

Nelson João Carneiro Ventura

As Neurotoxinas de *Clostridium* sp. – Os mecanismos de ação e a sua importância clínica

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2015

Nelson João Carneiro Ventura

**As Neurotoxinas de *Clostridium* sp. – Os mecanismos
de ação e a sua importância clínica**

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2015

As Neurotoxinas de *Clostridium* sp. – Os mecanismos de ação e a sua importância clínica

Nelson João Carneiro Ventura

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Resumo

As neurotoxinas produzidas por espécies do género *Clostridium*, responsáveis pelo tétano e botulismo, são classificadas como potentes metaloproteases constituídas por três domínios funcionais dotados de diferentes funções: ligação neuroespecífica; internalização neuronal; translocação membranar; atividade proteolítica do complexo proteico *soluble N-ethylmaleimide fusion attachment protein Receptor* (SNARE). Os sete serotipos de neurotoxinas botulínicas (BoNTs) inibem a libertação de acetilcolina ao nível dos terminais colinérgicos periféricos. A neurotoxina tetânica (TeNT), após ligação e internalização aos terminais colinérgicos periféricos sofre um transporte axonal reverso até à espinal medula onde inibe a libertação de ácido λ -aminobutírico (GABA) e glicina nos interneurónios inibitórios. A sinaptobrevina representa o local proteolítico das BoNTs dos serotipos B, D, F e G e da TeNT, enquanto que a SNAP-25 constitui o alvo de ação das BoNTs dos serotipos E, A e C. Para além da SNAP-25 a syntaxina 1 representa outro alvo proteolítico da BoNT do serotipo C.

O botulismo é uma doença rara que tem como principal agente etiológico a espécie *C. botulinum* responsável pela síntese e secreção de BoNTs. A intoxicação alimentar e a colonização intestinal de crianças entre uma semana e um ano de idade representam as principais vias de exposição da doença, que se manifesta por uma paralisia muscular flácida generalizada associada a uma inibição do sistema parassimpático podendo na fase mais avançada da levar à morte por insuficiência respiratória.

O tétano nos dias de hoje é uma doença endémica apenas para alguns países subdesenvolvidos. *C. tetani* representa o agente etiológico do tétano pela produção da TeNT. A contaminação de feridas com esporos bacterianos constitui a fonte de propagação da doença que se traduz numa hiperatividade generalizada dos músculos esqueléticos associada a espasmos e rigidez muscular. O comprometimento generalizado do sistema simpático representa a principal causa de morte da doença.

Atualmente as BoNTs estão aprovadas para o tratamento de uma vasta gama de patologias associadas à hiperfunção dos terminais colinérgicos periféricos.

Palavras-chave: *Clostridium*; neurotoxinas; Botulismo; Tétano.

Review

The neurotoxins produced by species of the genus *Clostridium*, responsible for botulism and tetanus are potent metalloprotease classified as consisting of three functional domains endowed with different functions: neuro specific bond; neuronal internalization; membrane translocation; proteolytic activity of the SNARE (soluble N-ethylmaleimide fusion attachment protein Receptor) protein complex. Seven serotypes of botulinum neurotoxins (BoNTs) inhibit the release of acetylcholine at the level of peripheral cholinergic terminals. The tetanus neurotoxin (TeNT) and internalization following binding to peripheral cholinergic terminals undergoes a reverse axonal transport to the spinal cord, where it inhibits the release of λ -aminobutyric acid (GABA) and glycine in inhibitory interneurons. Synaptobrevin is the site of proteolytic BoNTs serotypes B, D, F and G and TeNT, while SNAP-25 is the action target of the BoNTs serotype E, A and C. In addition to SNAP-25 and syntaxin 1 represents another target for proteolytic BoNT serotype C.

Botulism is a rare disease whose main etiologic agent *C. botulinum* responsible for the synthesis and secretion of BoNTs. Food poisoning and intestinal colonization in children between one week and one year of age represent the main ways of exposure of the disease, manifested by a widespread flaccid muscular paralysis associated with an inhibition of the parasympathetic system, may in advanced stage lead to death by respiratory failure.

Tetanus today is endemic only some underdeveloped countries. *C. tetani* is the causative agent of tetanus for the production of TeNT. The contamination of wounds with bacterial spores is the source of spread of disease which translates into a general hyperactivity of skeletal muscles associated with muscle spasticity. The widespread involvement of the sympathetic nervous system is the leading cause of death from the disease.

BoNTs are the currently approved for the treatment of a wide range of conditions associated with cholinergic hyperfunction of peripheral terminals.

Keywords: *Clostridium*; neurotoxins; Botulism; Tetanus.

Agradecimentos

À Professora Doutora Cristina Pina por me ter acompanhado na elaboração desta tese, a si agradeço toda a disponibilidade e dedicação que me presenteou nesta última etapa da minha jornada. O meu sentido obrigado.

A todos os colaboradores do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Sousa Martins – Guarda pela colaboração e apoio.

Agradeço ainda a todos os que de uma forma ou outra me ensinaram a não desistir e a acreditar que esta escalada é possível de concretizar se os passos forem precisos e objetivos.

Índice Geral

I. Introdução	1
II. O género <i>Clostridium</i>	2
1. Taxonomia	3
2. Caraterísticas microbianas	3
2.1. Habitat	4
2.2. Morfologia	4
2.3. Crescimento	5
2.4. Metabolismo	5
2.5. Esporulação	6
2.6. Patogenicidade	6
III. As neurotoxinas produzidas por <i>Clostridium</i>	7
1. Classificação	7
2. Caraterização estrutural	8
3. Atividade neurotóxica	9
3.1. Ligação neuroespecífica	11
3.2. Internalização	13
3.3. Translocação	13
3.4. Atividade proteolítica	14
IV. O botulismo	16
1. Enquadramento histórico	16
2. Agente etiológico – <i>Clostridium botulinum</i>	17
3. As neurotoxinas de <i>Clostridium botulinum</i>	19
3.1. O complexo proteico estrutural	20
3.2. Vias de exposição e mecanismos invasivos	22
4. Mecanismos de ação e efeitos adversos das neurotoxinas Botulínicas	25
4.1. Inibição da neurotransmissão colinérgica periférica	26
4.1.1. Efeitos ao nível dos músculos esqueléticos	28
4.1.2. Alterações sobre o Sistema Nervoso Autónomo	29
5. Bloqueio da libertação de neurotransmissores relacionados com a dor	30

6. Efeitos diretos e indiretos ao nível do Sistema Nervoso Central	32
7. Manifestações clínicas da doença	33
8. Epidemiologia	34
8.1. O botulismo alimentar	35
8.2. O botulismo infantil	38
V. O Tétano	40
1. Enquadramento histórico	40
2. Agente etiológico – <i>Clostridium tetani</i>	41
3. Modo de transmissão	42
4. A tetanospasmina tetânica	43
4.1. Mecanismos de ação	44
4.2. Bloqueio da libertação de neurotransmissores	46
4.2.1. Efeitos ao nível dos neurónios motores	47
4.2.2. Efeitos ao nível da junção neuromuscular	48
4.2.3. Alterações no Sistema Nervoso Autónomo	48
5. Manifestações clínicas da doença	49
5.1. Tétano generalizado	50
5.2. Tétano localizado	51
5.3. Tétano cefálico	51
5.4. Tétano neonatal	52
6. Epidemiologia	52
6.1. Infecção maternal e neonatal	53
6.2. Dados epidemiológicos em Portugal	55
7. Medidas profiláticas de combate à doença	55
VI. Aplicações farmacêuticas das neurotoxinas de <i>Clostridium</i>	57
VII. Conclusão	60
VIII. Bibliografia	61

Índice de figuras

Figura 1 – Observação microscópica de <i>C. botulinum</i> a partir de uma coloração de Gram	4
Figura 2 – Representação estrutural das NTCs.....	8
Figura 3 – Representação esquemática de um neurónio motor e a sua interação com um interneurónio inibitório	10
Figura 4 – Representação dos mecanismos de ligação, internalização, translocação e atividade proteolítica das NTCs	10
Figura 5 – Representação da comunicação interneuronal	15
Figura 6 – Representação da clivagem proteica das diferentes NTCs	16
Figura 7 – Representação do complexo proteico estrutural das BoNTs	21
Figura 8 – Representação das vias de exposição associadas ao botulismo e mecanismos invasivos das BoNTs	23
Figura 9 – Representação de um terminal colinérgico periférico	26
Figura 10 – Representação esquemática dos mecanismos implicados na regulação da contração dos músculos esqueléticos	29
Figura 11 – Divisão do SNA no sistema simpático e parassimpático	30
Figura 12 – Mecanismos de inibição da libertação de neurotransmissores e neuropéptidos relacionados com a dor pela ação da BoNT do serotipo A	31
Figura 13 – Manifestações clínicas do Botulismo	33
Figura 14 – Surtos de origem alimentar ocorridos em Portugal entre 1993-1998 e os respetivos agentes microbianos.....	37
Figura 15 – Mecanismo de ação da TeNT	44
Figura 16 – Vias de internalização celular ao nível dos terminais colinérgicos	45

Figura 17 – Representação do controlo neuronal dos neurónios motores e a sua ação sobre a contração	47
Figura 18 – Manifestações clínicas do Tétano	50
Figura 19: Números anuais por 1 milhão de habitantes de casos notificados de tétano e mortes associadas ocorridos nos Estados Unidos da América entre 1947-2008	53
Figura 20 – Eliminação global do tétano maternal e neonatal	54
Figura 21 – Casos declarados de tétano em Portugal entre 1958-2011	55
Figura 22 – Evolução do número de mortes estimadas associadas ao tétano neonatal e a cobertura maternal com duas doses de vacina contra o tétano	56

Índice de tabelas

Tabela 1 – Diferenças fenotípicas entre os microrganismos produtores de BoNTs18

Tabela 2 – As BoNTs e os seus alvos proteolíticos20

Tabela 3 – Principais aplicações terapêuticas das BoNTs.....58

Abreviaturas

ACh – Acetilcolina

BoNTs – Neurotoxinas botulínicas

CDC – *Center of Diseases Control and Prevention*

CGRP – Péptido relacionado com o gene da calcitonina

DGS – Direção Geral de Saúde

DL50 – Dose letal de 50%

FDA – *Food and Drug Administration*

GABA – λ -aminobutírico

HA – Hemaglutininas

HC – Cadeia Pesada

JMN – Junção neuromuscular

LC – Cadeia leve

NTCs – Neurotoxinas clostrídicas

NTNH – Não tóxico não hemaglutininas

SNA – Sistema nervoso autónomo

SNARE – *Soluble N-ethylmaleimide fusion attachment protein Receptor*

SNC – Sistema nervoso central

SP – Substância P

TeNT – Neurotoxina do tétano

WHO – *World Health Organization*

I. Introdução

O género *Clostridium* representa um vasto grupo de bactérias anaeróbias formadoras de esporos com a capacidade de síntese e secreção de uma ampla variedade de toxinas implicadas nos processos de patogenicidade (Johnson, 2005). As neurotoxinas clostrídicas (NTCs) representam as substâncias mais tóxicas conhecidas pela ciência. São produzidas por *C. botulinum* e por *C. tetani* que estão associados ao botulismo e ao tétano respetivamente. Exercem a sua atividade por proteólise neuroespecífica inibindo a libertação de neurotransmissores. Embora exibam o mesmo mecanismo de ação, provocam sintomatologias clínicas opostas que se manifestam por uma paralisia flácida no caso do botulismo e uma paralisia espástica associada ao tétano (Alouf, 2015).

O botulismo e o tétano constituem duas patologias altamente letais para o ser Humano, apresentado no entanto uma baixa taxa de incidência na grande maioria dos países desenvolvidos. A tomada de medidas cada vez mais exigentes no controlo de contaminações bacterianas alimentares e a implementação de planos de vacinação obrigatórios contra o tétano, fizeram regredir em grande escala o número de casos associados a estas patologias (Johnson, 2005). Em alguns países subdesenvolvidos, o tétano ainda é considerado uma patologia endémica associada a um elevado número de mortes principalmente entre os recém-nascidos (Rossetto et al., 2011). A deficiência de imunização das populações e a falta de condições higiénicas durante o parto são os principais fatores que contribuem para este facto (Thwaites et al., 2015).

Apesar das NTCs serem caracterizadas como poderosos agentes neurotóxicos, atualmente constituem importantes ferramentas terapêuticas usadas numa vasta gama de patologias (Chen, 2012).

Este trabalho teve como objetivo a realização de uma pesquisa bibliográfica atual, de modo a: caracterizar o género *Clostridium*, evidenciar a organização estrutural e funcional das NTCs, descrever os mecanismos de ação envolvidos nos processos neuropatológicos associados às NTCs, relacionar o botulismo e o tétano com os efeitos neurotóxicos das NTCs e retratar estas doenças quanto aos aspetos etiopatológicos e epidemiológicos e por último, destacar as principais aplicações farmacêuticas das NTCs.

II. O género *Clostridium*

Os primeiros registos deste grupo de bactérias remontam a Hipócrates (460-377 a.c), que na altura forneceram precisas descrições da doença do tétano e gangrena gasosa associadas a *C. tetani* e *C. histolyticum* respetivamente. No entanto, foi Louis Pasteur o grande impulsionador na pesquisa científica deste grupo de bactérias, afirmando em 1861 que a vida seria possível na ausência de oxigénio o que suscitou na altura o interesse no estudo destes microrganismos por parte de grandes investigadores (Dürre, 2007; Johnson, 2005).

Este género bacteriano estava inicialmente classificado no género *Bacillus* derivado à forma cilíndrica e à formação de endosporos, mas em 1880 Prazmowski propôs um novo género denominado de *Clostridium* onde foram incluídas as bactérias anaeróbias formadoras de esporos, sendo nesse mesmo ano obtida a primeira cultura pura de *C. butyricum* a qual representa a espécie de referência do género. Posteriormente foram identificadas as principais espécies patogénicas para o Homem e animais e estas foram associadas às respetivas patologias (Dürre, 2007; Johnson, 2005).

O facto deste grupo de bactérias crescer preferencialmente sob condições anaeróbias criou a necessidade de novas formas de metodologias, devido às dificuldades de isolamento e identificação. O seu manuseamento obrigava a processos laboratoriais muito meticulosos e a dificuldade de obter culturas puras era muito elevada, embora na altura tenham sido feitos grandes esforços no desenvolvimento de novas técnicas laboratoriais para melhorar as condições de crescimento. O atraso no seu estudo foi de tal ordem que na altura as técnicas de biologia molecular aplicadas às bactérias aeróbias ainda não tinham sido desenvolvidas para a maioria das bactérias anaeróbias (Johnson, 2005).

O estudo destes microrganismos foi estimulado principalmente pela crescente associação a infeções em Humanos e animais. Aspectos ecológicos e biotecnológicos, como a renovação da biomassa em ambientes anaeróbios e a conversão de substratos como a celulose em solventes orgânicos, ácidos e outros compostos, vieram também suscitar o interesse pelo estudo de certas espécies não patogénicas (Bahl e Dürre 1993; Dürre, 2007; Johnson, 2005).

1. Taxonomia

O género *Clostridium* é um vasto e heterogéneo grupo bacteriano que representa um dos maiores géneros do domínio Bactéria (Johnson, 2005). Estão classificadas como bactérias pertencentes ao filo *firmicute*, da classe *Clostridia*, ordem *Clostridiales*, pertencentes à família *Clostridiaceae* e ao género *Clostridium* (Dürre, 2007).

As classificações taxonómicas mais antigas que se baseavam apenas nas características fenotípicas que caracterizam o género, atribuíam mais de 200 espécies ao género *Clostridium* (Dürre, 2007). Através de análises filogenéticas baseadas principalmente na sequenciação do gene 16S ribossomal RNA (16S rRNA), verificou-se que muitas espécies catalogadas inicialmente neste género bacteriano se encontram filogeneticamente relacionadas com outros géneros. Deste modo, com base numa nova reestruturação taxonómica baseada em dados fenotípicos e filogenéticos é sugerido a reclassificação de várias espécies em novos géneros ou a sua atribuição a géneros já existentes (Collins et al., 1998).

As principais espécies implicadas em doenças Humanas incluem: *C. difficile* que é considerado um agente patogénico nosocomial, caracterizado como o principal responsável pela colite pseudomembranosa e diarreia associada a antibióticos no mundo desenvolvido; *C. perfringes* associado principalmente aos processos gangrenosos e à enterite necrótica; *C. botulinum* e *C. tetani* associados ao botulismo e ao tétano respetivamente, os quais serão desenvolvidos ao longo deste trabalho (Carter et al., 2014).

2. Caraterísticas microbianas

O género *Clostridium* compreende um grupo de bactérias caracterizado fenotipicamente pela formação de endosporos, crescimento em ambiente anaeróbio ou microaerofílico, a incapacidade de redução dos sulfatos e uma estrutura de Gram positiva ao nível da parede celular (Dürre, 2007; Johnson, 2005).

2.1. Habitat

Encontram-se amplamente distribuídas pela natureza, resultado da resistência e da longevidade dos seus esporos, embora o solo e o intestino de Humanos e animais constituírem os principais habitats destes microrganismos. Muitas das espécies, incluindo espécies patogénicas (*C. perfringens*, *C. sporogenes*), podem fazer parte da flora comensal do trato gastro intestinal de Humanos e animais de forma permanente ou transitória o que faz destes microrganismos (na maioria dos casos) agentes patogénicos oportunistas (Borrilello e Aktories, 2005).

2.2. Morfologia

Morfologicamente, o género *Clostridium* é caracterizado como um grupo de bactérias de Gram positivas, embora existam espécies que corem de Gram negativo nas fases mais avançadas de crescimento. Normalmente encontram-se arranjadas aos pares ou em cadeias curtas sob a forma de bastonete. A maioria apresenta mobilidade através de flagelos peritríquios, sendo a presença de cápsula uma característica presente apenas em algumas espécies como em *C. perfringes* e em *C. butyricum* (Dürre, 2007; Johnson, 2005). Nas fases mais avançadas da esporulação, verifica-se uma deformação da parede celular devido à presença de endoesporos ovais ou esféricos que podem ocupar a posição central, sub-terminal ou terminal do citoplasma (Figura 1) (Blaschek 2014; Dürre, 2014).



Figura 1 – Observação microscópica de *C. botulinum* a partir de uma coloração de Gram. Visualização de bactérias de Gram positivas sob a forma de bastonete em fase de esporulação avançada. Adaptado de CDC, 2015.

2.3. Crescimento

Em relação às propriedades de crescimento, estas refletem a diversidade dos habitats naturais deste grupo de bactérias. Geralmente são anaeróbias obrigatórias, contudo algumas espécies como em *C. acetobutylicum* são aerotolerantes. A presença de oxigénio no meio de crescimento induz à formação de radicais potencialmente letais, como o anião superóxido, que induzem principalmente à oxidação das membranas lipídicas e à inativação de enzimas aerossensíveis (Bahl e Dürre 1993; Blaschek 2014).

