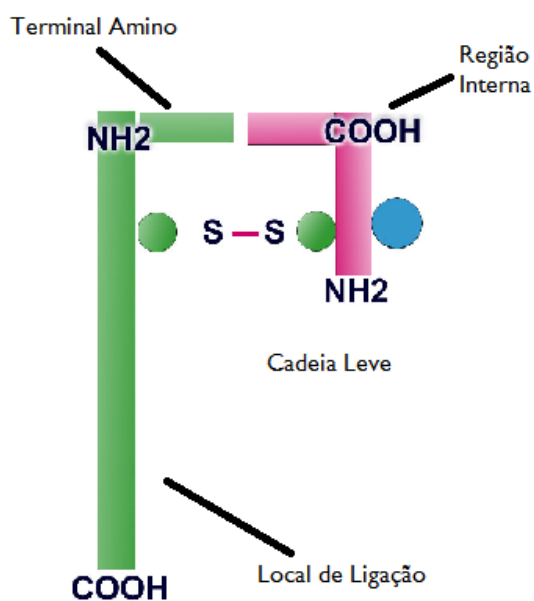
Baseado nas características serológicas das toxinas produzidas, estas podem ser divididas em sete tipos, de A a G, sendo que apenas as do tipo A, B, E e F causam infecção em humanos, enquanto os serotipos C e D estão associados ao botulismo em animais^{12,13}. Consoante as características fisiológicas, *C. botulinum* pode ser dividido em quatro grupos diferentes, sendo que apenas dois, o grupo I e o II, causam doença em humanos. O grupo I produz as toxinas A, B ou F, que são toxinas proteolíticas e que produzem H₂S, causando deste modo a degradação dos alimentos. As bactérias pertencentes ao grupo II produzem as toxinas B, E ou F, que são não-proteolíticas (Tabela I), não levando à deterioração dos alimentos, que podem estar contaminados e não sofrerem alterações no seu aspeto e/ou odor^{7,8}.

Tabela I: Grupos de *Clostridium botulinum*.

Grupo	Tipo de toxina produzida
I	Proteolíticas A, B e F
II	Não proteolíticas B, E e F
III	C e D
IV	G

O efeito semelhante dos sete tipos de toxina resulta da estrutura proteica similar. As toxinas são sintetizadas como uma única cadeia polipeptídica de 150 kDa, sendo libertadas por lise bacteriana. Nesta forma a toxina é inativa, sendo ativada por uma clivagem proteolítica.

tica, originando duas cadeias: uma pesada e uma leve, ligadas entre si por uma ponte dissulfuro (Imagem 1).



Cadeia Pesada
Figura 1: Estrutura da toxina botulínica ativa.
(retirado de
<http://emedicine.medscape.com/article/325451-overview>)

A cadeia pesada pode ser dividida no terminal amino, homóloga entre os diferentes serotipos da toxina, e no terminal carboxílico, região que apresenta maior variabilidade. A cadeia leve atua como uma metaloprotease, apresentando uma região conservada, que consiste no local de ligação ao zinco. A toxina ativa possui três regiões: a região interna da toxina, que reside na cadeia leve; a região composta pelo terminal amino da cadeia pesada; e o local de ligação ao receptor formado pelo terminal carboxílico da cadeia pesada (Figura 1)^{14,15,16}.

A toxina é das mais potentes conhecidas e, ao contrário dos esporos, pode ser desnaturada pela ação do calor (80°C). No entanto, é resistente à ação do ácido estomacal e à digestão pelas enzimas do trato gastrointestinal⁸.

3.1 Transmissão

O crescimento das bactérias pertencentes à espécie *C. botulinum* e a formação da toxina botulínica ocorre em produtos com baixo teor de oxigênio, em combinação com certos parâmetros de temperatura de armazenamento e conservação, o que acontece mais frequentemente em alimentos mal conservados e em conservas de alimentos caseiras.

A toxina botulínica tem sido encontrada nos mais diversos alimentos, sendo os mais frequentes os legumes em conservas, como feijão verde, espinafres e cogumelos, em peixes, incluindo o atum enlatado e peixes defumados, e em produtos de carne, como o presunto e salsichas⁶.

Também se verifica, mas com menor frequência, a contaminação pela toxina de produtos alimentares preparados industrialmente. Isto acontece quando são acondicionados em embalagens a vácuo, sem oxigênio, sem o tratamento adequado, favorecendo o desenvolvimento da bactéria, e conseqüentemente a produção da toxina⁶.

4 - PATOGENIA

Após a ingestão de alimentos contaminados, a toxina atinge primeiro o sistema linfático e só depois passa para a corrente sanguínea. É através da corrente sanguínea que consegue chegar ao seu alvo, os terminais nervosos colinérgicos periféricos, onde vai bloquear a liberação de acetilcolina (ACh), conduzindo assim a fraqueza muscular e paralisia⁷.