A tolerância ao pH pode variar numa ampla faixa de variação (4-10.5) embora para a maioria das espécies o pH ótimo de crescimento ocorra entre 6.5-7.5. Esta adaptação à variação dos valores de pH entre as diferentes espécies está diretamente relacionada com a capacidade de degradação de inúmeros compostos orgânicos, em que os metabolitos resultantes podem aumentar ou baixar o pH do meio (Bahl e Dürre 1993; Blaschek 2014).

Quanto à temperatura de crescimento, verifica-se que a maioria das espécies são mesófilas, contudo este género bacteriano abrange microrganismos psicrófilos e termófilos capazes de se desenvolver a temperaturas inferiores a 30 °C e superiores a 40 °C respetivamente, tendo os últimos suscitado o interesse por parte da indústria na obtenção de enzimas hidrolíticas termoestáveis usadas nos processos fermentativos (Bahl e Dürre 1993; Blaschek 2014).

2.4. Metabolismo

Do ponto de vista metabólico são muito versáteis apresentando a capacidade de degradar pela via fermentativa uma ampla variedade de compostos orgânicos. Os hidratos de carbono representam a principal fonte de carbono destes microrganismos, embora outros compostos orgânicos como álcoois, aminoácidos, compostos aromáticos, purinas pirimidinas também sejam metabolizados. Possuem também a capacidade de degradação de compostos poliméricos como polissacarídeos (amido, celulose) e proteínas. Dos processos fermentativos resultam principalmente a formação de álcoois e ácidos orgânicos como o butirato, acetato, lactato e etanol (Blaschek 2014; Dürre, 2007; Popoff e Bouvet 2013).

2.5. Esporulação

Como já foi referido anteriormente, a formação de endoesporos é uma característica comum a todas as espécies deste género bacteriano. Representa o mecanismo de resposta adaptativa a condições adversas mais eficaz até então conhecido. A resistência dos esporos é de tal ordem que conseguem manter as suas características por longos períodos de tempo sob condições de temperatura superiores a 120 °C, seca extrema, radiações, pressões elevadas e agentes químicos desinfetantes (Dürre, 2007).

O processo de esporulação é desencadeado principalmente pela depleção nutritiva essencial ao crescimento e desenvolvimento bacteriano que envolve alterações ao nível morfológico e fisiológico que obedecem a processos de regulação molecular bastante complexos. Os esporos são formados essencialmente por uma complexa e resistente camada externa que rodeia um núcleo central onde reside o material genético e um conjunto de enzimas essenciais para as fases iniciais de germinação (Blaschek, 2014; Dürre, 2014).

2.6. Patogenicidade

Uma característica importante associada a este género bacteriano traduz-se na síntese e secreção de uma ampla diversidade de enzimas proteolíticas denominadas de exotoxinas, implicadas nos processos de patogenicidade destes microrganismos (Johnson, 2005; Popoff e Bouvet, 2013). De acordo com Dürre (2007), o género *Clostridium* produz mais tipos de toxinas do que qualquer outro género bacteriano. Até agora são descritas 15 espécies deste género produtoras de toxinas (cerca de 10% do total de espécies), capazes de produzir 59 tipos de toxinas diferentes, representando cerca de 20% de todas as toxinas bacterianas até então conhecidas, podendo uma espécie produzir mais de um tipo de toxina (Dürre, 2007; Johnson, 2005; Popoff e Bouvet, 2013).

As toxinas produzidas por este género bacteriano apresentam uma grande variedade que diferem na estrutura, tamanho e mecanismo de ação. Diferem também pela sua capacidade de difusão pelo organismo, podendo atuar localmente nos tecidos infetados ou atravessar as barreiras celulares e disseminar-se para diferentes tecidos através da

circulação sanguínea. Algumas toxinas podem interagir com vários tipos de células estando geralmente associadas aos processos gangrenosos, enquanto outras interagem apenas com células específicas como as células intestinais associadas a processos necróticos e hemorrágicos, ou as células neuronais implicadas em perturbações neurológicas (Popoff e Bouvet, 2009).

Com base no seu mecanismo de ação podem se distinguidas em duas classes principias: (I) as toxinas que atuam ao nível da membrana celular por via de formação de poros ou por atividade de fosfolipases e proteases ativas na matriz extracelular; (II) as toxinas com atividade enzimática intracelular específica. As primeiras têm como principal objetivo a libertação de nutrientes essenciais a partir das células infetadas, enquanto que as segundas estão envolvidas na modificação de alvos celulares fundamentais induzindo deste modo a alterações irreversíveis de funções essenciais ou à morte celular (Popoff e Bouvet, 2009; Popoff e Bouvet, 2013).

Popoff e Bouvet (2013) referem que as toxinas deste género bacteriano podem ter derivado a partir de proteínas transmembranares e proteínas hidrolíticas ancestrais evolutivas, que se tornaram ferramentas essenciais para a proliferação bacteriana sobretudo através da obtenção de nutrientes essenciais a partir das células eucariotas. No entanto, este facto tem criado algumas controversas uma vez que apenas 10% das espécies deste género bacteriano produzem toxinas e muitas das toxinas produzidas não apresentam vantagens proliferativas (Popoff e Bouvet, 2013).

III. As neurotoxinas produzidas por *Clostridium*

1. Classificação

A neurotoxina do tétano ou tetanospasmina tetânica (TeNT) e os sete serotipos de neurotoxinas botulínicas (BoNTs) (representadas de A-G) constituem a família das NTCs e estão associadas ao tétano e ao botulismo respetivamente (Breidenbach e Brunger, 2005; Brunger e Rummel, 2009; Caleo e Schiavo, 2009; Swaminathan, 2011).

São classificadas como potentes metaloproteases que possuem uma elevada afinidade e especificidade para as células neuronais onde exercem o seu mecanismo de ação, o bloqueio da libertação de neurotransmissores ao nível das fendas sinápticas por clivagem proteica específica (Alouf et al., 2015; Breidenbach e Brunger, 2005; Humeau et al., 2000; Lang e Jahn, 2009).

2. Caraterização estrutural

As NTCs partilham um elevado grau de homologia e sequência estrutural. Processos de cristalização estrutural revelaram que estas são constituídas por três domínios funcionais independentes (Figura 2), essenciais para os processos implicados na toxicidade das mesmas (Alouf et al., 2015; Breidenbach e Brunger, 2005; Lang e Jahn, 2009).

Inicialmente são sintetizadas no citosol bacteriano e posteriormente são libertadas após lise bacteriana como uma cadeia única polipeptídica inativa, apresentando uma massa molecular de 150 kDa. A sua ativação ocorre quando é clivada proteoliticamente por protéases bacterianas ou teciduais gerando uma neurotoxina com dois fragmentos polipeptídicos diferentes, uma cadeia pesada (HC) e uma cadeia leve (LC) de 100 kDa e 50 kDa respetivamente, unidas por uma ponte dissulfídica e ligações não covalentes, integridade da qual é vital para a neurotoxicidade (Figura 2) (Brunger e Rummel, 2009; Humeau et al., 2000; Pellizzari et al., 1999; Swaminathan, 2011).

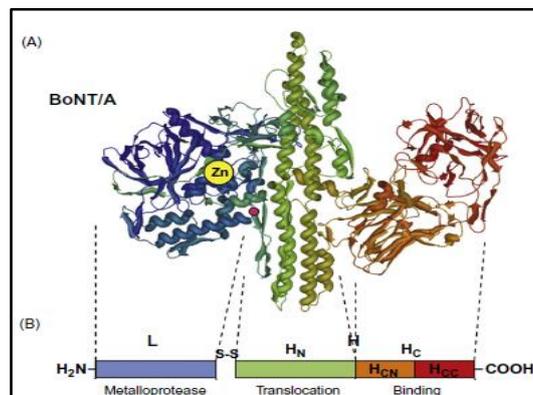


Figura 2 – Representação estrutural das NTCs. (A) Cristalografia estrutural da BoNT/A. O domínio de ligação (H_C) está representado à direita, o domínio de translocação (H_N) está ao centro e o domínio catalítico (L) coordenado pelo átomo de zinco encontra-se à esquerda da imagem. (B) Representação esquemática da estrutura das NTCs. Adaptado de Alouf et al., 2015.

A organização estrutural das NTCs em duas cadeias polipeptídicas é essencial para a sua toxicidade. A LC é responsável pela atividade catalítica que leva ao bloqueio da libertação de neurotransmissores, enquanto a HC medeia a ligação, a internalização e a translocação membranar da LC para o citoplasma das células neuronais. Embora a LC apresente uma elevada atividade catalítica, só a sua ligação à HC a transforma num potente agente toxigénico ao nível neuronal, uma vez que esta para além de mediar a interação da LC com os alvos neuronais assegura também a sua integridade estrutural (Binz e Rummel, 2009; Brunger e Rummel, 2009; Lang e Jahn, 2009; Rossetto et al., 2000).

A HC compreende dois domínios funcionais de tamanho semelhante (50 kDa) que desempenham diferentes funções (Figura 2). Um domínio N-terminal designado de H_N que medeia translocação da LC para o citoplasma neuronal e outro C-terminal (H_C) com duas sub-unidades distintas, a H_{CN} e a H_{CC}, implicado nos processos de ligação específica e transporte retrogrado das NTCs (Binz e Rummel, 2009; Caleo e Schiavo, 2009; Rossetto et al., 2011; Lang e Jahn, 2009).

3. Atividade neurotóxica

Como foi referido anteriormente, as NTCs atuam por clivagem proteica específica inibindo assim a libertação de neurotransmissores. Embora partilhem o mesmo mecanismo de ação, estas desencadeiam sinais e sintomas clínicos opostos pelo facto de atuarem em diferentes locais do sistema nervoso (Figura 3) inibindo assim a libertação de neurotransmissores distintos (Alouf et al. 2015; Brunger e Rummel, 2009; Caleo e Schiavo, 2009).

As BoNTs atuam principalmente ao nível da junção neuromuscular (JNM) bloqueando a libertação de acetilcolina (ACh) causando assim uma paralisia flácida. A TeNT, após alcançar os terminais nervosos colinérgicos é transportada retrogradamente nos neurónios motores da espinal medula onde é posteriormente internalizada nos interneurónios inibitórios adjacentes, local onde bloqueia a libertação de neurotransmissores inibitórios causando deste modo uma paralisia espástica (Figura 3) (Alouf et al., 2015; Brunger e Rummel, 2009; Caleo e Schiavo, 2009).

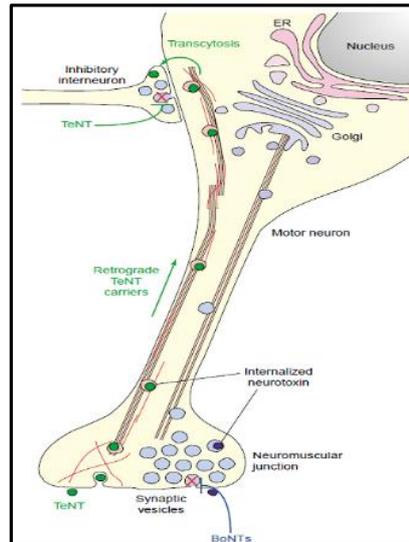


Figura 3 – Representação esquemática de um neurônio motor e a sua interação com um interneurônio inibitório. Os locais de ação da TeNT (verde) e das BoNTs (azul) são representados em conjunto com as vias específicas de transição intracelular. As cruzes vermelhas indicam os principais locais de inibição da liberação de neurotransmissores das NTCs. Adaptado de Lalli et al., 2003.

À semelhança de outras toxinas bacterianas, as NTCs seguem quatro etapas fundamentais para alcançar o alvo de ação e desencadear assim o mecanismo neurotóxico (Figura 4): ligação neuroespecífica; internalização; translocação; atividade proteolítica (Grumelli et al., 2005; Lang e Jahn, 2009; Pellizzari et al., 1999; Rossetto et al., 2011).

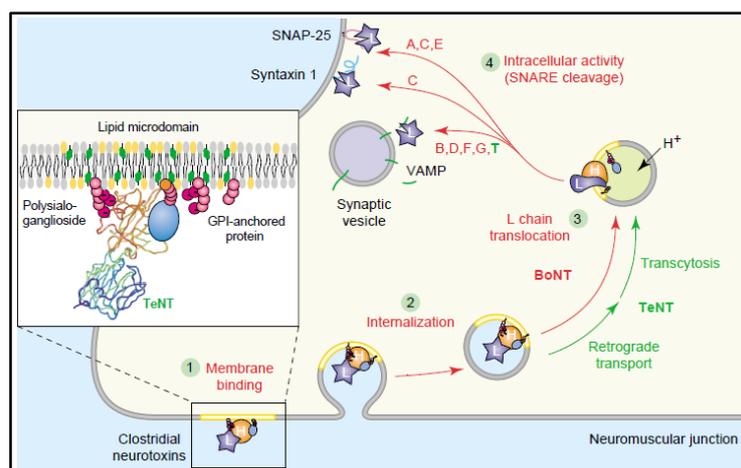


Figura 4 – Representação dos mecanismos de ligação, internalização, translocação e atividade proteolítica das NTCs. (1) Ligação membrana da TeNT através de polissialogangliosídeos (vermelho), proteínas (azul) e microdomínios lipídicos (verde e amarelo). (2) Internalização das NTCs através de compartimentos de endocitose e as vias específicas de transição intracelular. (3) Translocação da LC através de compartimentos de internalização acidificados. (4) Atividade proteolítica específica das NTCs com os respetivos alvos proteicos. Adaptado de Lalli et al., 2003.

3.1. Ligação neuroespecífica

A neuroespecificidade das NTCs é determinante para a sua toxicidade, ligando-se às células neuronais de forma rápida e com elevada afinidade (Lalli et al., 2003). Vários estudos efetuados usando culturas de células neuronais primárias, linhagem celulares específicas e preparações membranares comprovaram a neuroespecificidade das NTCs. Embora *in vitro* se verifique uma capacidade de ligação a células não neuronais, mas em concentrações clinicamente irrelevantes, *in vivo* verifica-se uma neuroespecificidade absoluta que requer concentrações na ordem dos subnanomolar (Alouf et al., 2015).

Como foi referido anteriormente, o domínio Hc das NTCs abriga o principal recurso para o reconhecimento e ligação de recetores neuroespecíficos. É na subunidade H_{CC} do domínio Hc que está a maior divergência sequencial verificada entre as diferentes NTCs, o que explica as propriedades de ligação distintas (Alouf et al., 2015; Swaminathan, 2011). Lalli et al. (2003) referem que esta subunidade abriga os principais locais de ligação estabelecidos com as células neuronais, sendo considerada como uma unidade proteica de ligação a oligossacarídeos multivalente. Quanto à subunidade H_{CN}, embora a sua função permaneça obscura é sugerido ter um papel no reconhecimento de oligossacarídeos e no transporte retrógrado da TeNT para neurónios adjacentes (Herreros e Schiavo, 2002; Lalli et al., 2003).

Os complexos polisialogangliosídeos, como os da família G1b (GD1b, GT1b, e GQ1b), são recetores encontrados particularmente ao nível neuronal que medeiam o primeiro contacto das NTCs com as células neuronais, principalmente ao nível dos terminais nervosos colinérgicos (Binz e Rummel, 2009; Brunger e Rummel, 2009; Montecucco et al., 2004). Esta interação entre as NTCs e os complexos polisialogangliosídeos foi evidenciada em inúmeros estudos que revelaram que estas estruturas membranares são essenciais para a sua ligação. Estudos *in vitro* revelaram que a pré-incubação de BoNTs com gangliosídeos inibe a sua atividade ao nível da JNM, já o pré-tratamento de células neuronais com gangliosídeos aumenta significativamente a sua sensibilidade aos efeitos tóxicos das NTCs (Alouf et al., 2015; Grumelli et. al., 2005). Em culturas de células obtidas a partir da espinal medula e células cromafins em que foram clivados resíduos de ácido siálico, os resultados demonstraram uma redução dos mecanismos de ação tanto

das BoNTs como da TeNT (Alouf et al., 2015). Células neuronais sensibilizadas previamente com anticorpos monoclonais Anti-GD1b antagonizaram os efeitos neurotóxicos da BoNT do serotipo A (Brunger e Rummel, 2009).

Apesar dos complexos polisialogangliosídeos serem um elemento fulcral para a neuroespecificidade das NTCs, muitas evidências argumentam a favor que eles não são os únicos recetores ao nível dos terminais nervosos. O aumento da afinidade *in vivo* comparado com os estudos *in vitro* e a redução dos níveis de ligação em ensaios com membranas neuronais de rato pré-tratadas com proteases vieram fomentar a ideia de que recetores de origem proteica também contribuem para a ligação neuroespecífica das NTCs (Binz e Rummel, 2009; Pellizzari et al., 1999). Brunger e Rummel (2009) e Swaminathan (2011) referem que os complexos polisialogangliosídeos são recetores de baixa afinidade que acumulam as NTCs ao nível da membrana plasmática mediando deste modo o seu contacto com os recetores proteicos. A ligação simultânea das NTCs com os complexos polisialogangliosídeos e os recetores proteicos aumentam a sua afinidade para as células neuronais, sendo este um requisito essencial para as etapas posteriores de endocitose (Brunger e Rummel, 2009; Binz e Rummel, 2009).

O conceito de que as proteínas constituem os recetores secundários das NTCs foi também fundamentado pelo facto de estudos demonstrarem que a estimulação neuronal acelera a absorção das NTCs e provoca um início mais precoce da sua ação neurotóxica. Com a estimulação neuronal verifica-se um aumento do nível de exocitose das vesículas sinápticas para a libertação de neurotransmissores ao nível da fenda sináptica, expondo deste modo as proteínas sinápticas vesiculares responsáveis pelos processos de ligação e endocitose das NTCs (Brunger e Rummel, 2009).

Para além dos complexos polisialogangliosídeos e recetores proteicos, microdomínios lipídicos membranares ricos em colesterol e esfingolípidos também estão envolvidos na neuroespecificidade das NTCs. Estes microdomínios lipídicos atuam como importantes plataformas funcionais para o reconhecimento e classificação das NTCs, bem como para os processos posteriores de sinalização intracelular responsáveis pelos processos de internalização e direcionamento intraneuronal verificado entre as diferentes NTCs (Herreros e Schiavo, 2002; Lalli et al., 2003).

3.2. Internalização

Uma vez que a atividade catalítica da LC é dirigida a alvos intracelulares, este domínio das NTCs têm de atingir o citoplasma neuronal de modo a exercer a sua ação. As evidências disponíveis argumentam que as NTCs não atravessam diretamente a membrana plasmática. Estudos através de microscopia eletrónica revelaram que após ligação sofrem endocitose vesicular num processo dependente de energia e temperatura (Grumelli et. al., 2005; Lalli et al., 2003; Rossetto et al., 2011). Foi demonstrado também que após a estimulação de células neuronais verifica-se um aumento da internalização das NTCs, indicando que estas exploram a reciclagem de vesículas sinápticas para a sua internalização (Lang e Jahn, 2009).