A ligação ao terminal nervoso ocorre devido à elevada afinidade entre o terminal carboxílico da cadeia pesada da toxina e gangliósidos específicos do recetor. Para além do reconhecimento por parte da neurotoxina do gangliósido, para que ocorra ligação e internalização da toxina, é necessário que haja uma segunda interação com outro recetor, composto por proteínas específicas associadas à membrana pré-sináptica e às vesículas sinápticas (VS)^{14,17}. Este processo ocorre pela via da reciclagem das VS, em que há libertação de ACh devido à fusão de uma VS, e formação de uma nova VS. É durante este processo que as proteínas que servem como um segundo recetor para as neurotoxinas, e que normalmente estão localizadas no interior da vesícula, ficam expostas à neurotoxina^{14,17}.

Após a ligação ocorre a internalização da neurotoxina, ficando esta dentro da vesícula endocitária. Uma vez no lúmen vesicular, a cadeia leve tem de atravessar a barreira hidrofóbica da membrana vesicular para alcançar o citoplasma do neurónio (Figura 2)¹⁸. Devido à presença da bomba H^+ /ATPase ocorre a acidificação do lúmen vesicular, passando a toxina de uma conformação neutra solúvel em água para uma estrutura ácida, caracterizada pela exposição superficial de zonas hidrofóbicas. Deste modo, é possível a penetração das cadeias pesada e leve da toxina no núcleo de hidrocarbonetos da bicamada lipídica, formando um canal iónico¹⁸. A cadeia leve, a pH baixo, desenrola-se e atravessa o poro transmembranar formado pela cadeia pesada. Após a exposição ao pH neutro do citoplasma do neurónio, a cadeia leve volta a enrolar-se e é libertada da vesícula através da redução da ponte dissulfureto entre as duas cadeias¹⁸.

No citoplasma, a cadeia leve cliva as proteínas que formam o complexo de fusão sináptica, as SNARE¹⁹. Apesar da grande semelhança estrutural existente entre os diferentes tipos de toxinas, cada toxina tem como alvo diferentes proteínas do complexo SNARE²⁰, sendo os locais de clivagem específicos para cada tipo de toxina (Tabela 2)^{16,21}.

Tabela 2: Substratos das toxinas botulínicas.

Neurotoxina	Substrato alvo
A	SNAP25
B, D, F e G	VAMP
C	SNAP25 Sintaxina
E	SNAP25

Ao clivar as SNAREs, e tendo em conta o seu papel, as toxinas impedem o acoplamento da vesícula com ACh ao terminal nervoso, inibindo assim a libertação de ACh no terminal pré-sináptico e consequente fraqueza muscular e paralisia^{22,23}.

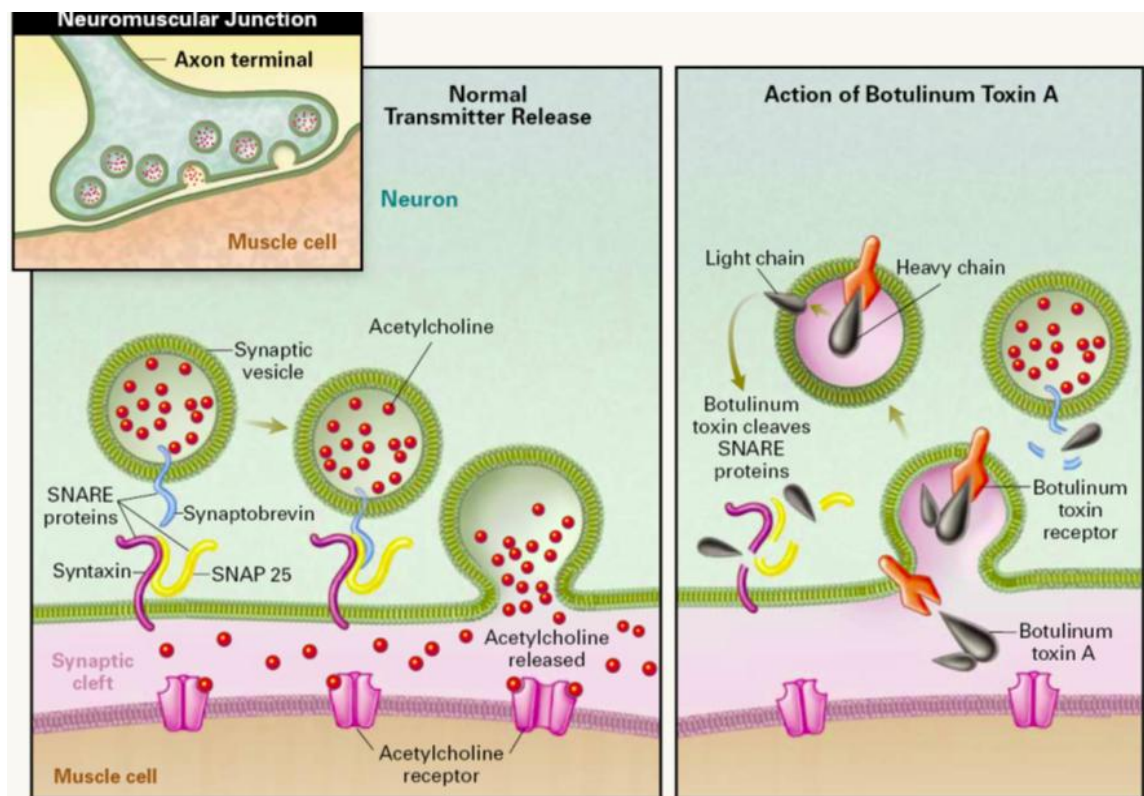


Figura 2: Ação da neurotoxina botulínica no terminal nervoso. retirado da referência nº 51