3.3. Translocação

Após internalização, a LC das NTCs têm que atravessar a barreira hidrofóbica dos compartimentos de internalização de modo a ser libertada ao nível do citoplasma. Embora não haja um consenso sobre a natureza exata da internalização das NTCs, sabe-se no entanto que os compartimentos de internalização são acidificados pela ação de bombas de prótons que expõem as NTCs a um baixo pH induzindo alterações conformacionais nas mesmas, principalmente ao nível do domínio Hc_N (Grumelli et. al., 2005; Lang e Jahn, 2009; Turton et al., 2002). Há evidências que a acidificação dos compartimentos de internalização é um passo crucial para a translocação das NTCs. O uso de bafilomicina A1, um inibidor da bomba de prótons, e de substâncias neutralizantes de pH protegem as células neuronais da ação toxinogénica das NTCs (Grumelli et. al., 2005; Rossetto et al., 2011; Montecucco e Schiavo, 1994).

Estudos com modelos de sistemas membranares e com culturas celulares revelaram que as NTCs quando submetidas a um baixo pH demonstram mudanças conformacionais que se caracterizam por uma alteração a partir de uma conformação neutra hidrofílica solúvel em água, numa conformação ácida insolúvel em água com grupos hidrofóbicos expostos à superfície. Esta alteração conformacional é indispensável à interação e à permeação das NTCs para com a bicamada fosfolipídica dos compartimentos de internalização (Alouf et al., 2015; Lang e Jahn, 2009; Rossetto et al., 2000).

Após a interação entre as NTCs e os fosfolípidos membranares é evidenciado que o domínio Hc_N apresenta a capacidade de formar canais iônicos na bicamada lipídica em membranas biológicas e artificiais a um pH baixo, podendo este estar associado à translocação do domínio catalítico para o citoplasma neuronal. Em alternativa, é referido que a formação de canais iônicos levam a alterações de permeabilidade alterando assim os gradientes de concentração eletroquímicos, conduzindo deste modo à lise osmótica dos compartimentos de internalização e consequente libertação das NTCs para o citoplasma neuronal (Lang e Jahn, 2009; Pellizzari et al., 1999).

Uma vez no citoplasma, a LC retoma a sua configuração inicial mediada pelo pH neutro citoplasmático, onde posteriormente ocorre a sua libertação pela redução da ligação dissulfídica que une as duas cadeias polipeptídicas (Turton et al., 2002; Rossetto et al., 2014).

3.4. Atividade proteolítica

Antes de abordarmos a atividade proteolítica da NTCs, convém salientar que a libertação de neurotransmissores (armazenados em vesículas nos terminais pré-sinápticos) ao nível da fenda sináptica é assegurado por um processo de exocitose, em que após a fusão das vesículas sinápticas com as membranas pré-sinápticas os neurotransmissores são libertados (Figura 5). Este mecanismo é desencadeado por um conjunto de proteínas designadas de *soluble N-ethylmaleimide fusion attachment protein Receptor* (SNARE) que se encontram localizadas tanto ao nível das membranas das vesículas sinápticas (sinaptobrevina 2 ou VAMP 2 e a sinaptotagmina), como ao nível das membranas pré-sinápticas (SNAP-25 e a syntaxina 1). Após a aproximação entre as membranas das vesículas sinápticas e as membranas pré-sinápticas, ocorre uma interação proteica entre as duas partes formando um complexo proteico que leva à fusão das duas membranas envolvidas. Este processo ocorre em resposta ao influxo Ca²⁺ citoplasmático proveniente do meio extracelular através de canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem e ativados pela chegada do potencial de ação ao terminal pré-sináptico (Ramakrishnan et al., 2012; Rossetto et al., 2014; Turton et al., 2002).

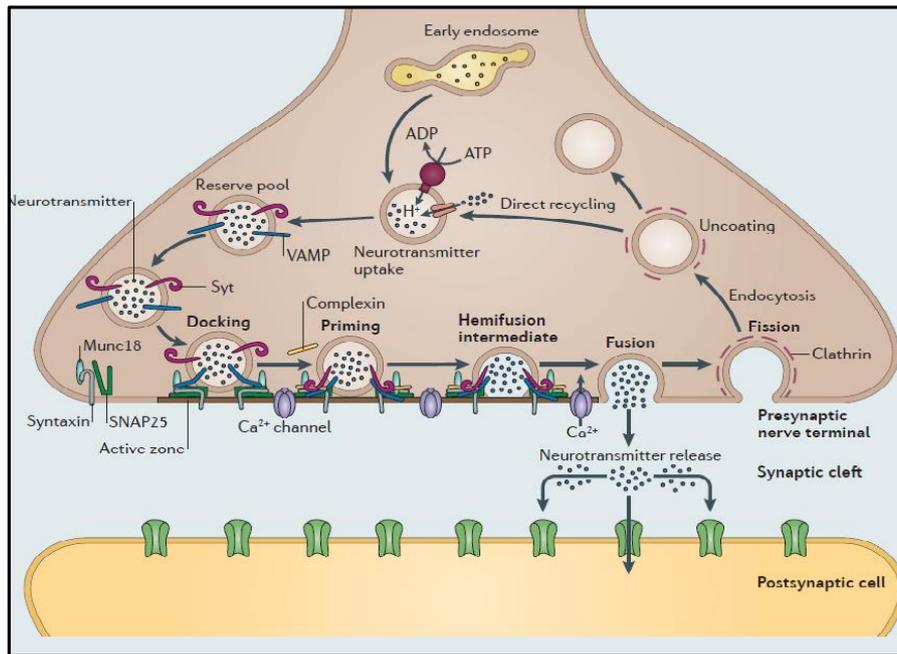


Figura 5 – Representação da comunicação interneuronal. A liberação de neurotransmissores na fenda sináptica é mediada pela fusão de vesículas sinápticas com a membrana pré-sináptica em resposta ao influxo de Ca^{2+} para o citoplasma neuronal. Adaptado de Rossetto et al., 2014.

As NTCs exercem a sua atividade proteolítica através da clivagem seletiva das proteínas do complexo SNARE impedindo a fusão das vesículas sinápticas com as membranas pré-sinápticas, traduzindo-se deste modo no bloqueio da liberação de neurotransmissores ao nível das fendas sinápticas (Alouf et al. 2015; Breidenbach e Brunger, 2005; Brunger e Rummel, 2009; Grumelli et. al., 2005; Rossetto et al., 2011).

A atividade catalítica das NTCs é exercida exclusivamente pela LC em que o centro catalítico é assegurado pelo ião Zn^{2+} . Apresentam uma elevada seletividade e especificidade para apenas três proteínas do complexo SNARE que incluem: a Sintaxina 1 e a SNAP-25 ao nível das membranas pré-sinápticas; a Sinaptobrevina 2 ao nível das vesículas sinápticas. Com exceção da BoNT do serotipo C que apresenta uma atividade catalítica para a sintaxina 1 e para a SNAP-25, as restantes NTCs são específicas para apenas um alvo proteico (Figura 6). Outra particularidade que designa a elevada especificidade das NTCs prende-se com o facto de que até as toxinas que partilham o mesmo substrato exercem a sua atividade proteolítica em posições distintas (Alouf et al., 2015; Lang e Jahn, 2009; Rossetto et al., 2011).

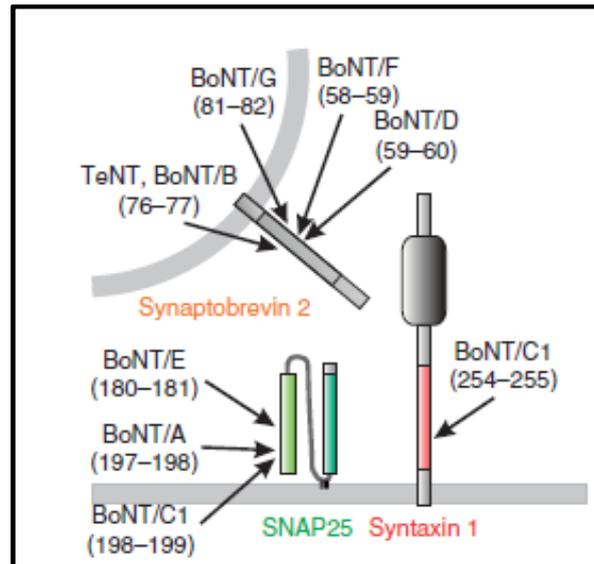


Figura 6 – Representação da clivagem proteica das diferentes NTCs. Inclui a Sintaxina 1 e a SNAP-25 ao nível da membrana pré-sináptica e a Sinaptobrevina 2 ao nível das vesículas sinápticas. Os números indicam a posição dos aminoácidos clivados pelas NTCs. Adaptado de Lang e Jahn, 2009.

IV. O botulismo

O botulismo é uma doença infecciosa não contagiosa associada à espécie *C. botulinum* e às suas potentes neurotoxinas, que se caracteriza clinicamente por manifestações neurológicas podendo ter evolução grave ou mesmo morte associada (Johnson, 2005).

1. Enquadramento histórico

O termo “botulismo” deriva do latim “*botulis*” (salsicha) uma vez que as descrições históricas que aparecem documentadas na Alemanha no século XIX associavam intoxicações alimentares ao consumo de salsichas que se manifestavam como graves paralisias musculares progressivas (Pellett, 2012; Zhang, 2010). Pensa-se que as guerras napoleónicas da altura tenham acarretado problemas económicos excessivos para o país, o que levou a que as medidas sanitárias na produção rural de alimentos tenham sido negligenciadas (Ting e Freiman, 2004).

Em 1897 Emile Van Emergem identificou e purificou pela primeira vez *C. botulinum* na sequência de um grande surto de botulismo ocorrido na Bélgica associado ao consumo de presunto contaminado. Relacionou também a doença à produção de toxinas pela bactéria envolvida no aparecimento dos sintomas da doença. Inicialmente denominou a bactéria relacionada com a doença de *Bacillus botulinus*. Mais tarde renomeou-a de *C. botulinum* e designou de BoNTs as toxinas produzidas (Ting e Freiman, 2004).

No início de século XX foram realizados grandes avanços na compreensão da doença e dos agentes patogénicos envolvidos. Em 1919, Burke descreveu a existência de várias estirpes de *C. botulinum* que produzem toxinas serologicamente diferentes. Snipe e Sommer purificaram pela primeira vez a toxina em 1928 (Pellett, 2012; Zhang, 2010). Em 1949, Burgen, Dickens e Zatman demonstraram que as BoNTs bloqueiam a transmissão neuromuscular pela inibição da libertação de ACh (Pellett, 2012).

2. Etiologia

O botulismo está associado principalmente à espécie *C. botulinum*. Esta espécie bacteriana incorpora os microrganismos produtores de BoNTs com a capacidade de causarem botulismo em Humanos e animais (Collins e East, 1998).

C. botulinum é classificado como uma ampla espécie bacteriana com uma elevada diversificidade genotípica e fenotípica entre os microrganismos envolvidos, no entanto todos eles apresentam uma propriedade em comum, a produção de BoNTs (Johnson, 2005).

Esta classificação taxonómica baseada apenas na produção de BoNTs desencadeou o agrupamento na mesma espécie bacteriana de estirpes filogeneticamente distintas com propriedades metabólicas e de crescimento muito variáveis entre si. Com base na diversidade e nos diferentes serotipos de toxinas produzidas pelos microrganismos que constituem esta espécie bacteriana, estes foram classificados em quatro grupos taxonómicos diferentes (designados de I-IV) representados na Tabela 1 (Collins e East, 1998; McLauchlin et al., 2006; Popoff, 2014; Rossetto et al., 2014).

Tabela 1 – Diferenças fenotípicas entre os microrganismos produtores de BoNTs. Adaptado de Collins e East, 1998.

Caraterísticas	Grupos					
	I	II	III	IV	<i>C. butyricum</i>	<i>C. baratii</i>
Tipos de toxinas	A, B, F	B, E, F	C, D	G	E	F
Proteólise	+	-	-	+	-	-
Fermentação de:						
Glucose	+	+	+	-	+	+
Frutose	±	+	±	-	+	+
Manose	-	+	+	-	+	+
Maltose	±	+	±	-	+	+
Sacarose	-	+	-	-	+	+
Lipase	+	+	+	-	-	-
Temperatura ótima de crescimento	35-40 °C	18-25 °C	40 °C	37 °C	30-37 °C	30-45 °C
Temperatura mínima de crescimento	10 °C	3.3 °C	15 °C		10 °C	
Resistência dos esporos ao calor	112 °C	80 °C	104 °C	104 °C		

São bactérias formadoras de esporos altamente resistentes ao calor e amplamente distribuídas na natureza (solo, sedimentos de lagos e mares, legumes, vegetais, vísceras de crustáceos e intestino de mamíferos). Assumem a forma vegetativa sob condições ideais que se traduzem num meio com um pH > 4.5, com temperaturas de crescimento variáveis e abundância de matéria orgânica, sendo a anaerobiose outra condição indispensável à proliferação bacteriana (Rossetto et al., 2014; Tighe e Schiavo, 2013).

Nos seres Humanos, o botulismo é causado geralmente por estirpes que pertencem aos grupos I e II. O grupo I compreende estirpes bacterianas proteolíticas que produzem BoNTs dos serotipos A, B e F, enquanto que no grupo II estão englobadas as estirpes não proteolíticas produtoras de BoNTs dos serotipos B, E e F. Estes dois grupos bacterianos diferem também na resistência dos seus esporos quando sujeitos a temperaturas elevadas, temperatura de crescimento e outras características importantes para o seu crescimento e desenvolvimento (Beard e Chaddock, 2014; McLauchlin et al, 2006).

O grupo III compreende estirpes não proteolíticas produtoras de BoNTs dos serotipos C e D e estão normalmente associadas a infeções em animais (Montecucco e Rasotto, 2015). O grupo IV é o mais distinto do ponto de vista metabólico uma vez que representa microrganismos que não metabolizam hidratos de carbono (Beard e Chaddock, 2014).

Apesar de o botulismo estar associado a *C. botulinum*, a espécie bacteriana que engloba todas as estirpes produtoras de BoNTs, foram isoladas a partir de crianças com botulismo estirpes bacterianas pertencentes ao género *Clostridium* tradicionalmente classificadas como não patogénicas, produtoras de neurotoxinas com uma elevada homologia com as BoNTs. Estas estirpes incluem *C. butyricum* e *C. baratii* que estão associadas à produção de BoNTs dos serotipos E e F respetivamente e estão implicadas em vários casos de botulismo alimentar distribuídos numa ampla região geográfica (Johnson, 2005). Este facto pode estar associado à transferência horizontal de genes entre as diferentes espécies bacterianas, levando deste modo a que estirpes classificadas como não patogénicas se tornem patogénicas (McLauchlin et al., 2006; Rossetto et al., 2014).

3. As neurotoxinas de *Clostridium botulinum*

A elevada neurotoxicidade apresentada sob concentrações mínimas, fazem das BoNTs uma das substâncias mais letais até então conhecidas (Montecucco e Rasotto, 2015; Rossetto et al., 2013). De acordo com Zhang et al. (2010), seria necessário apenas uma grama de toxina cristalina para matar um milhão de pessoas.

Apresentam uma dose letal de 50% (DL50) que varia entre os 0.1-1 ng/Kg de peso corporal em ratos após administração intravenosa (Beard e Chaddock, 2014; Verderio et al., 2006). Nos humanos, a DL50 estimada varia de acordo com a via de administração estimando-se ser de 0.09-0.15 µg por via intravenosa e muscular, 0.70-0.90 µg por via inalatória e 70 µg por via oral (Beard e Chaddock, 2014).

São distinguidas imunologicamente em sete serotipos diferentes designados de A-G (Masuyer et al., 2011; Montecucco e Molgó, 2005). Recentemente foi proposto um novo serotipo (H), no entanto a sua aprovação está ainda dependente de novos dados experimentais (Montecucco e Rasotto, 2015; Rossetto et al., 2014). Os serotipos A, B, C, D, E e F estão ainda subdivididos em vários subtipos de acordo com a sua sequência de aminoácidos, estando descritos mais de 50 subtipos de toxinas diferentes (Alouf et al., 2015).

Os serotipos A, B e F são os que mais frequentemente se associam ao botulismo Humano, embora o serotipo F também esteja implicado em alguns casos mas com menor frequência. O serotipo C está associado à contaminação de aves, enquanto que o serotipo D pode causar a doença em diferentes espécies animais (Colhado et al., 2011).

As BoNTs partilham uma organização estrutural bem conservada entre os diferentes serotipos com uma constituição e peso molecular semelhantes (Capítulo II). Apresentam uma divergência na sequência de aminoácidos que varia entre 2.6-31.6% verificando-se no entanto sequências de aminoácidos altamente conservadas nos locais considerados essenciais para a sua toxicidade, como o local catalítico (Beard e Chaddock, 2014; Popoff, 2014).

Embora apresentem uma constituição e organização comum, as BoNTs exercem a sua atividade catalítica em proteínas distintas associadas ao complexo proteico SNARE (Tabela 2). Com exceção do serotipo C, as restantes BoNTs apresentam atividade apenas para um alvo proteico específico.

Tabela 2 – As BoNTs e os seus alvos proteolíticos. Adaptado de Goonetilleke e Harris, 2004.

	Toxina	Alvo
BoNTs	A	SNAP-25
	B	VAMP 2 (sinaptobrevina 2)
	C	SNAP-25, sintaxina 1
	D	VAMP 2 (sinaptobrevina 2)
	E	SNAP-25
	F	VAMP 2 (sinaptobrevina 2)
	G	VAMP 2 (sinaptobrevina 2)

3.1. O complexo proteico estrutural

As BoNTs apresentam-se associadas a componentes de natureza proteica através de ligações não covalentes, formando assim complexos proteicos moleculares (Figura 7). Dentro dos vários tipos de componentes proteicos associados às BoNTs, as hemaglutininas (HA) e as não toxico não hemaglutininas (NTNH) são as que têm desencadeado maior interesse de estudo pelo facto de estarem associadas principalmente à proteção das BoNTs após intoxicação oral, uma vez que estas oferecem uma grande

resistência às proteases e ao baixo pH encontrado ao nível gástrico (Gu e Jin, 2013; Sagane et al., 2012, Simpson, 2013).

Estudos de cristalografia por raio X e mais recentemente por microscopia eletrônica revelaram que as NTNH estão presentes em todas as BoNTs e apresentam uma sequência de aminoácidos bem conservada. As HA, assim designadas pela capacidade de agregar glóbulos vermelhos, apresentam-se classificadas em três tipos diferentes (HA1, HA2 e HA3) de acordo com a sequência de aminoácidos, estando distribuídas em diferentes porções nas diferentes BoNTs (Fujinaga, 2009; Gu e Jin, 2013; Sagane et al., 2012).

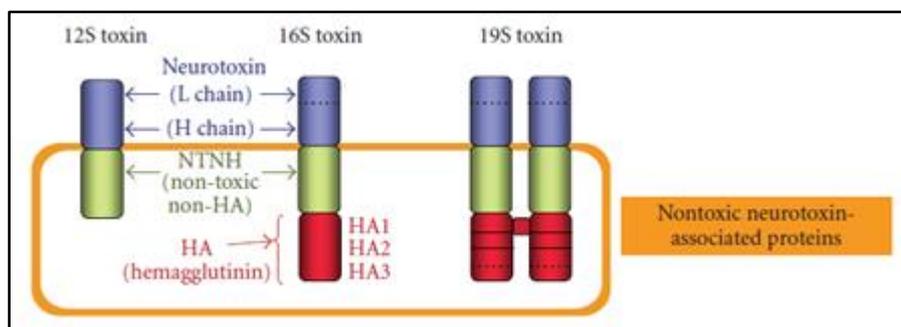


Figura 7 – Representação do complexo proteico estrutural das BoNTs. Adaptado de Fujinaga, 2009.

As HA e as NTNH, também designadas por componentes não tóxicos auxiliares, formam três tipos de complexos proteicos com as BoNTs classificados por 12S, 16S e 19S. Enquanto que nos complexos 12S as BoNTs apresentam-se associadas apenas à porção proteica auxiliar NTNH, nos complexos 16S as BoNTs encontram-se associadas às porções auxiliares HA e NTNH. Os complexos 19S apresentam a mesma estruturação proteica que os complexos 16S, presumindo-se serem dímeros de dois complexos 16S ligados por uma ou duas HA (Benefield et al., 2013; Fujinaga, 2009; Gu e Jin, 2013).

Dentro dos vários tipos de serotipos de BoNTs, verifica-se que o tipo A é produzido nos três tipos de complexos proteicos (12S, 16S e 19S). Os serotipos B, C e D são produzidos nas formas 12S e 16S, enquanto que os serotipos E e F são produzidos apenas na forma 12S. O serotipo G encontra-se sob a forma 16S (Fujinaga, 2009).

Como já foi referido anteriormente, as proteínas auxiliares associadas às BoNTs constituem uma importante barreira física à ação das proteases e ao baixo pH verificado ao nível gástrico. Este sistema protetor das BoNTs foi apoiado por diversos estudos realizados a partir de BoNTs isoladas, que demonstram que a toxicidade exercida por estas é significativamente menor em relação à toxicidade verificada entre a sua associação com as proteínas auxiliares (Fujinaga, 2009; Gu e Jin, 2013; Sagane et al., 2012; Simpson, 2013).

Embora seja reconhecido que as NTNH desempenham um papel fundamental na proteção das BoNTs uma vez que ensaios experimentais revelam que estas apresentam uma elevada resistência às condições adversas gástricas após associação com as toxinas, a função das NH ainda não está completamente esclarecida (Gu e Jin, 2013). O facto de as estripes bacterianas produtoras dos serotipos E e F não possuírem os genes codificadores das HA tem criado algumas dúvidas na sua função protetora, uma vez que estes serotipos não estão dependentes deste componente proteico para a sua absorção (Sagane et al., 2012).

Apesar de as HA e as NTNH fazerem parte da estrutura proteica das BoNTs, estas estão despromovidas de qualquer ação neurotóxica. O facto de se dissociarem a um pH e a uma força iónica semelhante ao verificado na circulação sanguínea e a capacidade das HA se agregarem com os glóbulos vermelhos, sugere que após absorção estas sofrem dissociação das BoNTs (Fujinaga, 2009; Simpson, 2013).

3.2. Vias de exposição e mecanismos invasivos

Embora a maioria dos casos notificados de botulismo tenham uma etiologia oral por ingestão de alimentos contaminados, esta doença está associada a outras vias de exposição das quais fazem parte a via inalatória (inalação de aerossóis com BoNTs) e a contaminação através de feridas cirúrgicas ou acidentais (Figura 8) (Simpson, 2004; Simpson, 2013). Outra via de exposição ocasional é a via iatrogénica mediada principalmente pela administração excessiva de BoNTs usadas para fins terapêuticos (Rossetto et al, 2014).

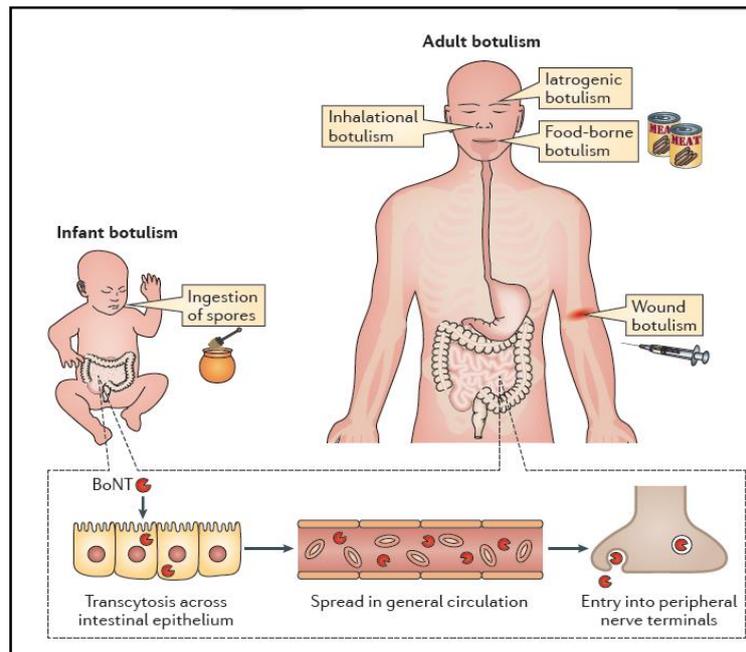


Figura 8 – Representação das vias de exposição associadas ao botulismo e mecanismos invasivos das BoNTs. Adaptado de Rossetto et al., 2014.

Dentro das várias vias de exposição à doença, estas podem ter origem numa intoxicação primária ou numa intoxicação secundária seguida de uma intoxicação primária. A intoxicação primária é desencadeada pelo contacto direto com as BoNTs previamente formadas podendo ocorrer após a ingestão de alimentos contaminados, inalação ou contato com objetos contaminados (Simpson, 2004).

Na intoxicação secundária, ocorre inicialmente uma contaminação com esporos bacterianos que após a colonização e germinação nos tecidos infetados libertam toxinas para o meio desencadeando de seguida uma intoxicação primária. Este tipo de intoxicação está associada principalmente à ingestão de alimentos contaminados com esporos, embora a sua incidência seja baixa derivado da incapacidade de proliferação bacteriana pela competição com a flora comensal do hospedeiro. No entanto, em latentes e em adultos sujeitos a terapêuticas com antibióticos este tipo de infeção é recorrente, uma vez que apresentam debilidades ao nível da flora comensal intestinal facilitando deste modo a proliferação do microrganismo invasor (Rossetto et al, 2014; Simpson, 2004).

Quanto aos mecanismos pelos quais as BoNTs atingem o sistema circulatório (sanguíneo e linfático) de modo a alcançarem o seu alvo neurotóxico, estes estão divididos em dois

mecanismos principais. O primeiro envolve a sua penetração através de lesões celulares onde as membranas celulares danificadas oferecem um fácil acesso das toxinas ao sistema circulatório. O segundo mecanismo envolve a sua absorção através das barreiras epiteliais intactas, sendo este um mecanismo essencial nos processos de intoxicação por via oral e inalatória (Simpson, 2013).

Uma vez que os mecanismos de absorção obedecem a processos complexos de associação entre as BoNTs e as células membranares epiteliais, foram desenvolvidos modelos avançados de pesquisa que compreendem: o desenvolvimento de técnicas que permitem a purificação das BoNTs; o reconhecimento das condições ideais para manter tanto os níveis de associação como dissociação com as proteínas auxiliares; o desenvolvimento de sistemas modelo para o estudo da absorção das toxinas com células Humanas imortalizadas de linhagem celulares do intestino e vias respiratórias; o desenvolvimento de ensaios sensíveis para a medição dos níveis de absorção (Simpson, 2013).

Os modelos em cima apresentados tornaram-se essenciais para desvendar os processos de absorção das BoNTs ao nível das barreiras epiteliais uma vez que permitiram revelar:

1. A absorção das toxinas associadas às proteínas auxiliares é efetuada por transporte ativo mediado por células epiteliais especializadas (células M). Este processo requer a sua ligação a recetores específicos localizados na superfície apical das células epiteliais envolvidas nos processos de endocitose, transocitose e libertação ao nível da superfície basal (Simpson, 2004; Simpson, 2013).

2. O domínio de ligação aos recetores epiteliais encontram-se ao nível da porção carboxi-terminal da HC das BoNTs, sendo este distinto do domínio de ligação verificado ao nível das células neuronais (Fujinaga, 2009; Simpson, 2004; Simpson, 2013). Estudos revelaram que a HC quando administrada isoladamente conserva a capacidade de atravessar as membranas epiteliais. Variantes de BoNTs que não possuem a capacidade de ligação às células neuronais retêm a capacidade de se ligar e atravessar as membranas epiteliais (Simpson, 2013).

3. O mecanismo de absorção das BoNTs não requer a ação das proteínas auxiliares. Embora seja referido que as HA estejam associadas a processos de ligação e reconhecimento de recetores das células epiteliais implicados na absorção das toxinas (Gu e Jin, 2013; Fujinaga, 2009), ensaios clínicos demonstraram que as toxinas isoladas a partir das proteínas auxiliares apresentam a mesma dose resposta em relação às toxinas associadas quando injetadas diretamente nos locais de absorção (Simpson, 2013). Já Sagane et al. (2012) referem que têm sido associados casos de botulismo a estirpes não portadoras do gene que codifica as HA. Estes factos apoiam o fundamento de que as proteínas auxiliares não são essenciais nos processos de absorção das BoNTs.

Após alcançarem a circulação sanguínea, as BoNTs têm de atravessar outra barreira fisiológica, o endotélio vascular periférico, para deste modo se difundirem para o espaço extracelular e finalmente atingirem o seu alvo neurotóxico (Rossetto et al., 2014; Simpson, 2004). Apesar de as referências que abordem este mecanismo sejam escassas, Simpson (2004) refere que à semelhança de outros componentes sanguíneos, tais como as imunoglobulinas e os elementos figurados do sangue, as BoNTs atravessam o endotélio através dos espaços intercelulares descartando assim qualquer mecanismo ativo associado a este processo.

Em contraste com o sistema vascular periférico, a barreira hematoencefálica é impermeável às BoNTs, o que explica de certo modo a ação colinérgica periférica exercida por estas neurotoxinas (Simpson, 2004).

4. Mecanismos de ação e efeitos adversos das neurotoxinas Botulínicas

A inibição da libertação de ACh ao nível dos terminais colinérgicos periféricos originando uma paralisia muscular flácida (Figura 9), representa o principal mecanismo de ação de todos os serotipos de BoNTs (Beard e Chaddock, 2014; Montecucco e Molgó, 2005; Rossetto et al., 2013, Silberstein, 2004). Colhado et al. (2011) acrescentam ainda que o mecanismo de ação das BoNTs não põe em causa a síntese e o armazenamento de ACh nos terminais pré-sinápticos, apenas inibe a sua libertação.

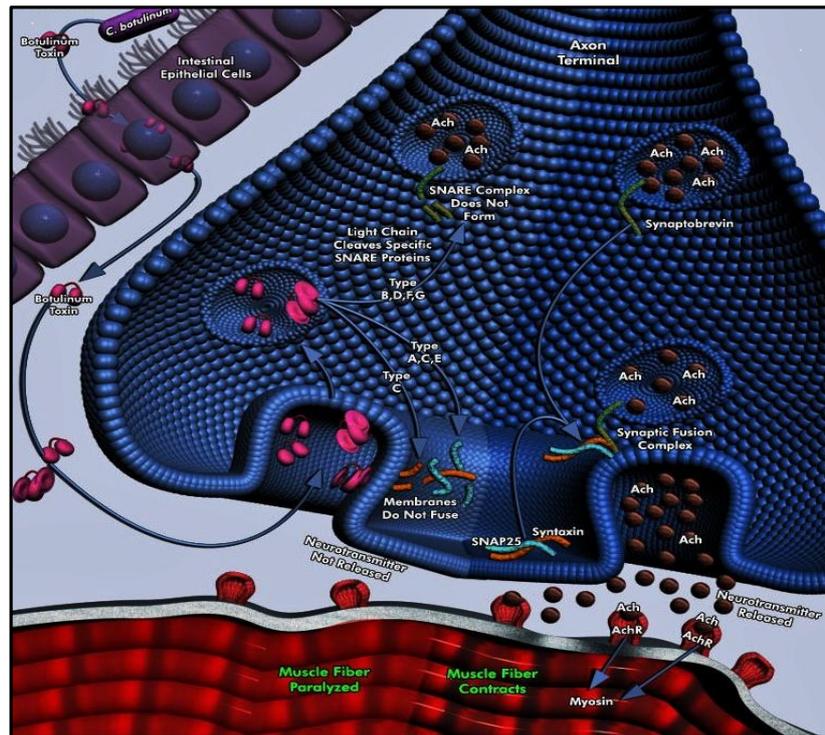


Figura 9 – Representação de um terminal colinérgico periférico. (Lado direito da imagem) Atividade neuromuscular normal mediada pela liberação de ACh ao nível da fenda sináptica. (Lado esquerdo da imagem) Atividade neuromuscular comprometida pela atividade proteolítica das BoNTs. Adaptado de Quiagen, 2003.

Após alcançarem os terminais colinérgicos periféricos, as BoNTs estão dependentes de quatro etapas fundamentais para exercerem o seu mecanismo de ação: (I) ligação neuroespecífica aos terminais pré-sinápticos envolvendo a interação com receptores específicos; (II) internalização para o citoplasma neuronal através da reciclagem de vesículas sinápticas; (III) translocação da LC através da membrana das vesículas sinápticas; (IV) Inibição da liberação de ACh por clivagem proteica do complexo proteico SNARE. Todos estes processos (fundamentados no capítulo II) fazem das BoNTs poderosas ferramentas neurotóxicas, em parte derivado da sua elevada sensibilidade e especificidade (Rossetto et al., 2013; Tighe e Schiavo, 2013; Verderio et al., 2006).

4.1. Inibição da neurotransmissão colinérgica periférica

O mecanismo da neurotransmissão colinérgica ocorre quando um potencial de ação despolariza a terminação nervosa pré-sináptica promovendo a liberação de ACh. Esta é

sintetizada no citoplasma neuronal a partir da acetil-CoA e colina através da enzima colina-acetiltransferase e armazenada no interior de vesículas sinápticas pela criação de um gradiente eletroquímico de prótons no interior das vesículas gerado por uma ATPase (King e Jennifer, 2002).

A libertação de ACh ao nível dos terminais colinérgicos periféricos é amplamente influenciada pelo complexo proteico SNARE, que media a fusão das vesículas sinápticas que contem a ACh com a membrana pré-sináptica. Após a fusão das membranas, a ACh é libertada para a fenda sináptica ligando-se posteriormente a recetores específicos das fibras musculares de modo a criar um potencial de membrana que vai desencadear uma resposta contrativa ao nível muscular (King e Jennifer, 2002).

A inibição da neurotransmissão colinérgica periférica é altamente afetada pela ação neurotóxica das BoNTs, uma vez que estas apresentam uma elevada especificidade proteolítica pelas proteínas do complexo SNARE. Quando presentes nos terminais colinérgicos periféricos a sua ação impede a fusão das vesículas sinápticas com a membrana pré-sináptica, no que se traduz na inibição da libertação de ACh ao nível dos terminais nervosos levando deste modo a uma paralisia muscular (Dolly e Aoki, 2006; Verderio et al., 2006).

Embora os efeitos neurotóxicos das BoNTs em casos de botulismo estejam associados a casos muito graves de paralisia muscular, estes são temporários e reversíveis uma vez que não causam degeneração neuronal. A duração dos efeitos tóxicos é determinante na severidade dos efeitos causados pela inibição colinérgica. Doentes com paralisias musculares graves podem recuperar totalmente se a morte por insuficiência respiratória for impedida por ventilação mecânica (Montecucco e Molgó, 2005; Rossetto et al., 2013; Rossetto et al., 2014).

A reversão da paralisia desencadeia-se por dois mecanismos diferentes. O primeiro ocorre pela formação de novas placas terminais restabelecendo deste modo a comunicação neuronal. O segundo envolve a inativação intracelular da porção catalítica das BoNTs por proteases endógenas e o restabelecimento de novas proteínas do complexo SNARE por síntese neuronal (Montecucco e Molgó, 2005; Rossetto et al., 2013).

A duração do efeito está associada ao serotipo envolvido na intoxicação, dose administrada e terminais colinérgicos afetados. Os serotipos A e C induzem efeitos mais prolongados, estando atribuídos efeitos de menor duração ao serotipo E. Embora os mecanismos pelos quais as BoNTs exercem efeitos neurotóxicos com diferentes durações não estejam completamente esclarecidos, os diferentes tempos de semi-vida da LC no citoplasma neuronal e os diferentes mecanismos bioquímicos envolvidos no restabelecimento de novas proteínas neuronais podem contribuir para tal (Rossetto et al., 2000).

Embora os efeitos neurotóxicos das BoNTs estejam associados principalmente à inibição periférica dos terminais colinérgicos dos músculos esqueléticos, a sua ação envolve também o sistema nervoso autónomo (SNA) uma vez que este se encontra amplamente associado à inervação colinérgica periférica (Dressler, 2013).

4.1.1. Efeitos ao nível dos músculos esqueléticos

A estimulação dos músculos esqueléticos é efetuada principalmente pela comunicação entre os α -neurónios e a fibras musculares esqueléticas (Figura 10). A ação direta das BoNTs ao nível dos α -neurónios leva a uma paralisia flácida de forma progressiva e duradoura (Sposito, 2009). O serotipo A está envolvido nos casos mais graves podendo os seus efeitos persistirem entre 4-6 meses (Montecucco e Molgó, 2005).

Para além da ação direta nos α -neurónios, as BoNTs estão também envolvidas no bloqueio de libertação de ACh ao nível dos λ -neurónios que estabelecem ligação com as fibras musculares intrafusais que formam os fusos musculares (Casale e Tugnoli, 2008; Sposito, 2009).

Os fusos musculares estão envolvidos no controlo dos movimentos causados pelas distensões musculares, estando também associados ao processo fundamental da regulação da atividade motora, o reflexo miotático. Quando ocorre uma distensão muscular, o fuso muscular gera sinais aferentes para a espinal medula estimulando desta forma os α -neurónios (Figura 10) (Sposito, 2009).

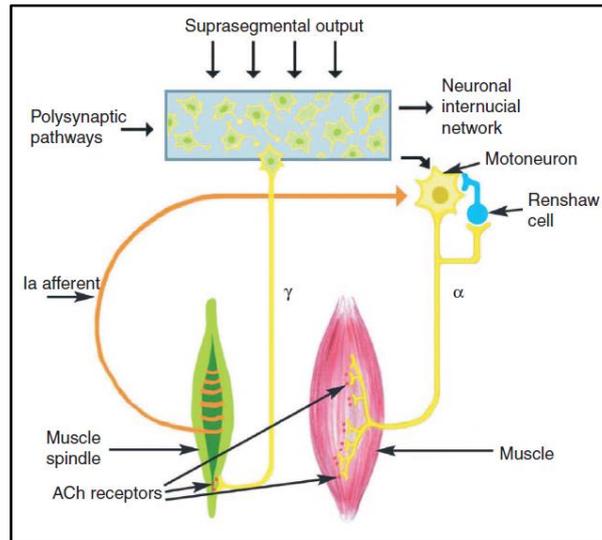


Figura 10 – Representação esquemática dos mecanismos implicados na regulação da contração dos músculos esqueléticos. Adaptado de Casale e Tugnoli, 2008.