5 - SINTOMATOLOGIA

Em geral o período médio de incubação são dois dias. Os primeiros sintomas ocorrem normalmente entre 18 a 36 horas após a ingestão de alimentos contaminados, e são principalmente sintomas gastrointestinais que podem incluir diarreia, náusea, vômitos ou dor abdominal. Estes sintomas são seguidos pelo aparecimento gradual de sintomas neurológicos⁸.

Os sintomas neurológicos iniciais podem incluir boca seca, disfonia, disfagia e incapacidade de produzir suor ou lágrimas. Em cerca de 90% dos casos também se observam sintomas oculares, que consistem em visão turva, diplopia e ptose²⁴.

A estes sintomas associados às anomalias dos nervos cranianos segue-se um padrão simétrico descendente de fraqueza e paralisia. Primeiro são afetadas as extremidades superiores e os músculos respiratórios, surgindo disartria, dispneia e fraqueza muscular periférica e por fim são afetadas as extremidades inferiores^{24,25}. Durante o período paralítico, há ausência de anomalias sensoriais, de febre e de alteração da consciência²⁵.

Apesar dos sintomas serem semelhante para os diferentes serotipos de toxina, os doentes afetados com a toxina A tendem a ser casos mais graves e fatais.

A duração dos sintomas também depende do tipo de toxina que está a causar a intoxicação, sendo a toxina botulínica tipo A a mais potente e a que apresenta uma maior duração da paralisia. A persistência dos sintomas depende: do tempo que as proteínas SNARE clivadas permanecem no citoplasma; do tempo em que as neurotoxinas botulínicas continuam com capacidade de clivar novas proteínas SNARE; da capacidade dos terminais pré-sinápticos se remodelarem de modo a sobrepôr esta situação; e da estabilidade das proteínas clivadas. As proteínas clivadas são também diferentes consoante o serotipo das toxinas. Alguns produtos resultantes da clivagem apresentam maior estabilidade que outros, sendo que os de maior estabilidade permanecem mais tempo no citoplasma¹⁹.

6 – DIAGNÓSTICO

Dada a gravidade da evolução dos sintomas, um diagnóstico rápido e correto é essencial para o sucesso do tratamento e, conseqüentemente, uma melhor taxa de sobrevivência e recuperação²⁶.

O diagnóstico assenta principalmente na história do paciente, onde a ingestão de alimentos suspeitos deve ser rigorosamente levantada e analisada, e nas manifestações clínicas²⁷. No entanto, devido à semelhança dos sintomas com outras síndromes graves, como por exemplo a Miastenia gravis e o Síndrome Guillain-Barré (SGB), a suspeita de botulismo deve ser confirmada através de testes laboratoriais. Um exame ao líquido cefalorraquidiano com o nível de proteínas normal descarta a possibilidade de SGB; a hipótese de miastenia gravis pode ser afastada/confirmada através do Teste de Tensilon, uma vez que este é fortemente positivo para a miastenia gravis e negativo no caso do botulismo^{25,28}.

O método standard de diagnóstico do botulismo assenta na deteção da toxina em amostras biológicas, como soro, fezes, secreções gástricas, ou em comida.

O isolamento da bactéria, que confirma o diagnóstico, é feito em amostras dos alimentos ingeridos, quando estas são possíveis, e através de métodos de cultura que devem ser previamente desoxigenados, de modo a obter um ambiente anaeróbico, uma vez que *C. botulinum* é estritamente anaeróbico⁸.

A deteção convencional e isolamento de *C. botulinum* realiza-se através de uma cultura em meio líquido e subsequente deteção da toxina no sobrenadante da cultura num bioensaio em murganhos²⁸. Devido às diversas desvantagens deste bioensaio novos métodos surgiram, continuando no entanto este a ser o procedimento padrão.

6.1 Métodos *in vivo*

Os métodos *in vivo* baseiam-se em ensaios letais e não letais em murganhos.

Os ensaios de letalidade baseiam-se na injeção intraperitoneal de amostras diluídas da toxina em murganhos e subsequente observação do aparecimento dos sintomas de botulismo, com consequente morte dos animais. Os sintomas a observar incluem fraqueza muscular e respiração ofegante seguida de falha respiratória, normalmente nas primeiras 48 horas após a injeção. O serotipo da neurotoxina botulínica é determinado através da sua neutralização com as antitoxinas específicas. No final do ensaio, o murganho ao qual foi injetada a antitoxina correta sobrevive, enquanto os outros morrem.

Este ensaio é muito trabalhoso, demorado e dispendioso, para além de serem necessários muitos animais o que levanta grandes questões éticas. É no entanto um teste muito sensível e específico e que deteta a forma ativa e funcional da neurotoxina botulínica²².