As BoNTs quando presentes ao nível dos fusos musculares bloqueiam a neurotransmissão entre os λ -neurónios e as fibras musculares intrafusais pelo bloqueio da libertação de ACh, traduzindo-se numa inibição indireta da excitabilidade dos α -neurónios pela redução dos sinais aferentes emitidos para a espinal medula. Desta forma, as BoNTs não só estão envolvidas na diminuição de forma indireta no tónus muscular, como também inibem o reflexo espinal (Casale e Tugnoli, 2008; Palomar e Mir, 2012; Sposito, 2009).

4.1.2. Alterações sobre o Sistema Nervoso Autónomo

O SNA ou sistema vegetativo inerva todos os órgãos internos através de uma rede de fibras nervosas de condução lenta. Está dividido em dois sistemas principais, o sistema simpático e o parassimpático (Figura 11) que assumem como principal função o controlo do equilíbrio fisiológico sob alterações das condições externas (Ebnesahidi, 2010).

As vias eferentes têm origem na espinal medula e no tronco cerebral, sendo a ACh o neurotransmissor das sinapses pré-ganglionares para ambos os sistemas. No sistema nervoso simpático todas as sinapses pós-ganglionares são noradrenérgicas exceto as glândulas sudoríparas que assumem uma sinapse colinérgica, podendo estas serem afetadas pela ação das BoNTs. Quanto ao sistema nervoso parassimpático, todas as

sinapses pós-ganglionares são de origem colinérgicas sofrendo deste modo um forte impacto da ação toxica das BoNTs (Casale e Tugnoli, 2008; Dressler, 2013).

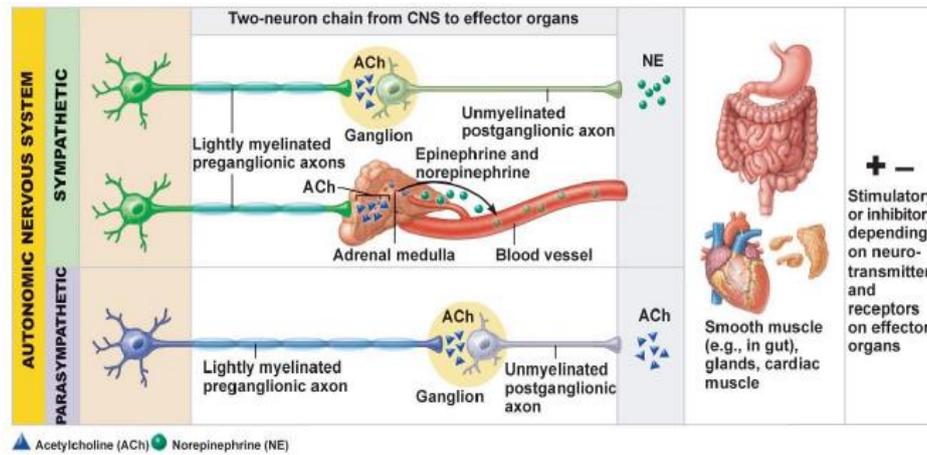


Figura 11 – Divisão do SNA no sistema simpático e parassimpático. Representação dos neurotransmissores envolvidos ao nível do sistema nervoso periférico. Adaptado de Ebnesahidi, 2010.

O efeito anticolinérgico das BoNTs sobre os músculos controlados pelo SNA é idêntico à ação sobre os músculos esqueléticos, verifica-se no entanto uma duração da ação 3-4 vezes superior (Rossetto et al, 2014). A inibição da libertação de ACh ao nível dos terminais nervosos pode desencadear efeitos locais ou sistémicos dos quais se destacam: redução da salivação; alterações visuais (diplopia e presbiopia); retenção urinária; obstipação; hipotensão postural; hipotermia; perda do controlo vagal (Casale e Tugnoli, 2008; Dressler, 2013; Sposito, 2009; Tighe e Schiavo, 2013).

5. Bloqueio da libertação de neurotransmissores relacionados com a dor

Embora seja reconhecido que as BoNTs através da paralisia muscular local e da redução global da contração muscular estejam associadas ao alívio da dor, este mecanismo por si só não explica completamente a sua ação analgésica (Silberstein, 2004).

O tratamento com BoNTs para distúrbios motores, para além do relaxamento muscular demonstrava também significativos benefícios sobre a dor e que não necessariamente correspondia às regiões neuromusculares afetadas. Isto sugeriu que os efeitos sobre a dor

eram independentes dos efeitos musculares e poderiam ter efeitos de ação independentes (Pavone e Luvisetto, 2010; Sposito, 2009).

A sensibilização periférica das fibras nociceptivas através da inibição da libertação de neurotransmissores relacionados com a dor é outro processo associado às BoNTs (Figura 12). As BoNTs são capazes de bloquear a libertação não só de neurotransmissores clássicos como o glutamato, mas também de neuropéptidos como a substância P (SP) e o péptido relacionado com o gene da calcitonina (CGRP) cujo papel na modulação da dor é fundamental (Guo et al., 2013; Pavone e Luvisetto, 2010; Sheean, 2002).

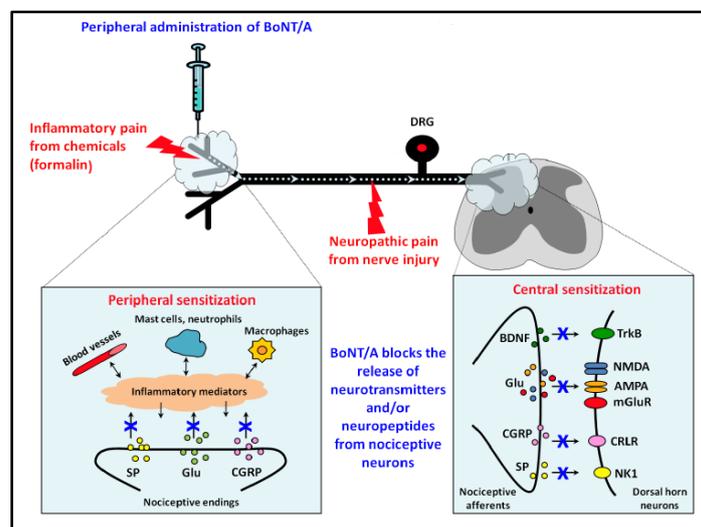


Figura 12 – Mecanismos de inibição da libertação de neurotransmissores e neuropéptidos relacionados com a dor pela ação da BoNT do serotipo A. A inibição periférica inclui a inibição de glutamato (Glu), substância P (SP) e o péptido relacionado com o gene da calcitonina (CGRP). Adaptado de Pavone e Luvisetto, 2010.

Foi demonstrado que a BoNT do serotipo A inibe a dor inflamatória induzida após a injeção de formaldeído em ratos de forma dose dependente. Esta inibição está associada à redução da libertação de glutamato nos terminais nociceptivos periféricos. (Silberstein, 2004.) Para além da dor, também se verificou a redução do edema localizado que geralmente é consequência de processos de sensibilização do sistema nervoso central (SNC). Este segundo efeito sugere não só a inibição de glutamato, mas também de SP e CGRP que estão associados ao aumento da permeabilidade capilar e vasodilatação periférica (Pavone e Luvisetto, 2010).

6. Efeitos diretos e indiretos ao nível do Sistema Nervoso Central

Currà et al. (2004) referem que não existem evidências convincentes de que as BoNTs agem diretamente no SNC, no entanto Caleo e Schiavo (2009) afirmam que apesar dos mecanismos ainda não estarem bem compreendidos, as BoNTs estão associadas a efeitos diretos relacionados com a inibição de neurotransmissores ao nível do SNC. Segundo estes, as BoNTs quando administradas ao nível periférico estão associadas a alterações dos SNC que incluem: alterações relacionadas com o córtex motor em dois indivíduos tratados com BoNTs do serotipo A; presença de sinais piramidais num indivíduo com botulismo; estudos com macacos sensibilizados com BoNTs revelam alterações corticais (Caleo e Schiavo, 2009).

O facto da barreira hematoencefálica constituir um obstáculo à passagem das BoNTs para o SNC representa o principal obstáculo na compreensão dos mecanismos envolvidos por estas toxinas ao nível central. Está descrito que mesmo em concentrações elevadas as BoNTs não ultrapassam a barreira hematoencefálica (Currà et al., 2004; Palomar e Mir, 2012).

Vários estudos pressupõem a ideia de que as BoNTs sofrem um transporte axonal reverso através dos neurónios motores de modo atingirem o SNC. A administração periférica de toxinas marcadas com compostos radioativos revelaram que estas são transportadas para diferentes porções do SNC, que variam desde a espinal medula ao parênquima cerebral. Estes resultados são demonstrados apenas com concentrações elevadas de toxinas e muitas das vezes verifica-se que só pequenos fragmentos degradados ou toxinas na sua forma inativa é que conseguem alcançar o SNC (Caleo e Schiavo, 2009; Casale e Tugnoli, 2008; Currà et al., 2004).

Neste sentido, apesar dos esforços em tentar compreender os mecanismos pelos quais as BoNTs exercem efeitos ao nível do SNC, ainda há muito trabalho na área de investigação a ser realizado (Simpson, 2013).

Em relação aos efeitos indiretos provocados pela BoNTs no SNC destacam-se: a diminuição dos reflexos pela espinal medula após a inibição periférica dos λ -neurónios

dos fusos musculares (Dressler et al., 2005; Palomar e Mir, 2012); o bloqueio dos processos da sensibilização central pela inibição periférica dos nociceptores (Figura 12) (Dolly e Aoki, 2006; Pavone e Luvisetto, 2010).

7. Manifestações clínicas da doença

As manifestações clínicas da doença refletem sobretudo os efeitos exercidos pelas BoNTs ao nível SNA e neurónios motores, que se caracterizam por um comprometimento autónomo disseminado e uma paralisia flácida motora descendente a partir dos nervos cranianos (Brook, 2006; Johnson, 2005).

Os primeiros sinais e sintomas neurológicos podem ser inespecíficos tais como cefaleia, fraqueza muscular, vertigem e tonturas. A disfunção dos nervos cranianos traduz-se inicialmente por uma disfunção ocular (Figura 13) que pode levar à visão turva, ptose palpebral uni ou bilateral, dificuldade de convergência dos olhos e diplopia decorrente da paralisia da musculatura extrínseca do globo ocular. Os movimentos dos globos oculares tornam-se limitados, podendo haver oftalmoplegia, no entanto, não há perda da acuidade visual. Por comprometimento do SNA ocorre a dilatação das pupilas e perda de fotossensibilidade (Johnson, 2005; Zhang et al., 2010).

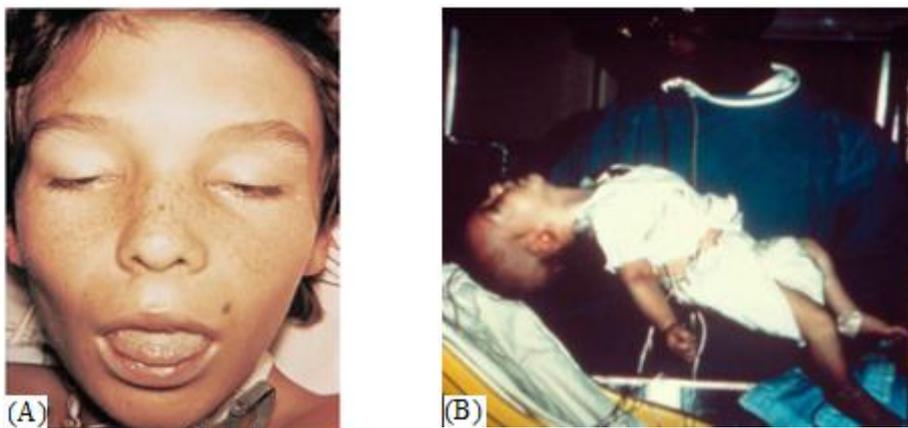


Figura 13 – Manifestações clínicas do Botulismo. (A) Jovem com sinais clínicos da doença em fase inicial. (B) Criança com botulismo em fase avançada da doença. Adaptado de Johnson, 2005; CDC, 2015.

Os sinais e sintomas oculares são seguidos por fraqueza dos músculos responsáveis pela mastigação, deglutição e fala, o que pode levar a disfagia. Além disso, pode-se observar

a redução dos movimentos da língua, do palato e da musculatura cervical (dificuldade para sustentar o pescoço) (Johnson, 2005).

Com a evolução da doença, a fraqueza muscular pode propagar-se de forma descendente para os músculos do tronco e membros, o que pode ocasionar dispneia, insuficiência respiratória e tetraplegia flácida. A fraqueza muscular nos membros é tipicamente simétrica acometendo com mais intensidade os membros superiores do que os membros inferiores. Como a toxina produz bloqueio neuromuscular, os reflexos profundos estão diminuídos ou abolidos nos membros (McLauchlin et al, 2006).

A disfunção autónoma leva ao aparecimento de obstipação intestinal, retenção urinária, hipotensão, xerostomia e diminuição da sudorese (Johnson, 2005).

Uma característica importante no quadro clínico do botulismo é a preservação da consciência e função mental ao longo da doença. Na maioria dos casos, não há comprometimento da sensibilidade o que auxilia no diagnóstico diferencial com outras doenças neurológicas (Brook, 2006).

Com a evolução da doença, verifica-se uma fraqueza muscular extrema com a incapacidade do doente levantar a cabeça e os membros (Figura 13), que culmina com a morte geralmente associada à insuficiência respiratória por disfunção (Johnson, 2005).

8. Epidemiologia

O botulismo é uma doença amplamente distribuída por todo o mundo (Johnson, 2005; Zhang et al., 2010). Embora apresente uma baixa taxa de incidência, a sua declaração é obrigatória na maioria dos países desenvolvidos derivado da elevada morbilidade e mortalidade associada (Johnson, 2005). Em Portugal o botulismo é uma doença de declaração obrigatória desde 1999 (Malveiro et al., 2013; Neto et al., 2009).

Nos Estados Unidos da América de acordo com a *Center of Diseases Control and Prevention* (CDC), entre 2001-2011 foram reportados em média 141 casos de botulismo por ano com 2% de casos associados a mortes. Dados mais recentes apontam para um

total de 153 casos de botulismo (confirmados laboratorialmente) reportados à CDC em 2013 sem ocorrência de mortes associadas (CDC, 2015).

Em Portugal, nos anos 2005 e 2006 foram declarados apenas 7 e 10 casos respetivamente (Neto et al., 2009). De acordo com a Direção Geral de Saúde (DGS) (2014), entre 2009-2012 foram notificados 6 casos de botulismo em Portugal em que a grande maioria dos casos ocorreram a norte do território nacional, com uma faixa etária predominante entre os 25-34 anos de idade.

Epidemiologicamente o botulismo é caracterizado em quatro categorias que compreendem o botulismo alimentar, o botulismo infantil, o botulismo associado a feridas e o de classificação indeterminada. A maioria dos casos está associada ao botulismo alimentar e infantil, embora nos últimos anos se tenha verificado um aumento do número de casos associado ao botulismo mediado por feridas entre os consumidores de drogas injetáveis (CDC, 2012; Neto et al., 2009; Shapiro et al., 1998).

8.1. O botulismo alimentar

O botulismo alimentar está associado ao consumo de alimentos contaminados com BoNTs previamente sintetizadas e libertadas para o meio, após a germinação de esporos de *C. botulinum*. Os alimentos preparados em casa como os fumados, fermentados e as conservas caseiras de carne, peixe, frutas e vegetais submetidas a vácuo constituem o principal veículo de contaminação com BoNTs (Johnson, 2005; Zhang et al., 2010).

A confeção inadequada dos alimentos a baixas temperaturas e o armazenamento sob condições que favorecem a germinação dos esporos bacterianos (ausência de oxigénio, pH > 4.6) constituem os principais fatores de risco do botulismo alimentar (Shapiro et al., 1998).

Ao longo do tempo tem-se verificado uma acentuada diminuição do número de casos de botulismo alimentar associados a alimentos comercializados, em parte devido às medidas cada vez mais exigentes no controlo de contaminações bacterianas exigidos à indústria alimentar (Johnson, 2005). Deste modo, foram tomadas medidas que incluíram a

diminuição do tempo de prateleira, adição de conservantes e a exposição dos alimentos a temperaturas e pressões elevadas, sobretudo nas conservas alimentares, para prevenir novos casos da doença. Já as conservas comerciais não esterilizáveis, especialmente de vegetais, podem ser seguras desde que submetidas à acidificação ou outras manipulações adequadas para inibir o desenvolvimento microbiano (Dürre, 2007).

De acordo com Johnson (2010), o risco de botulismo alimentar está associado às regiões onde predominam as estripes produtoras de BoNTs dos serotipos A, B e E. As primeiras regiões mundiais com relatos de botulismo alimentar em Humanos incluem a Ásia (China e o Japão), América do Norte, alguns países da Europa (Polónia, Alemanha, França, Itália, Espanha, Portugal, Dinamarca e Noruega), Médio Oriente, América Latina, Rússia e África do Sul (Johnson, 2005).

Nos Estados Unidos da América entre 1990-2000 foram notificados 263 casos de botulismo associados à ingestão de alimentos contaminados a partir de 160 eventos, onde se verificou uma taxa de mortalidade de 4%. Na região do Alasca ocorreram 103 casos na sua maioria associados à BoNT do serotipo E (90%), tendo como principal causa a ingestão de alimentos tradicionalmente consumidos pelos nativos (carne de mamíferos marinhos e peixes fermentados). Nos restantes estados, a BoNT do serotipo A foi associada a 51% dos casos, onde os alimentos não comercializados foram implicados em 70 eventos (91%), dos quais 44% foram associados ao consumo de conservas caseiras de vegetais (Sobel et al., 2004).

Na Europa, a maioria dos surtos de botulismo são causadas pelas carnes enlatadas ou curadas de forma inadequada, como presuntos ou salsichas, na sua maioria associados à ingestão de alimentos contaminados com a BoNT do serotipo B (Johnson, 2005). A Polónia constitui o país Europeu onde ocorrem mais casos da doença, em parte devido às práticas de preservação dos alimentos (jarras hermeticamente seladas). No ano 2002 foram registrados 85 casos de botulismo transmitidos por alimentos. Os derivados da carne foram os principais veículos de BoNTs (68,2%). As conservas caseiras preparadas com carne de porco (23,5%) e salsichas produzidas comercialmente (20%) constituíram os produtos alimentares que mais contribuíram para a propagação da doença (Cereser et

al., 2008). Em comparação, a doença é relativamente rara no Reino Unido onde foram apenas reportados 62 casos entre 1962-2005 (McLauchlin et al, 2006).