Os ensaios não letais resultam duma variação do método anterior, sendo o endpoint a paralisia muscular²⁹.

6.2 Métodos imunológicos

Os métodos imunológicos baseiam-se na ligação do anticorpo (Ac) à toxina. São técnicas mais simples e rápidas, quer na execução como na interpretação/leitura dos resultados. No entanto não permitem diferenciar as formas ativa e inativa da neurotoxina botulínica.

6.2.1 ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”)

Neste tipo de testes há ligação entre o Ac específico da toxina e a toxina, quando presente na amostra em estudo. Após esta ligação, é adicionado um anticorpo de detecção conjugado com uma enzima-repórter, que se liga especificamente à toxina imobilizada e que converte um substrato incolor num produto com cor, sendo este quantificado por métodos espectroscópicos²².

Este método demora cerca de 5 a 6 horas, sendo mais rápido do que o ensaio letal em murganhos.

Devido aos elevados custos dos testes de ELISA, métodos derivados deste foram desenvolvidos e podem ser usados em alternativa, como é o caso do “peptide capture-based ELISAs”²².

6.2.2 Citometria de fluxo

Baseia-se no mesmo princípio do ELISA, mas é mais fácil de automatizar, sendo por isso menos trabalhoso, é mais rápido e consegue detetar a presença de múltiplas toxinas num único tubo de teste²².

6.2.3 Imunoensaio electroquimioluminescente

Também se baseia na interação entre o Ac, a toxina e o Ac repórter, sendo que este último tem um complexo que se torna luminescente na presença de um potencial elétrico. Deste modo a aplicação de um potencial elétrico aumenta o sinal de detecção²².

6.2.4 Imuno-PCR

É uma variação do método ELISA que recorre ao PCR (“Polymerase Chain Reaction”) para ampliação exponencial do sinal. Neste caso o Ac repórter é conjugado com ADN usado como marcador, sendo este depois ampliado por uma técnica de PCR. Outra variação

deste método é a lipossoma-PCR em que o ADN repórter é encapsulado em lipossomas que são marcados exteriormente por gangliósidos (alvo da toxina); estes capturam o complexo Ac-toxina, havendo depois rutura do lipossoma e ampliação do ADN libertado por PCR^{22,29,30,31}.

6.2.5 Teste de fluxo lateral

É um ensaio imunocromático baseado também na deteção da interação Ac-toxina. Tem como vantagem ser um método rápido, barato, fácil de usar, sem necessidade de usar equipamentos e que geram um sinal visual de fácil leitura²².

6.3 Métodos baseados na atividade de endopeptidase

Estes métodos baseiam-se na atividade de endopeptidase da toxina botulínica. Estes testes detetam apenas a toxina na forma ativa, assemelhando-se ao ensaio letal em murganhos. A concentração da toxina é proporcional à concentração do produto obtido nestes métodos²².

6.3.1 Ensaio de fluorescência

A atividade como endopeptidase é detetada pela mudança de fluorescência causada pela clivagem dos diferentes substratos específicos de cada neurotoxina botulínica marcados com um fluoróforo. Este método permite determinar o serotipo da toxina²².

6.3.2 FRET (“Fluorescence Resonance Energy Transfer”)

Nos ensaios de FRET é utilizado um oligopeptídeo semelhante ao substrato natural da toxina, que transporta dois marcadores que flanqueiam o local de clivagem. Um dos marcadores é um supressor de fluorescência e o outro é um dador; quando próximos um suprime a fluorescência do outro e não há sinal, quando o substrato é clivado, há emissão de fluorescência²².

6.3.3 Imunodeteção do produto clivado

Na imunodeteção do produto clivado recorre-se ao uso de um peptídeo quimicamente sintetizado, semelhante às proteínas SNARE. O produto resultante da atividade da toxina é detetado através da reação do mesmo com um Ac específico²².

7 - TRATAMENTO

O tratamento de casos de botulismo baseia-se essencialmente em dois tipos: o tratamento de suporte e o tratamento específico.

7.1 Tratamento de suporte

A ligação da toxina aos neurónios não é reversível, no entanto o axónio consegue gerar novos terminais. Para que tenha o tempo necessário para gerar novos terminais e para que não morra de paragem respiratória, o doente é submetido a um tratamento de suporte que consiste na ventilação mecânica¹⁴.

7.2 Tratamento específico

A terapêutica contra o botulismo pode atuar a três níveis, relacionados com o modo de ação da toxina: ligação ao recetor, endocitose e na sua atividade como endopeptidase.

Atualmente o único tratamento disponível é a terapia com a antitoxina. No entanto mantem-se a pesquisa por novos alvos e moléculas, com a finalidade não só de neutralizar a toxina como também de reverter a sua ação e os seus efeitos³². Para além do uso da antitoxina, o uso de enemas ou a indução do vômito pode permitir eliminar comida contaminada ainda presente no trato gastro-intestinal³³.

7.2.1 Antitoxina

A utilização da antitoxina tem como objetivo neutralizar a toxina botulínica, sendo a antitoxina equina trivalente, que deriva do cavalo e neutraliza as toxinas do tipo A, B e E, a mais utilizada. Recentemente nos Estados Unidos da América, a FDA (“Food and Drug Administration”) aprovou o uso de uma antitoxina equina heptavalente (Tabela 3) que atua sobre todos os serotipos da toxina botulínica^{32,34,35}.

Apesar de ser a única terapêutica aprovada, o uso de antitoxina apresenta algumas limitações. Por exemplo, a antitoxina apenas neutraliza a toxina circulante, inibindo a sua ligação ao recetor do neurónio, mas não atua diretamente na sua atividade proteolítica, ou seja, não tem qualquer efeito sobre a toxina que já se encontra dentro das células. Devido a esta limitação e para que o tratamento seja o mais eficaz possível é necessário que a administração da antitoxina ocorra nas primeiras horas da doença, de modo a evitar que a paralisia ocorra em grande extensão^{32,35,36}.

Outra das limitações reside no facto da antitoxina ser derivada do cavalo. Deste modo pode originar reações de hipersensibilidade e, em casos mais graves, reações anafiláticas. De modo a reduzir esta possibilidade, antes da sua administração devem ser realizados testes de sensibilidade dermatológica. Como alternativa existem já estudos referentes à produção de uma antitoxina humana, cujo objetivo será reduzir as reações adversas³².

Tabela 3: Tipos de antitoxinas disponíveis.

Preparação	Serótipo da toxina	Estado
Antitoxina equina trivalente	A, B e E	Aprovada pela FDA
Antitoxina equina bivalente	A e B	Aprovada pela FDA
Imunoglobulina humana	A, B, C, D e E	Aprovada pela FDA
Antitoxina equina heptavalente	A-G	Aprovada pela FDA
Antitoxina equina monovalente	E	Investigação
Antitoxina recombinante	A	Investigação

7.2.2 Terapêuticas alternativas

Atualmente o único tratamento disponível, depois de os neurónios já estarem intoxicados, reside em cuidados intensivos e ventilação mecânica. Este tratamento é possível e exequível em casos isolados de botulismo, porém seria impraticável para o tratamento de uma grande população, como seria o caso de um ataque bioterrorista. O uso da toxina num ataque bioterrorista permanece iminente, e por essa razão o CDC (“Center of Disease Control”) classificou a toxina como agente de categoria A, colocando-a entre os seis agentes de maior prioridade³⁷. O seu uso num ataque bioterrorista, pode causar a morte massiva de pessoas, principalmente se um tratamento rápido e eficiente não estiver disponível. Deste

modo, e não só para responder a um possível ataque bioterrorista, mas também para responder às necessidades de uma melhor terapêutica algumas alternativas têm sido propostas e estudadas para o tratamento do botulismo.

Anticorpo de domínio único

O anticorpo de domínio único é constituído apenas pela cadeia pesada do anticorpo convencional, possui elevada estabilidade, tamanho pequeno e elevada capacidade de penetração nos tecidos, o que lhe confere a vantagem de conseguir penetrar no neurónio e deste modo atuar na toxina presente no interior das células^{16,32,37-40}.

Aminopiridinas

A 3,4-diaminopiridina, devido à sua ação colinérgica, facilita a recuperação do potencial de ação neuronal, apresentando vantagens na reversão da paralisia, especialmente quando não foi possível um tratamento precoce com a antitoxina^{37,41-45}.

Inibidores da acidificação da vesícula

Estes inibidores atuam ao nível da acidificação da vesícula, passo essencial para a translocação da cadeia leve para o seu local de ação. Pertencem a este grupo moléculas como o cloreto de amónio e o cloridrato de metilamina. A bafilomicina atua através do mesmo princípio, ao inibir a bomba H⁺/ATPase³⁷.

Inibidores não competitivos

Os inibidores não competitivos, como a lomofungina e o ácido chicórico, ligam-se a locais que não o sítio ativo da toxina, permitindo o seu uso em conjunto com inibidores competitivos, como por exemplo o hidroxamato 2,4-diclorocinâmico, apresentando assim um efeito sinérgico⁴⁵.

8 - PREVENÇÃO

A prevenção do botulismo baseia-se principalmente na utilização de procedimentos capazes de evitar a germinação de esporos, a multiplicação do organismo e consequente produção da toxina nos alimentos.

No âmbito industrial, independentemente do tratamento com calor, com o objetivo de destruição da bactéria, esporos e toxinas do *C. botulinum*, devem ser adotadas determinadas normas destinadas a criar um meio que não permita o crescimento posterior da bactéria ou a formação da toxina.

A higiene dos estabelecimentos industriais e de processamento é importante, de modo a que estes não sejam uma fonte de contaminação.

O tratamento dos alimentos passa pelo seu processamento a altas temperaturas, e nos alimentos em que, devido às suas características, não é possível recorrer a temperaturas elevadas, deve haver um processamento cuidadoso, com lavagem, desinfecção e acidificação adequadas. Além destas medidas, e no caso de produtos de origem animal, a adição de nitrato e nitrito (conservantes), associada ou não ao cloreto de sódio, e temperaturas adequadas de refrigeração, são medidas que inibem o desenvolvimento da bactéria impedindo, desta forma, a produção da toxina⁴⁶.