De acordo com Delbos et al. (2005) a França e a Itália constituem os países Europeus com a segunda maior taxa de incidência de casos de botulismo, com uma média de 30 casos relatados por ano. O consumo de produtos de charcutaria e conservas alimentares constituem a principal causa da doença que está amplamente associada à intoxicação pela BoNT do serotipo B (Delbos et al., 2005).

Em Portugal, ao contrário de outros países Europeus não possui um sistema nacional de controlo e vigilância de doenças de origem alimentar, pelo que o número de ocorrências registado é muito limitado (Batista e Antunes, 2005). No entanto, de acordo com o 7º relatório da *World Health Organization* (WHO) do programa de vigilância e controlo de doenças de origem alimentar na Europa, tendo como base dados fornecidos pelo Instituto Nacional de saúde, de 113 surtos de origem alimentar ocorridos em Portugal entre 1993-1998 em que se conseguiu identificar o agente infeccioso, 37.2% foram associados à espécie *C. botulinum* (Figura 14). Entre os surtos verificados, foram relatados 42 casos individuais de intoxicação causada por este agente infeccioso, onde se verificou que 37 casos foi associada ao consumo de alimentos contaminados com a BoNT do serotipo B (WHO).

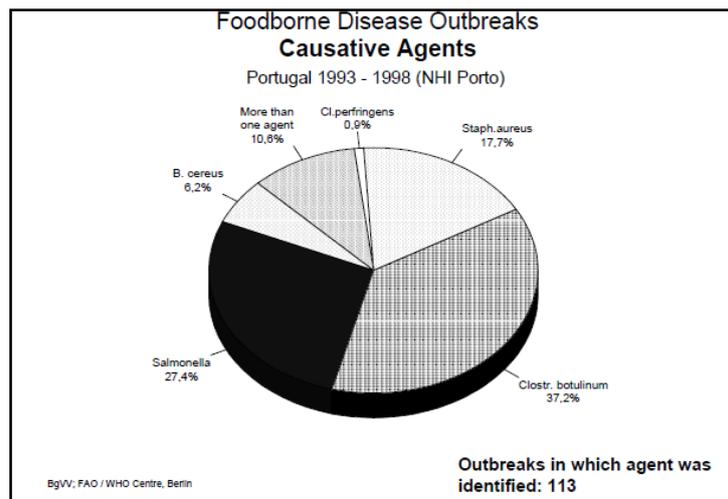


Figura 14 – Surtos de origem alimentar ocorridos em Portugal entre 1993-1998 e os respetivos agentes microbianos. Dados do 7º relatório da WHO do programa de vigilância e controlo de doenças de origem alimentar na Europa tendo como base dados fornecidos pelo Instituto Nacional de saúde. Adaptado de WHO.

Num estudo retrospectivo efetuado a 5 casos de botulismo alimentar diagnosticados no Hospital Pedro Hispano – Unidade Local de Saúde de Matosinhos, verificou-se que 4 casos associaram-se à ingestão de presunto e 1 caso ao consumo de atum em conserva, onde foi possível isolar a BoNT do serotipo B no soro de um doente infetado e no produto alimentar de mais 2 casos (Cardoso et al., 2004).

Em termos gerais pode-se afirmar que a ocorrência do botulismo alimentar está fortemente associada a hábitos culturais de preservação e consumo de alimentos (Johnson, 2005; Sobel et al., 2004). As BoNTs dos serotipos A e B são as principais responsáveis pela doença nas regiões com clima mais temperado, enquanto que a BoNT de serotipo E é a mais prevalente nas regiões mais frias (Johnson, 2005).

Quanto às medidas de prevenção da doença estas incluem: o melhoramento das condições de higiene durante o manuseamento dos alimentos; evitar a conservação dos alimentos em frascos de vidro ou plástico transparente de modo a prevenir a fermentação dos alimentos através da luz solar; processos de conservação de alimentos com condições que evitem a proliferação de *C. botulinum*, juntamente com instruções de refrigeração; medidas de sensibilização da população que visem as boas práticas de conservação e consumo de alimentos; apelar à comunicação de todos os casos suspeitos às autoridades de Saúde Pública de modo a serem tomadas as respetivas medidas para prevenir novos casos adicionais e novos fatores de risco (Johnson, 2005; Sobel et al., 2004).

8.2. O botulismo infantil

O botulismo infantil caracteriza-se pela colonização intestinal de *C. botulinum* principalmente em crianças entre uma semana e um ano de idade. Está amplamente associada à imaturidade da flora comensal intestinal dos latentes, em que a ingestão de esporos bacterianos conduz à germinação e colonização bacteriana com a consequente produção e libertação de toxinas para o meio, desencadeando deste modo a doença pelos mecanismos anteriormente descritos (Famularo, 2009; Fenicia e Anniballi, 2009; Rosow e Strober, 2015).

De acordo com Rosow e Strober (2015), as crianças que vivem em ambiente rural/agrícola são mais suscetíveis em relação às crianças que vivem no meio urbano, uma vez que a exposição aos solos contaminados poderá estar associado a um aumento da incidência da doença.

A ingestão de mel contaminado e a deglutição de esporos associados a partículas de poeira microscópicas têm sido associados a muitos casos de botulismo infantil, embora na maioria dos casos a fonte de contaminação seja desconhecida (Famularo, 2009; Fenicia e Anniballi, 2009; Rosow e Strober, 2015).

O mel e os seus produtos derivados estão associados a 15% dos casos de botulismo infantil reportados pela CDC (Famularo, 2009). O mel pelas suas características não pode sofrer tratamento térmico capaz de destruir os esporos bacterianos, constituindo assim um importante veículo à propagação da doença (Sobel et al., 2004). As principais causas de contaminação do mel com esporos de *C. botulinum* são: o pólen, o trato digestivo das abelhas, poeiras dos solos e a contaminação cruzada pelas mãos do manipulador e equipamento (Saraiva et al., 2013).

A obstipação intestinal pode também ser um fator de risco para a doença em crianças com idade superior a dois meses. A diminuição da motilidade do colón permite aos esporos bacterianos terem mais tempo para germinar e desencadearem deste modo a produção de toxinas ao nível intestinal (Rosow e Strober, 2015).

O primeiro caso diagnosticado de botulismo infantil ocorreu em 1976 (Rosow e Strober, 2015), tendo sido identificados até 2007 cerca de 3000 casos distribuídos a nível mundial representando hoje em dia a principal causa de botulismo Humano (Fenicia e Anniballi, 2009).

Nos Estados Unidos da América de 2001 a 2013 foram reportados em média 100 casos de botulismo infantil, com dois casos de mortes associadas. O ano de 2013 registou 135 casos reportados com uma média de idade de 16 semanas que variou entre 1-43 semanas. Verificou-se também que 42% dos casos estiveram associados à BoNT do serotipo A e 55% à BoNT do serotipo B (CDC, 2015).

Em Portugal sendo uma doença de declaração obrigatória desde 1999, o primeiro registo notificado ocorreu em Novembro de 2009 num latente de um ano de idade do sexo masculino (Saraiva et al., 2013). Foi detetada a BoNT do serotipo B nas fezes do latente, estando o caso associado à ingestão de mel caseiro e a uma infusão de ervas de camomila, onde ambos produtos eram provenientes da Moldávia (Malveiro, 2013; Saraiva et al., 2013).

Tendo em conta os dados apresentados, é importante tomar medidas preventivas que evitem a contaminação dos latentes das quais se destacam: evitar o consumo de mel em crianças com menos de 12 meses de idade; manipulação da flora comensal dos latentes através de prebióticos e probióticos, embora os seus benefícios sejam questionáveis; uso de suplementos alimentares pasteurizados (Fenicia e Anniballi, 2009).

V. O Tétano

O tétano é uma doença infecciosa que está associada à TeNT, uma potente neurotoxina produzida por *C. tetani*, que se traduz por rigidez e espasmos musculares descontrolados implicados na elevada mortalidade associada à doença (Johnson, 2005).

1. Enquadramento histórico

O tétano (do latim *tetanus*, ou contração) foi primeiramente descrito por Hipócrates (Grécia, IV d.C.) como uma contração espasmódica dos músculos esqueléticos, aparecendo também descrito na Bíblia e em manuscritos do Antigo Egipto (Rossetto et al., 2013).

Durante vários séculos as causas implicadas na doença permaneceram desconhecidas até que em 1884 Carle e Rattone demonstram a etiologia bacteriana da doença através da administração de amostras purulentas em animais (Mallick¹ e Winslet, 2004). Em 1989, foi demonstrado que uma toxina bacteriana de origem proteica era responsável por todos os sintomas associados à doença (Rossetto et al., 2013). Nesse mesmo ano, Kitasato isolou pela primeira vez *C. tetani*, reportando mais tarde que a toxina poderia ser inativada por anticorpos específicos (Farrar et al., 2000).

As descobertas seguintes basearam-se no desenvolvimento de métodos de imunização Humana de modo a travar as elevadas taxas de incidência da doença. Em 1987, Nocard demonstrou que a antitoxina do tétano poderia induzir a imunidade passiva no Homem. Um método para inativar a TeNT com formaldeído foi desenvolvido por Ramon no início dos anos 1920, que levou ao desenvolvimento do toxoide tetânico em 1924 por Descombey, que foi amplamente usado na prevenção do tétano induzido por feridas durante a I Guerra Mundial (Bhatia et al., 2002; Rossetto et al., 2013).

Apesar da existência de vacinação efetiva e da intenção que a WHO possuía em erradicar a doença até ao já passado ano de 1995, esta patologia permanece endémica em muitos dos países subdesenvolvidos (WHO, 2005).

2. Agente etiológico – *Clostridium tetani*

C. tetani é o agente etiológico associado ao tétano. Dentro do género *Clostridium*, representa uma das espécies bacterianas melhor caracterizada, estando associada à produção da TeNT que está implicada nos processos patológicos que caracterizam a doença (Johnson, 2005).

Ao contrário de *C. botulinum*, *C. tetani* constitui uma espécie bacteriana homogénea, apresentando no entanto estirpes toxinogénicas e não toxinogénicas que se relacionam tanto fenotipicamente com genotipicamente. Dados de hibridação de DNA revelam uma percentagem de similaridade que varia entre os 85-93% entre as estirpes bacterianas (Connan et al., 2013). Análises sequências de DNA demonstraram que as estirpes não toxinogénicas não possuem o gene codificante da TeNT que se encontra ao nível de um plasmídeo bacteriano (Johnson, 2005; Rossetto et al., 2013).

Morfologicamente, para além das características que caracterizam o género bacteriano, *C. tetani* apresenta-se como uma espécie bacteriana que apresenta mobilidade por flagelos peritriquios que são perdidos após o desenvolvimento de endoesporos (Farrar et al., 2000). A presença de endoesporos terminais confere uma morfologia bacteriana em forma de baqueta ou raquete de ténis (Johnson, 2005).

São caracterizadas como bactérias anaeróbias estritas, termolábeis, que apresentam um crescimento ótimo a 37 °C e a um pH ligeiramente ácido (7-7.4). Não fermentam hidratos de carbono usando a via proteolítica como principal fonte de energia (Johnson, 2005).

Os esporos bacterianos encontram-se amplamente distribuídos pela natureza, podendo estar presentes no solo e fezes de animais e Humanos (Hsu e Groleau, 2001). São extremamente resistentes a temperaturas elevadas, podendo persistir sobre condições adversas durante longos períodos de tempo, estando a sua eliminação dependente de processos de autoclavagem que obedecem a uma temperatura de 120°C e uma pressão de 1,5 bar durante 15 minutos (Farrar et al., 2000).

Após a germinação dos esporos, *C. tetani* produz duas toxinas distintas, a TeNT e uma hemolisina sensível ao oxigénio denominada de tetanolisina, cuja função ainda não está completamente esclarecida. A tetanolisina relaciona-se funcionalmente e geneticamente com outras hemolisinas bacterianas (estreptolisina O), que estão associadas à lise de várias células, das quais se destacam as células sanguíneas, sendo a sua atividade lítica facilmente inibida por baixas concentrações de oxigénio (Johnson, 2005).

Para além das toxinas, outros fatores de virulência são associados a *C. tetani*. Estudos de sequenciação de DNA revelaram que várias proteínas associadas a processos patogénicos são codificadas por estes microrganismos das quais se destacam: colagenases; proteínas de adesão; lípases e peptidases (Bruggemann et al., 2012; Connan et al., 2013). À semelhança de outros grupos bacterianos, estas proteínas revelam-se como ferramentas fundamentais para os processos implicados na colonização do hospedeiro (Johnson, 2005).

3. Modo de transmissão

A transmissão de *C. tetani* está associada principalmente a focos infecciosos originados a partir de feridas cirúrgicas e não cirúrgicas, embora em cerca de 20% dos casos não se consiga identificar a origem da doença (Taylor, 2006). Os esporos bacterianos constituem a fonte de contaminação inicial da doença, que após germinação nos tecidos infetados desencadeiam a colonização e o crescimento bacteriano com a consequente síntese e

libertação de toxinas para o meio após autólise bacteriana (Hsu e Groleau, 2001; Mallick e Winslet, 2004).

As principais fontes de contaminação constituem feridas originadas a partir de material cirúrgico mal descontaminado, queimaduras, feridas acidentais com metais enferrujados contaminados, infecções orais, mordidas de animais e a contaminação neonatal. O consumo de drogas injetáveis contaminadas com substâncias adulterantes e uso de seringas contaminadas estão amplamente associados á propagação da doença entre os consumidores (Goonetilleke e Harris, 2004; Mallick e Winslet, 2004).

A germinação dos esporos nas feridas contaminadas não é imediata derivado das condições desfavoráveis ao nível dos tecidos infetados, podendo a sua permanência obedecer a vários dias até que as condições de germinação sejam favoráveis. Estes podem mesmo permanecer até as feridas contaminadas terem cicatrizado, contribuindo deste modo para os casos de tétano de origem não identificada (Hsu e Groleau, 2001).

A geração de um ambiente anaeróbio ao nível dos tecidos infetados é fundamental para a germinação dos esporos de *C. tetani*. Os tecidos necrosados ou contaminados com outros microrganismos constituem a principal fonte de contaminação (Cook et al., 2001). Está descrito, que a tetanolisina pode ter um papel contributivo para a criação da anaerobiose tecidual pela danificação dos tecidos viáveis que rodeiam o local da infeção (Cook et al., 2001; Hsu e Groleau, 2001; Mallick e Winslet, 2004).

4. A tetanospasmina tetânica

A TeNT é classificada como uma potente metaloprotease com uma elevada sensibilidade e especificidade para os seus alvos neurotóxicos. Apresenta toxicidade para um grande número de animais vertebrados, embora esta varie entre as diferentes espécies (Rossetto et al., 2013). A dose letal estimada em Humanos é de 2.5 ng/kg de peso corporal (Roper et al., 2007).

Encontra-se codificada ao nível de um plasmídeo bacteriano com 74082 bp que contem 61 genes associados. Apesar de alguns genes apresentarem sequências de codificação

semelhantes a genes de outras espécies bacterianas, a origem deste plasmídeo permanece desconhecida (Connan et al., 2013).

A TeNT partilha uma organização, composição e peso molecular semelhante às restantes NTCs, embora esta, ao contrário das BoNTs, não esteja associada a proteínas auxiliares impossibilitando deste modo a sua invasão por via oral (Singh et al., 1995). Estudos de sequenciação de DNA demonstraram que a TeNT não possui os genes codificantes das proteínas auxiliares não tóxicas (Connan et al., 2013).

4.1. Mecanismos de ação

A inibição do ácido λ -aminobutírico (GABA) e glicina, ao nível dos interneurónios inibitórios da espinal medula e do tronco cerebral, desencadeando uma paralisia espástica, constitui o principal mecanismo de ação da TeNT (Bhatia et al., 2002; Cook et al., 2001; Hsu e Groleau, 2001) (Figura 15). Para além das quatro etapas fundamentais que mediam os mecanismos de ação das NTCs (fundamentados no capítulo II), a TeNT sofre um transporte axonal retrógrado atingindo deste modo o corpo celular neuronal a partir do qual invade os interneurónios inibitórios que se traduz no seu local proteolítico (Lallii et al., 2003; Rossetto et al., 2013; Turton et al., 2002).

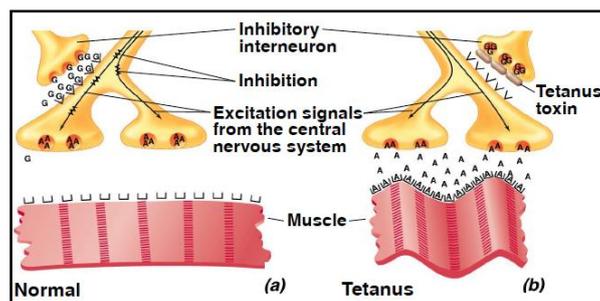


Figura 15 – Mecanismo de ação da TeNT. (a) Relaxamento muscular desencadeado pela libertação de neurotransmissores ao nível dos interneurónios inibitórios. (b) Relaxamento muscular comprometido pela ação da TeNT através inibição da libertação de neurotransmissores ao nível dos interneurónios inibitórios. Adaptado de Victoria, 2013.

Apesar de o local de ação da TeNT ocorrer ao nível dos interneurónios inibitórios, a sua ligação e internalização neuroespecífica ocorre ao nível dos terminais colinérgicos periféricos. A interação entre a TeNT e os recetores dos terminais colinérgicos é um passo

determinante para os processos posteriores implicados na toxicidade da TeNT. De acordo com Lallii et al. (2003), os recetores colinérgicos, dos quais se destacam os microdomínios lipídicos, mediam os sinais intracelulares responsáveis por:

1. Mediar a internalização neuronal por uma via independente ao sistema endossomal das vesículas sinápticas. A sua internalização está associada a uma via vesicular mediada por claritina (Figura 16) (Deinhardt et al., 2006). De acordo com Rossetto et al. (2011), a internalização da TeNT em vesículas não acidificadas é uma condição essencial para reter a toxina no lúmen vesicular e assegurar a sua migração retrógrada ao nível dos neurónios colinérgicos. Este mecanismo foi evidenciado por ensaios clínicos que demonstraram que a internalização da TeNT não é influenciada em neurónios nos quais a libertação de neurotransmissores foi inibida, impossibilitando deste modo a exposição de vesículas sináptica (Lallii et al., 2003).

2. Estabelecer ao nível neuronal todos os mecanismos implicados no transporte retrógrado das vesículas transportadoras da TeNT. O transporte retrógrado é uma função fisiológica vital para o desenvolvimento e crescimento neuronal, sendo estabelecido principalmente por um conjunto de microtúbulos e microfilamentos que se estendem desde o axónio até ao corpo celular neuronal. A TeNT explora este mecanismo de modo a alcançar o corpo celular neuronal. Estudos em tempo real com a HC da TeNT marcada com um composto emissor de fluorescência, demonstraram este processo de transporte retrógrado axonal até ao corpo celular neuronal (Lallii et al., 2003; Rossetto et al., 2013).

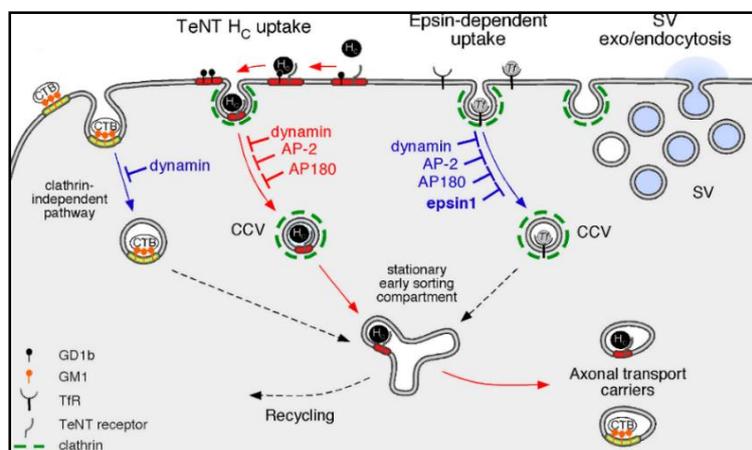


Figura 16 – Vias de internalização celular ao nível dos terminais colinérgicos. Adaptado de Deinhardt et al., 2006.

Uma vez no corpo celular neuronal, a TeNT é libertada ao nível do espaço intersináptico, onde se estabelece a sua internalização para o citoplasma dos neurónios inibitórios através da reciclagem de vesículas sinápticas. O passo seguinte, consiste na translocação da LC através da membrana das vesículas sinápticas para o citoplasma neuronal, de modo a que esta possa exercer a sua atividade proteolítica por clivagem proteica do complexo proteico SNARE impedindo assim a libertação de neurotransmissores inibitórios (Cook et al., 2001; Rossetto et al., 2013).

4.2. Bloqueio da libertação de neurotransmissores

O GABA e a glicina constituem os principais neurotransmissores associados aos interneurónios inibitórios. A sua libertação ao nível da fenda sináptica é mediada por sinais que causam um potencial de ação neuronal. Após a sua libertação, ligam-se a recetores neuronais pré-sinápticos desencadeando uma resposta inibitória eferente (Purves et al. 2001).

O GABA consiste no principal neurotransmissor inibitório do SNC. É sintetizado a partir do glutamato, por ação da enzima glutamato descarboxilase. Encontra-se armazenado em vesículas e a sua libertação está correlacionada com a frequência de estimulação neuronal. Interage com recetores específicos pós-sinápticos que provocam hiperpolarização neuronal pela abertura de canais de cloro (Bowery e Smart, 2006).

A glicina é um aminoácido que pode atuar como neurotransmissor inibitório. É sintetizado a partir de serina por ação da enzima serina-hidroximetil transferase, encontrando-se armazenado em vesículas nos terminais pré-sinápticos. O recetor para a ação inibitória da glicina apresenta características em comum com aquelas descritas para o recetor do GABA, favorecendo a hiperpolarização da célula pós-sináptica por meio do influxo de iões de cloreto (Bowery e Smart, 2006).

A libertação de GABA e de glicina ao nível da fenda sináptica é amplamente influenciada pela ação das proteínas do complexo SNARE, que medeiam a fusão das vesículas sinápticas com as membranas pré-sinápticas (Rossetto et al., 2013).

A TeNT impede a libertação de GABA e glicina ao nível dos neurónios inibitórios através da proteólise específica da VAMP 2, proteína constituinte do complexo SNARE que se encontra ao nível das vesículas sinápticas. A inibição da libertação destes neurotransmissores traduz-se numa hiperexcitabilidade neuronal descontrolada, afetando principalmente o sistema motor e o SNA (Cook et al., 2001; Hassel, 2013; Taylor, 2006).

4.2.1. Efeitos ao nível dos neurónios motores

Como foi descrito no capítulo anterior, os neurónios motores desempenham um papel fundamental no controlo dos músculos esqueléticos. A sua função é estabelecida pela convergência de informação de fontes muito diversas responsáveis por estímulos excitatórios e inibitórios (Figura 17) (Purves et al. 2001).

O mecanismo de inibição dos neurónios motores está amplamente influenciado por sinais originados a partir dos centros corticais e da espinal medula que convergem nos interneurónios inibitórios medulares. Os interneurónios inibitórios quando estimulados, libertam neurotransmissores inibitórios que promovem a hiperpolarização membranar dos neurónios motores, inibindo a passagem de estimulação e controlar assim a contração muscular (Purves et al. 2001).

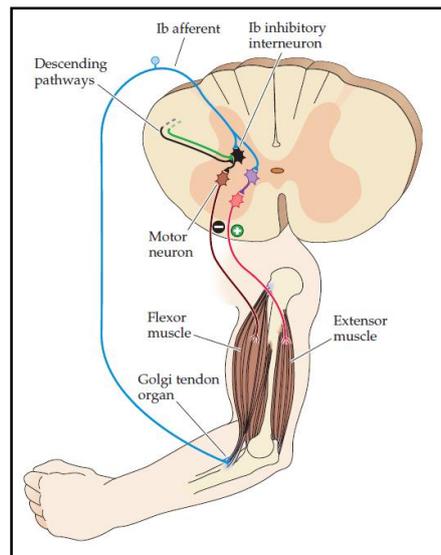


Figura 17 – Representação do controlo neuronal dos neurónios motores e a sua ação sobre a contração muscular. Adaptado de Purves et al., 2001.

A ação da TeNT ao nível dos neurónios motores é desencadeada indiretamente pela inibição da libertação de GABA e glicina pelos interneurónios inibitórios. A desinibição dos neurónios motores desencadeia uma hiperatividade muscular descontrolada que se traduz em rigidez e espasmos musculares (Alouf et al., 2015; Hassel, 2013).

4.2.2. Efeitos ao nível da junção neuromuscular

Está descrito que quando as concentrações locais da toxina são elevadas pode levar ao bloqueio da libertação de ACh ao nível da JNM. Estudo *in vitro* demonstram que a TeNT para além da paralisia espástica induz também uma paralisia flácida mas com um menor grau de extensão (Alouf et al., 2015).

Este efeito ao nível da JNM pode estar associado ao facto de quando a toxina é exposta em elevadas concentrações nos neurónios periféricos, os mecanismos de transporte axonal retrógrado ficam saturados, facultando a permanência da toxina ao nível periférico em concentrações significativas desencadeando assim a sua ação proteolítica (Alouf et al., 2015).

4.2.3. Alterações no Sistema Nervoso Autónomo

O facto de o tétano gerar uma mortalidade significativa em doentes controlados ao nível da função respiratória através de ventilação assistida, focou a atenção de outros efeitos adversos induzidos pela TeNT para além das contrações musculares descontroladas. Esta evidência veio realçar o efeito da toxina ao nível do SNA, estando este muitas das vezes associado aos casos de morte verificados nos episódios mais graves da doença (Hörtnagl et al., 1979).

O efeito da TeNT no SNA é mais marcado ao nível do sistema simpático, verificando-se fortes episódios de taquicardia seguidos de bradicardia, espasmos vasculares acompanhados de hipertensão associada e sudorese profunda. Estes efeitos estão associados a um aumento de catecolaminas plasmáticas (Alouf et al., 2015, Cook et al., 2001).

No que respeita à ação da toxina, são referidas duas hipóteses que sustentam os efeitos da TeNT sobre o sistema simpático. A primeira relaciona os efeitos a fatores secundários induzidos pela doença, como estímulos emocionais ou atividade muscular excessiva descontrolada que levam indiretamente a uma condição exacerbada do sistema simpático. Por outro lado, é referido que a TeNT não exerce somente efeitos diretos a partir dos neurónios motores, podendo também exercer a sua atividade neurotóxica diretamente nos neurónios adrenérgicos, desinibindo os reflexos sinápticos aferentes ao nível da espinal medula (Alouf et al., 2015; Hörtnagl et al., 1979).

Quanto ao sistema parassimpático, embora não seja tão afetado como o sistema simpático, não pode ser excluída a possibilidade de este sofrer efeitos adversos pela atividade da TeNT. Existem relatos de casos de tétano que demonstraram um aumento da salivação e secreções brônquicas associadas aos efeitos da toxina (Hörtnagl et al., 1979).

5. Manifestações clínicas da doença

As manifestações clínicas da doença refletem os processos associados à neurotoxicidade da TeNT, traduzindo-se numa hiperatividade generalizada dos músculos esqueléticos associada a espasmos e rigidez muscular e uma disfunção autónoma (Hassel, 2013).

O período de incubação dos esporos de *C. tetani* é normalmente de 7 a 10 dias, podendo o tempo de aparecimento dos primeiros sintomas, após o período de incubação, variar entre as 24 horas até alguns meses. Este intervalo de tempo até a toxina alcançar o sistema nervoso reflete-se no prognóstico da patologia, uma vez que quanto mais curto o período de incubação mais severos serão os sintomas (Bhatia et al., 2002; Goonetilleke e Harris, 2004).

A doença é classificada em quatro formas clínicas distintas que representam a extensão e localização dos neurónios envolvidos: (I) tétano generalizado; (II) tétano localizado; (III) tétano cefálico; (IV) tétano neonatal (Hsu e Groleau, 2001; Rossetto et al., 2013).

5.1. Tétano generalizado

É o tipo mais frequente, estando associado a 80% dos casos da doença. Resulta de uma invasão do sistema circulatório por parte da TeNT, afetando deste modo várias porções neuronais (Taylor, 2006).

Os neurónios da cabeça e pescoço são os primeiros a serem afetados, resultado da menor distancia que a TeNT tem de percorrer até atingir os interneurónios inibitórios (Cook et al., 2001). Os espasmos dos masseteres que causam o bloqueio da mandíbula (*trismus*) (Figura 18), normalmente caracteriza-se como o primeiro sinal clínico, ocorrendo em cerca de 50-75% dos casos (Hsu e Groleau, 2001).

Com a extensão aos músculos faciais causa uma expressão característica denominada de riso sardónico. O envolvimento de outros neurónios leva posteriormente a espasmos e rigidez muscular a outras porções corporais que vão desde o pescoço e costas, envolvendo mais tarde os membros superiores e inferiores. Nesta fase, desencadeia-se o denominado *opistótonos*, no qual a cabeça, pescoço e coluna vertebral formam uma posição em arco côncavo para trás (Figura 18). Ao longo do quadro clínico da doença o doente mantém a consciência (Hsu e Groleau, 2001; Mallick e Winslet, 2004).

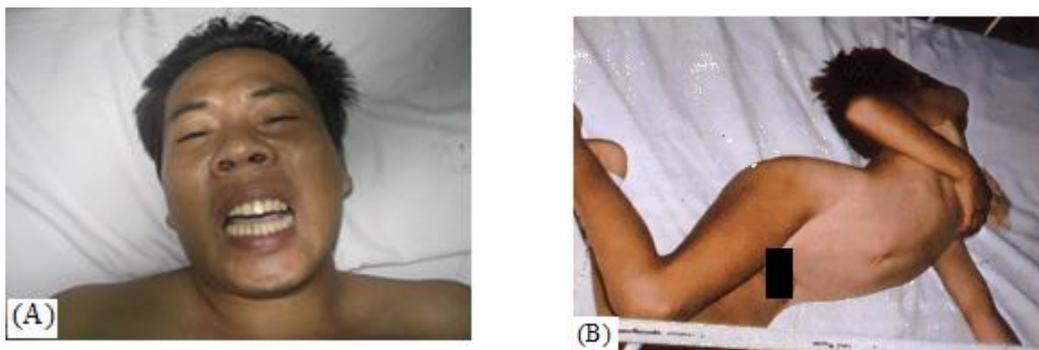


Figura 18 – Manifestações clínicas do Tétano. (A) Espasmos dos masseteres causando o bloqueio da mandíbula (*trismus*); (B) Criança em fase avançada da doença com a manifestação de *opistótonos*. Adaptado de Thwaites, 2014; Singhal, 2011.

Os espasmos dolorosos generalizados envolvem também os músculos da laringe, levando à cianose ou mesmo à asfixia devido à apneia e hipoventilação. As falhas respiratórias

mediadas pelo comprometimento do diafragma, nesta fase passam a ser controladas por intervenção médica através de ventilação mecânica (Hsu e Groleau, 2001).

A fase mais avançada da doença envolve uma instabilidade severa no SNA, que constitui a principal causa de morte da doença (Bhatia et al., 2002).

5.2. Tétano localizado

O tétano localizado, embora possa evoluir para a forma generalizada, tem como característica principal uma contração persistente nos músculos adjacentes à região anatômica lesada. A sua incidência é de 13%, sendo a taxa de mortalidade associada a cerca de 1% dos casos (Hsu e Groleau, 2001).

A sintomatologia clínica apresenta variações, podendo apresentar-se sob a forma de fracas contrações musculares e graves espasmos musculares dolorosos com rigidez associada. As manifestações da doença podem persistir por várias semanas ou meses, embora geralmente o prognóstico seja favorável (Hsu e Groleau, 2001).

5.3. Tétano cefálico

O tétano cefálico é uma variante pouco comum do tétano localizado, representando cerca de 6% dos casos associados à doença. Pode apresentar uma evolução para o tétano generalizado, apresentando uma elevada taxa de mortalidade que varia entre os 15-30% (Hsu e Groleau, 2001).

As feridas existentes ao nível da cabeça e do pescoço e as otites médias, constituem as principais vias de implementação do tétano cefálico. Os nervos cranianos geralmente estão envolvidos (especialmente o sétimo), traduzindo deste modo a sintomatologia associada, que se manifesta em espasmos musculares ao nível dos músculos faciais com a presença de *trismus* (Bhatia et al., 2002; Taylor, 2006).

5.4. Tétano neonatal

Os primeiros sinais da doença manifestam a paralisia dos masseteres pela incapacidade de sucção após o terceiro dia de vida (Thwaites et al., 2015). Esta fase também é acompanhada de uma debilidade geral e irritabilidade do recém-nascido, seguida de espasmos musculares (Hsu e Groleau, 2001). Após o aparecimento dos primeiros sinais, a doença evolui de forma semelhante ao tétano generalizado, apresentando as mesmas manifestações clínicas (Roper et al., 2007).

6. Epidemiologia

O tétano é considerado uma doença rara na maioria dos países desenvolvidos (Cook et al., 2001). No entanto, nos países em desenvolvimento a sua incidência ainda é bastante elevada apresentando uma taxa de mortalidade que varia entre os 30-50%, estando a maioria dos casos associada ao tétano neonatal. A elevada incidência está relacionada com as condições socioculturais e higiêno-sanitárias e com os índices imunitários das populações (Johnson, 2005).

Nos Estados Unidos da América desde 1947 (ano em que o tétano passou a ser uma doença de declaração obrigatória) a 2008, o número de casos notificados diminuiu mais de 97%. Quanto ao número de mortes associadas, atingiu uma diminuição superior a 99% (Figura 19). Entre 2001-2008 foram notificados 233 casos, com uma taxa de mortalidade de 13.2% dos 197 casos com resultados conhecidos. Um total de 30 casos foram associados a diabéticos e 27 casos a consumidores de drogas injetáveis. Entre os 233 casos, 31 pacientes relataram a existência de uma ferida crónica ou infeção antes do início da doença que incluíram úlceras e abscessos dentários (CDC, 2011).

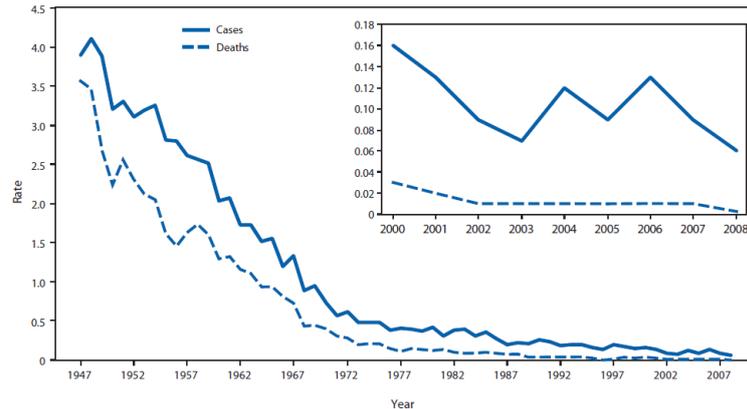


Figura 19 – Números anuais por 1 milhão de habitantes de casos notificados de tétano e mortes associadas ocorridos nos Estados Unidos da América entre 1947 e 2008. Adaptado de CDC, 2011.

De acordo com a *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), entre os países membros do Espaço Económico Europeu, o tétano está referido como uma infeção esporádica relativamente incomum, uma vez que a doença está incluída no programa de vacinação obrigatória de todos os países membros. De 2008 a 2012 foram relatados apenas 649 casos de tétano entre os 26 países membros, sendo a Itália o país com o maior número de notificações com um intervalo entre 53-58 casos notificados anualmente. Os dados mais recentes relativos a 2012 revelam 123 casos notificados (72 confirmados laboratorialmente), distribuídos por 15 países diferentes, onde a Itália e a Polónia relataram 59% dos casos. Portugal relatou 3 casos em que nenhum deles foi confirmado laboratorialmente (ECDC, 2014).

6.1. Infeção maternal e neonatal

O tétano materno é definido como o tétano que ocorre durante a gravidez ou no prazo de 6 semanas após a gravidez. No início dos anos 1990 estimou-se que o tétano materno estava associado a 5% da mortalidade materna, com números de mortes que variavam entre 1500-3000 casos por ano (Roper et al., 2007). Atualmente não existem dados concretos quanto ao número de casos, mas é referido que estes têm vindo a diminuir. As principais causas estão associadas à falta de imunização materna e às más condições higiénicas exercidas durante o parto, sobretudo nos partos domiciliários (Thwaites et al., 2015).

O tétano neonatal ocorre geralmente entre o 3º e o 28º dia de vida do recém-nascido (Thwaites et al., 2015). Os principais fatores de risco associados à contaminação dos recém-nascidos resultam na falta de condições assépticas exercidas durante o parto, como o corte do cordão umbilical com instrumentos não esterilizados ou pelo contato direto das mãos contaminadas (WHO, 2005).

Quanto aos dados epidemiológicos, os números apresentados pelas entidades reguladoras muitas das vezes estão aquém dos números reais associados à morbidade e mortalidade da doença. Na maioria dos países subdesenvolvidos, muitos dos nascimentos ainda ocorrem ao nível domiciliário no que se traduz numa falta de controlo sobre os reais números. Dados de 2005 a 2012, revelaram que apenas 60% dos nascimentos nos países subdesenvolvidos ocorrem em locais especializados (Thwaites et al., 2015).