O consumidor nunca deve comprar enlatados danificados e deve aquecer as conservas e sobras de comida, uma vez que a temperatura elevada destrói a toxina³³.

As pessoas que fazem conservas em casa devem ser orientadas sobre o tempo apropriado, pressão e temperaturas requeridas para destruir os esporos e sobre a efetividade da fervura das latas ou vidros para destruir a toxina botulínica. Em conservas caseiras de vegetais, a destruição dos esporos pode ser alcançada através do aumento da pressão durante o cozimento, que permite atingir temperaturas seguras, acima da temperatura de fervura (> 100°C). Já a toxina botulínica é termolábil e pode ser inativada pelo aquecimento á 80°C por 10 minutos³³. Assim, o risco do botulismo por alimentos caseiros, enlatados ou em vidro, pode ser reduzido pelo aquecimento imediatamente antes do consumo. A utilização do sal como conservante é também benéfica, assim como a utilização de um ácido que propicie um pH inferior a 4,5, para reduzir a possibilidade da produção da toxina³³.

9 - BENEFÍCIOS DA TOXINA BOTULÍNICA

Apesar da toxina botulínica ser uma das mais tóxicas e letais, também possui aplicações em vários tratamentos médicos e estéticos relacionados com distúrbios musculares.

Ao bloquear a libertação de ACh para a fenda sináptica, a toxina permite um alívio sintomático em vários transtornos espasmódicos e de distonia, que são caracterizados por involuntárias e intermitentes contracturas de músculos específicos. Os fármacos usados para o tratamento deste tipo de distúrbios, na sua dose terapêutica, debilitam não só os músculos alvo como também todos os outros, não sendo portanto um tratamento localizado⁷. Pelo contrário, o grande valor terapêutico da toxina está relacionado com o facto de ser altamente seletiva, o que diminui a probabilidade de efeitos colaterais adversos. Para além disso, tem uma longa duração de ação, que pode ir desde vários meses até mais de um ano, e a dose da toxina pode ser ajustada individualmente para cada doente de modo a garantir o máximo dos benefícios⁸.

De um modo geral, a toxina foi adaptada para uso terapêutico em quatro áreas clínicas: oftalmologia, neurologia, otorrinolaringologia e gastroenterologia⁴⁷⁻⁴⁹.

Foi inicialmente aprovado pela FDA em 1989 para o tratamento do estrabismo, blefaroespasma (fecho involuntário e repetitivo da pálpebra) e espasmo hemifacial.

Em 2000 foi aprovado o Myobloc®, derivado da neurotoxina botulínica tipo B, para o tratamento de doentes com distonia cervical. O seu uso tem como objetivo reduzir a severidade das posições anormais da cabeça, características da doença, e reduzir as dores no pescoço associadas a essa posição. Na União Europeia está disponível sob o nome comercial Neurobloc®⁵⁰.

Mais recentemente foi aprovado o seu uso para o tratamento da enxaqueca crónica e bexiga hiperativa. Nos dias de hoje é já utilizada em diversas patologias como bruxismo, hipersalivação, distonia oromandibular e espasmos pós-AVC, entre outros⁴⁷⁻⁴⁹.

A sua eficácia comprovada no tratamento de distonias e outros distúrbios relacionados com atividade muscular involuntária, associado ao seu perfil de segurança levou ao seu uso *off-label* numa variedade de distúrbios.

Porém a sua aplicação mais conhecida não é terapêutica mas sim cosmética. A toxina botulínica, mais conhecida como Botox® (nome comercial da toxina), é muito utilizada para fins cosméticos no combate e atenuação de rugas, uma vez que inibe a contração muscular, com conseqüente relaxamento muscular e portanto diminuição das rugas^{35,47}.

Tabela 4: Indicações atuais da neurotoxina botulínica.

Nome comercial e substância ativa	Uso aprovado pela FDA
BOTOX® OnabotulinumtoxinA	Estrabismo, blefaroespasma e espasmo hemifacial (1989); Distonia cervical (2000); Uso cosmético (2000); Hiperhidrose axilar (2001); Enxaqueca (2010); Bexiga hiperativa (2011).
Dysport® AbobotulinumtoxinA	Distonia cervical (2009); Uso cosmético (2009).
Xeomin® IncobotulinumtoxinA	Distonia cervical e blefaroespasma (2010); Uso cosmético (2011).
Myobloc® /Neurobloc® RimabotulinumtoxinB	Distonia cervical e blefaroespasma (2010); Uso cosmético (2011).

CONCLUSÃO

O botulismo é uma intoxicação alimentar que pode conduzir à morte por paralisia dos músculos respiratórios. O seu diagnóstico deve ser feito o mais atempadamente possível para que o tratamento seja o mais correto e eficaz.

O método de diagnóstico de referência não é o mais apropriado em termos de rapidez. Para além de ser bastante moroso, requer a utilização de muitos animais, o que levanta sérias questões éticas. Os avanços da ciência têm permitido uma melhor compreensão do modo de ação da neurotoxina botúlica e assim desenvolver novos métodos de diagnóstico. Apesar destes desenvolvimentos, ainda não foi aprovado nenhum método de diagnóstico com a mesma sensibilidade e especificidade do método de referência.

O mesmo se sucede com o tratamento disponível, que apesar de ser o único aprovado, apresenta algumas reações adversas e apenas é eficaz quando administrado precocemente, pois apenas atua sobre a toxina em circulação. De modo a combater estas lacunas da terapêutica, novos alvos e moléculas têm sido estudados com o objetivo de inibir a ação da toxina, quer circulante como já internalizada nos neurónios, e de inverter/tratar a sintomatologia, mais precisamente a paralisia muscular.

É de esperar que num futuro próximo sejam aprovados quer novos métodos de diagnóstico, mais práticos, rápidos e eficazes, como novos tratamentos, que sejam mais eficazes e seguros no combate a esta doença.

Apesar da elevada letalidade da toxina, e mediante os avanços da ciência, é possível a sua utilização para fins terapêuticos e cosméticos, sendo hoje utilizada para o tratamento de vários distúrbios musculares.

Para mim, como aluna do Curso de Ciências Farmacêuticas, a execução desta monografia foi gratificante, tendo em conta todos os conhecimentos e experiências que pude adquirir com pesquisa bibliográfica e atualização de conhecimentos.

BIBLIOGRAFIA

1. Erbguth F, (1998) Botulinum toxin, a historical note. *Lancet* 351:1280.
2. Erbguth F, (2004) Historical notes on botulism, *Clostridium botulinum*, botulinum toxin, and the idea of the therapeutic use of the toxin. *Movement Disorders* 19:S2-6.
3. Erbguth F, (2007) From poison to remedy: the chequered history of botulinum toxin. *Journal Neural Transmission* 54:256-264.
4. Erbguth F, Naumann M, (1999) Historical aspects of botulinum toxin Justinus Kerner and the “sausage poison”. *Neurology* 53:1850-185.
5. Devriese PP, (1999) On the discovery of *Clostridium botulinum*. *Journal of the History of Neurosciences* 8:43-50.
6. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs270/en/ (visto a 15 de Março de 2014).
7. Mohanty S, Dhawan B, Chaudhry R, (2001) Botulism: an update. *Indian Journal of Medical Microbiology* 19:35-43.
8. Lindström M, Korkeala H, (2006) Laboratory diagnostics of botulism. *Clinical Microbiology Reviews* 19:298.
9. Fenicia L, Anniballi F, (2009) Infant botulism. *Annali dell’Istituto Superiore di Sanità*. 45:134-146.
10. Cox N, Hinkle R, (2002) Infant botulism. *Family Physician* 65:1388-1393.
11. Baumgardner D, (2012) Soil-related bacterial and fungal infections. *Journal of the American Board of the Family Medicine* 25:734-744.
12. Goonetilleke A, Harris J B, (2004) Clostridial neurotoxins. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 75:35-39.
13. www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Clostridium_Botulinum-Neurotoxins_Produced.pdf (visto a 15 de Março de 2014).
14. Binz T, Sikorra S, Mahrhold S, (2010) Clostridial neurotoxins: mechanism of SNARE cleavage and outlook on potential substrate specificity reengineering. *Toxins* 2:665-682.
15. Larry D, (1993) Botulinum toxin from poison to medicine. *West Journal of Medicine* 158:25-29.
16. Bing L, Norton P, Butler M, Burnett J, Moir D, Bowlin T, (2011) Small molecule inhibitors as countermeasures for *botulinum* neurotoxin intoxication. *Molecules* 16:202-220.

17. Zhongxing C, Morris G, Rodriguez R, Shukla A, (2012) Emerging opportunities of *botulinum* neurotoxins. *Toxins* 4:1196-1222.
18. Pellizzari R, Rossetto O, Schiavo G, Montecucco C, (1999) Tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses. *Royal Society of London Biological Sciences* 354:259-268.
19. Shoemaker C, Oyler G, (2013) Persistence of botulinum neurotoxin inactivation of nerve function. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 364:179-196.
20. Lebeda F, Cer R, Mudunuri U, Stephens R, Singh B, Adler M, (2010) The zinc-dependent protease activity of the botulinum neurotoxins. *Toxins* 2:978-997.
21. Coffield J, Bakry N, Carlson J, Gomella L, Simpson L, (1997) *In vitro* characterization of botulinum toxin types A, C and D action on human tissues: combined electrophysiologic, pharmacologic and molecular biologic approaches. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 280:1489-1498.
22. Capek P, Dickerson T, (2010) Sensing the deadliest toxin: technologies for *Botulinum* neurotoxin detection. *Toxins* 2:24-52.
23. Shoemaker C, Oyler G, (2013) Persistence of botulinum neurotoxin inactivation of nerve function. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 364:179-196.
24. Wells C, Wilkins T, *Medical Microbiology* 4th ed Chapter 18: *Clostridia*: Spore forming anaerobic Bacilli. Editora Baron.
25. Sobel J, (2005) Botulism. *Clinical Infectious Diseases* 41:1167-11.
26. Forssa N, Ramstadb R, et al (2012) Difficulties in diagnosing food-borne botulism. *Case Reports in Neurology* 4:113-115.
27. Ministério da Saúde Brasil, (2006) Manual integrado de vigilância epidemiológica do botulismo. Editora MS.
28. Chaudhry R, (2011) Botulism a diagnostic challenge. *Indian Journal of Medical Research* 134:10-12.
29. Wilder K, Lúquez C, Adler M, Dykes J, Coleman J, Maslanka S, (2011) An alternative *in vivo* method to refine the mouse bioassay for botulinum toxin detection. *Journal of Comparative Medicine* 61:235-242.
30. Zhanga Y, Loub J, Jenkoa K, Marks J, Varnuma S, (2012) Simultaneous and sensitive detection of six serotypes of botulinum neurotoxin using enzyme-linked immunosorbent assay-based protein antibody microarrays. *Analytical Biochemistry* 430:185-192.
31. Hill B, Skerry J, Smith T, Arnon S, Douek D, (2010) Universal and specific quantitative detection of *botulinum* neurotoxin genes. *BMC Microbiology* 10:267.

32. Thanongsaksrikul J, Chaicumpa W, (2011) Botulinum neurotoxins and botulism: A novel therapeutic approach. *Toxins* 3:469-488.
33. www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/botulism/ (visto a 20 de Maio de 2014).
34. Henkel J, Tepp W, Przedpelski A, Fritz R, Johnson E, Barbieril J, (2011) Subunit vaccine efficacy against botulinum neurotoxin subtypes. *Vaccine* 29:7688-7695.
35. Kumar R, Kumar M, Singh P, Gupta P, (2010) Botulinum toxin: bioweapon and magic drug. *Indian Journal of Medical Research* 132:489-503.
36. Mazuet C, Dano J, Popoff M, Creminon C, Volland H, (2010) Characterization of botulinum neurotoxin type A neutralizing monoclonal antibodies and influence of their half-lives on therapeutic activity. *Public Library of Science*.
37. Zakhari J, Eubanks L, Salzameda N, (2010) Identification of a natural product antagonist against the botulinum neurotoxin light chain protease. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 1:268-272.
38. Mukherjee J, Tremblay J, Leysath C, Ofori K, Baldwin K, et al, (2012) A novel strategy for development of recombinant antitoxin therapeutics tested in a mouse botulism model. *PLoS One* 7:e29941.
39. Arimitsu H, Lee J, Sakaguchi Y, Hayakawa Y, et al, (2004) Vaccination with recombinant whole heavy chain fragments of *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxins. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11:496-502.
40. Ebrahimi F, Rasaei M, Mousavi S, Babaeipour V, (2010) Production and characterization of a recombinant chimeric antigen consisting botulinum neurotoxin serotypes A, B and E binding subdomains. *The Journal of Toxicological Sciences* 35:9-19.
41. Kalia J, Swartz K, (2011) Elucidating the molecular basis of action of a classic drug: Guanidine compounds as inhibitors of voltage-gated potassium channels. *Molecular Pharmacology* 80:1085-1095.
42. Zhang P, Ray R, Singh B, Li D, Adler M, Ray P, (2009) An efficient drug delivery vehicle for botulism countermeasure. *BMC Pharmacology* 9:12.
43. Thanongsaksrikul J, Srimanote P, Aneewatch S, Choowongkamon K, Tapchaisri P, Makino S, Kurazono H, Chaicumpa W, (2010) A V_H that neutralizes the zinc metalloproteinase activity of botulinum neurotoxin type A. *Journal of Biological Chemistry* 285:9657-9666.
44. Mayorov A, Willis B, Borgia J, et al, (2010) Symptomatic relief of botulinum neurotoxin/A intoxication with aminopyridines - A new twist on an old molecule. *ACS Chemical Biology* 5:1183-1191.

45. Zakharia J, Kinoyamaa I, Hixonc M, Molaa A, Globischa D, Jandaa K, (2011) Formulating a new basis for the treatment against botulinum neurotoxin intoxication: 3,4-diaminopyridine prodrug design and characterization. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 19:6203-6209.
46. Ramos F, Cereser N, et al, (2008) Botulismo de origem alimentar. *Ciência Rural* 38:280-287.
47. Shilpa P, Kaul R, Sultana N, Bhat S, (2014) Botulinum toxin: the midas touch. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine* 5:8-14.
48. Intiso D, (2011) Therapeutic Use of botulinum toxin in neurorehabilitation. *Journal of Toxicology* 2012:12-24.
49. Persaud R, Garas G, Silva S, Stamatoglou C, Chatrath P, Patel K, (2013) An evidence-based review of botulinum toxin (Botox) applications in non-cosmetic head and neck conditions. *Journal of Royal Society of Medicine Short Reports* 4:10.
50. Chen S, (2012) Clinical uses of botulinum neurotoxins: current indications, limitations and future developments. *Toxins* 4:913-939.
51. Aoki K, Guyer B, (2001) Botulinum toxin type A and other botulinum toxin serotypes: a comparative review of biochemical and pharmacological actions. *European Journal of Neurology* 8:21-29.