De acordo com a WHO (2005), na década de 1980 mais de 1 milhão de mortes todos os anos eram associadas ao tétano neonatal em todo o mundo. Desde que em 1985 a WHO lançou o apelo para erradicar a doença até 1995, as taxas de incidência baixaram significativamente, no entanto em muitos países, na sua maioria subdesenvolvidos, esta patologia ainda permaneça como um problema endémico (Figura 20) (Roper et al., 2007). As regiões do continente Africano, sudeste da Ásia e do Pacífico ocidental constituem as regiões de elevado risco (Johnson, 2005).

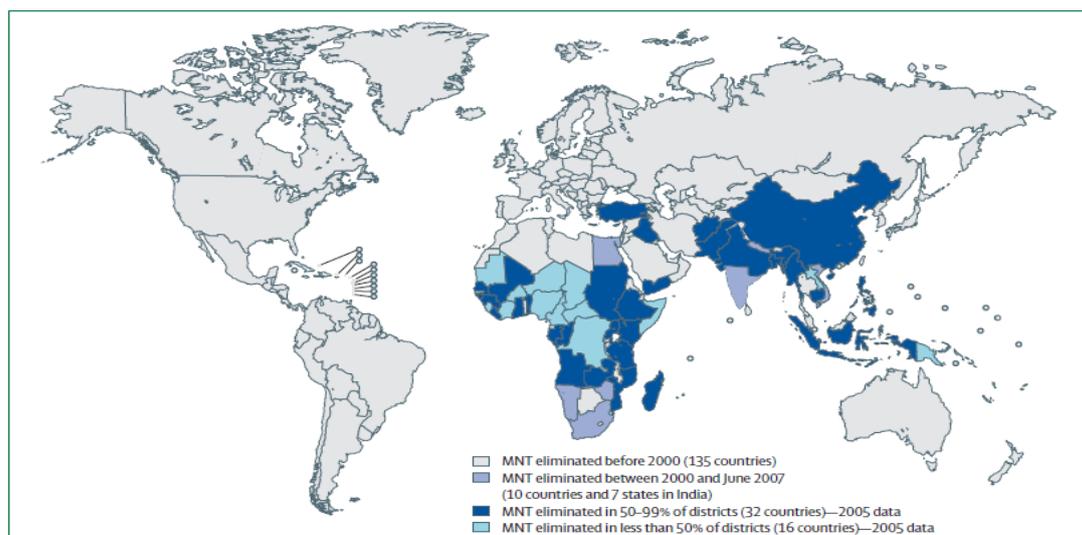


Figura 20 – Eliminação global do tétano materno e neonatal. Adaptado de Roper et al., 2007.

6.2. Dados epidemiológicos em Portugal

Em Portugal, antes da inclusão da vacina no Programa Nacional de Vacinação, o tétano apresentava-se como uma doença com uma elevada taxa de incidência e mortes associadas. Entre 1956-1965 foram declarados 3923 casos com 2625 casos de morte associada (DGS, 2012).

A inclusão da vacina do tétano no Programa Nacional de Vacinação resultou num controlo progressivo, rápido e sustentado da doença (Figura 21). De 2002 a 2011 foram declarados apenas 55 casos de tétano em Portugal com 10 mortes associadas (DGS, 2012).

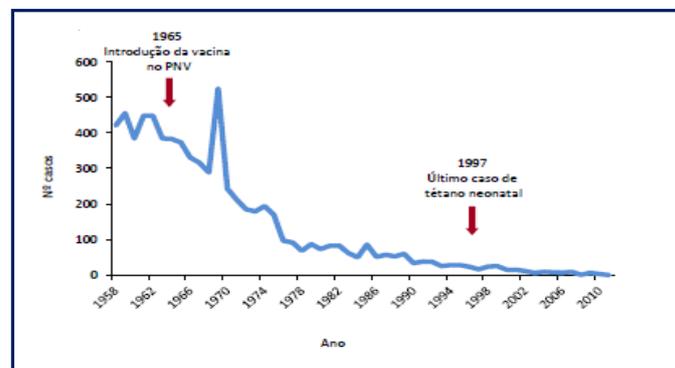


Figura 21 – Casos declarados de tétano em Portugal entre 1958-2011. Adaptado de DGS, 2012.

7. Medidas profiláticas de combate à doença

A principal estratégia delineada no combate à doença consiste na criação de imunização passiva com base em programas de vacinação obrigatórios, de modo a que a imunidade se mantenha ativa ao longo de toda a vida de um indivíduo (Johnson, 2005).

A vacinação em Portugal contra o tétano é obrigatória desde 1965 (DGS, 2012). De acordo com o Programa Nacional de Vacinação de 2015, dos 2 aos 6 meses de idade todas as crianças são obrigadas a ser vacinadas de 2 em 2 meses, completando um total de 3 doses. O reforço da imunidade deve ser estabelecido aos 18 meses com mais uma dose e posteriormente entre os 5-6 anos de idade. Entre os 10-13 anos deve ser administrada outra dose, sendo a partir desta idade a vacinação obrigatória de 10 em 10 anos durante toda a vida (DGS, 2015).

De modo a combater o tétano maternal, a WHO recomenda duas doses da vacina para mulheres grávidas, como parte dos cuidados pré-natais de rotina e três doses para todas as mulheres em idade fértil em áreas consideradas de risco (Thwaites et al., 2015).

Tem-se verificado que a imunização materna durante a gravidez constitui um fator relevante na diminuição da mortalidade neonatal causada pelo tétano. A transferência passiva de anticorpos maternos para o feto é um fator de proteção importante para os primeiros meses de vida do recém-nascido (Roper et al., 2007).

O estabelecimento de normas que conduzam às boas práticas de higiene durante o parto e a redução do número de partos executados ao nível domiciliário, são fatores muito importantes para baixar os níveis de incidência do tétano maternal e neonatal (Roper et al., 2007). De acordo com Thwaites et al. (2015) o cumprimento das boas práticas de higiene nos partos domiciliários pode prevenir 30% das mortes associadas ao tétano neonatal, 35% se um profissional especializado estiver presente na altura do parto e 40% se os nascimentos ocorrerem em locais de saúde especializados.

Ao longo dos anos, a crescente imunização materna e a conseqüente imunização fetal, o melhoramento das condições assépticas durante o parto e a diminuição do número de partos ao nível domiciliário revelam ser fatores muito importantes como medidas profiláticas no combate ao tétano neonatal (Figura 22) (Roper et al., 2007; Thwaites et al., 2015).

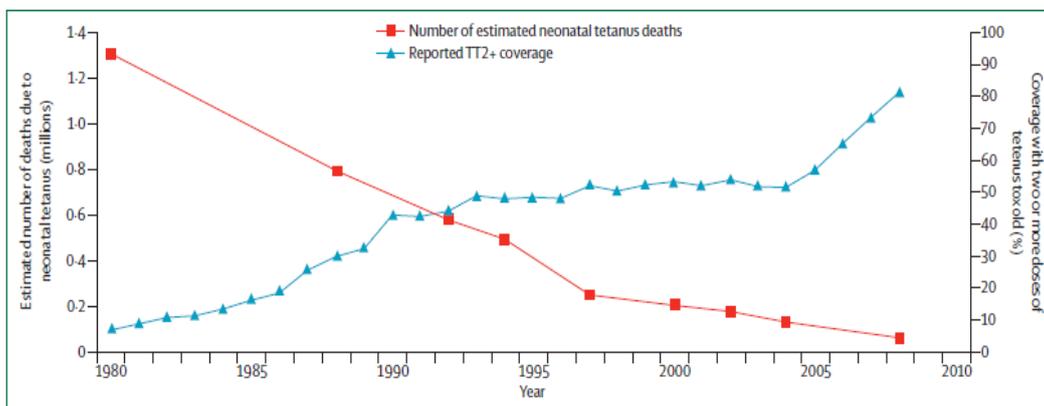


Figura 22 – Evolução do número de mortes estimadas associadas ao tétano neonatal e a cobertura maternal com duas doses de vacina contra o tétano. Adaptado de Thwaites et al., 2015.

O uso de imunoglobulina Humana contra o tétano, constitui também uma medida profilática em pessoas com lesões recentes propensas ao desenvolvimento da doença, nas quais o programa de vacinação esteja incompleto ou não seja conhecido (Hsu e Groleau, 2001).

VI. Aplicações Farmacêuticas das neurotoxinas de *Clostridium*

Apesar da elevada toxicidade associadas às NTCs ao longo dos tempos, nos dias de hoje são consideradas como agentes terapêuticos altamente eficazes, usadas numa vasta gama de patologias Humanas (Beard e Chaddock, 2014; Turton et al., 2002). O estudo e compreensão dos mecanismos envolvidos na sua atividade e o desenvolvimento de técnicas eficazes para a sua purificação foram fatores determinantes para fazer das NTCs ferramentas terapêuticas (Rossetto et al., 2000).

Os primeiros passos que evidenciaram que as BoNTs poderiam ser usadas como agentes terapêuticos foram demonstrados por Alan Scott em 1973, através do uso da BoNT do serotipo A para tratamento do estrabismo em macacos, sendo em 1980, usada pela primeira vez no tratamento da correção do estrabismo em Humanos (Pellett, 2012). Desde então, o número de ensaios clínicos usando as BoNTs como forma de tratamento não parou de crescer, até que em 1989 a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso terapêutico do Botox® (Allergan, Inc, Irvine, CA, U.S.A.) para o tratamento do estrabismo, blefaroespasma e espasmo hemifacial (Silberstein, 2004, Turton et al., 2002).

Atualmente existem várias preparações comerciais de BoNTs aprovadas pela FDA usadas no tratamento de uma vasta gama de patologias associadas principalmente à hiperatividade dos terminais colinérgicos periféricos (Tabela 3) (Grumelli et. al., 2005; Montecucco e Molgó, 2005; Silberstein, 2004). Para além do Botox®, existem mais duas preparações comerciais de BoNT do serotipo A aprovadas, que incluem: Dysport® (Medicis, aprovado pela FDA em 2009); Xeomin® (Merz, aprovado pela FDA em 2010). No ano 2000 a FDA aprovou uma preparação à base da BoNT do serotipo B designada de Myobloc®, sendo a sua comercialização autorizada também na União Europeia, estando disponível sob o nome de Neurobloc® (Chen, 2012).

Tabela 3 – Principais aplicações terapêuticas das BoNTs. Adaptado de Chen, 2012.

Estado	Indicações	Preparações	Observações
Indicações Aprovadas pela FDA	Estrabismo	Botox® (1989)	Eficácia elevada, mas com doses repetitivas
	Blefaroespasma	Botox® (1989)	Eficácia elevada e comprovada
	Espasmo hemifacial	Botox® (1989)	Eficácia elevada e comprovada
	Distonia cervical	Botox® (2001) Dysport® (2009) NeuroBloc® (2000) Xeomin® (2010)	Eficácia elevada, mas com doses elevadas
	Uso cosmético	Botox® (2002)	Eficaz e seguro a longo prazo
	Hiperidrose axilar	Botox® (2004)	Eficaz e seguro, mas dolorosa no local de injeção
	Enxaqueca Crónica	Botox® (2010)	Ensaio seguros e eficazes em estudos randomizados, mas não em estudos placebo controlados
	Hiperatividade neurogénica	Botox® (2012)	Eficácia notável, sem efeitos adversos
Indicações sem aprovação	Desordens do trato urinário inferior	Botox®	Eficácia notável, sem efeitos adversos
	Desordens do trato gastrointestinal	Botox®	Efeitos de curta duração
	Espasticidade	Botox®	Considerado tratamento de primeira linha, mas apenas na fase precoce
	Disfonia espasmódica	Botox®	Eficaz, mas são necessários mais estudos controlados
	Sialorreia	Botox®	Eficaz, mas dose terapêutica e aplicação continuam por estabelecer
	Disfunção temporomandibular	Botox®	Dose adequada e aplicação eficaz são muito importantes na obtenção de bons resultados
	Dor músculo-esquelética crónica	Botox®	Eficaz para alguns pacientes que não respondem bem a tratamentos de primeira linha

Embora as patologias de origem neuromuscular sejam a base principal de aplicação terapêutica das BoNTs, outros distúrbios têm vindo a assumir cada vez mais o impacto benéfico do uso destas toxinas, nomeadamente no tratamento de distúrbios dolorosos, secretores e dermatológicos (Beard e Chaddock, 2014; Montecucco e Molgó, 2005; Turton et al., 2002).

A elevada sensibilidade e especificidade estão associadas ao sucesso terapêutico alcançado pelas BoNTs, sendo caracterizadas como moléculas seguras, eficazes, com longos efeitos de ação e com poucos efeitos adversos associados (Montecucco e Molgó, 2005). A principal contra indicação do uso das BoNTs como fonte de tratamento, é a indução da imunização dos pacientes através do uso de doses repetitivas ou com concentrações elevadas, levando deste modo a uma tolerância terapêutica (Beard e Chaddock, 2014; Rossetto et al., 2000).

O futuro terapêutico através do uso das BoNTs está direcionado para estas exercerem a sua atividade em células não neuronais, uma vez que os processos de libertação de várias substâncias (hormonas, mediadores inflamatórios) obedecem ao mesmo mecanismo verificado ao nível das células neuronais. Estudos de engenharia genética têm contribuído para o desenvolvimento de variantes com especificidades para outro tipo de células de modo a controlar, no futuro, doenças hipersecretoras não neuronais (Pickett e Perrow, 2011).

Em relação à TeNT, embora as referências bibliográficas não abordem o seu impacto no tratamento de patologias, nem haver referências de preparações aprovadas, o uso do fragmento Lc da HC associado à toxina, veio abrir portas perante descobertas neuroanatómicas, uma vez que o seu transporte retrógrado permite o mapeamento de conexões sinápticas entre as células neuronais. A veiculação de fármacos para o SNC através de variantes inativas é outra aplicação que tem criado grande interesse de estudo e que futuramente pode fazer da TeNT um agente terapêutico eficaz no tratamento de neuropatologias (Calvo e Osta, 2014).

VII. Conclusão

A diversificidade bacteriana associada ao género *Clostridium* representa um desafio a uma nova reestruturação taxonómica. A produção de toxinas poderá representar um processo adaptativo indispensável à colonização e proliferação microbiana.

Os esforços conduzidos para elucidar os mecanismos de ação das NTCs contribuíram não só para revelar os processos patológicos, como também revolucionaram a compreensão dos mecanismos fisiológicos neuronais envolvidos na endocitose e libertação de neurotransmissores. Apesar dos progressos, subsistem desafios significativos na compreensão dos mecanismos envolvidos à toxicidade das neurotoxinas. A absoluta neuroespecificidade, a caracterização de recetores neuronais e a mediação de sinais intracelulares que direcionam as NTCs para locais distintos, constituem os processos que suscitam maior dúvidas entre os investigadores.

O direcionamento das BoNTs e da TeNT para diferentes porções neuronais constitui o mecanismo preponderante na divergência existente em relação às manifestações clínicas desencadeadas por estas toxinas. A etapa de reconhecimento e ligação a recetores específicos pode ser fundamental para o direcionamento das NTCs, uma vez que estes mediam os sinais intracelulares importantes na regulação neuronal.

O botulismo é uma doença amplamente relacionada com a conservação de alimentos e costumes alimentares. Embora seja uma doença rara constitui ainda nos dias de hoje uma ameaça à saúde pública perante surtos associados a intoxicações alimentares.

O tétano atualmente representa as desigualdades verificadas em termos de cuidados de saúde entre os países desenvolvidos e subdesenvolvidos. Apesar da existência de uma vacina eficaz, num futuro próximo ainda continuaremos a assistir a números elevados da doença em muitos dos países subdesenvolvidos por falta de planos de vacinação e cuidados de básicos de saúde.

A compreensão dos mecanismos envolvidos na toxicidade das NTCs abriu portas à implementação das NTCs como forma de tratamento em várias patologias Humanas, que prometem vigorar ainda mais no futuro.

VIII. Bibliografia

Alouf, J., Ladant, D. e Popoff, M. R. (2015). *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins (Fourth Edition)*. Londres, Academic Press.

Bahl, H. e Dürre, P. (1993). Clostridia. In : Rehm, H-J e Reed, G. (Ed.). *Biotechnology: Biological Fundamentals*, Volume I. 2ª Edição. Germany, Wiley-VCH, pp. 285-232.

Beard, M. e Chaddock, J. A. (2014). Clostridium botulinum and Associated Neurotoxins. In: Tang, Y. et alii. (Ed). *Molecular Medical Microbiology*, Volume II. 2ª Edição, Academic Press, pp. 1015-1029.

Benefield, D. A. et alii. (2013). Molecular assembly of botulinum neurotoxin progenitor complexes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(14), pp. 5630-5635.

Berry, MG. e Stanek, J. J. (2012). Botulinum neurotoxin A: A review, *Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 65, pp. 1283-1291.

Bhatia, R., Prabhakar, S. e Grover, V. K. (2002). Tetanus, *Neurology India*, 50, pp. 398-407.

Binz, T. e Rummel, A. (2009). Cell entry strategy of clostridial neurotoxins, *Journal of Neurochemistry*, 109, pp. 1584-1595.

Blaschek, H. P. (2014). Clostridium. In: Batt, C. A. e Tortorello, M. L. (Ed). *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2ª Edição. Academic Press, pp. 444-448.

Borriello, S. P. e Aktories, K. A. (2005) Clostridium perfringens, Clostridium difficile, and other Clostridium species. In: Borriello, S.P., Murray P. R. e Funke, G. (Ed). *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 8ª edição. Hodder Arnold, Londres, pp. 1089–1137.

Bowery, N. G. e Smart, T. G. (2006). GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history, *British Journal of Pharmacology*, 147, pp. S109-S119.

Breidenbach, M. A. e Brunger, A. T. (2005). New insights into clostridial neurotoxin – SNARE interactions, *TRENDS in Molecular Medicine*, 11(8), pp. 377-381.

Brook, I. (2006). Botulism: The Challenge of Diagnosis and Treatment, *Reviews In Neurological Diseases*, 3(4), pp. 182-189.

Bruggemann, H. e Gottshalk, G. (2008). Comparative Genomics of Clostridia Link between the Ecological Niche and Cell Surface Properties, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125, pp. 73-81.

Bruggemann, H. et alii. (2012). The genome sequence of *Clostridium tetani*, the causative agent of tetanus disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(3), pp. 1316-1321.

Brunger, A. T. e Rummel, A. (2009). Receptor and substrate interactions of clostridial neurotoxins, *Toxicon*, 54, pp. 550-560.

Caleo, M. e Schiavo, G. (2009). Central effects of tetanus and botulinum neurotoxins, *Toxicon*, 54, pp. 593-599.

Calvo, A. C. e Osta, R. (2014). *Clostridium botulinum* and Associated Neurotoxins. In: Tang, Y. et alii. (Ed). *Molecular Medical Microbiology*, Volume II. 2ª Edição, Academic Press, pp. 909-916.

Cardoso, T. et alii. (2004). BOTULISMO ALIMENTAR Estudo retrospectivo de cinco casos, *Acta Médica Portuguesa*, 17, pp. 54-58.

Carter, G. P. et alii. (2013). Regulation of toxin production in the pathogenic clostridia, *Molecular Microbiology*, 91(2), pp. 221-231.

Casale, R. e Tugnoli, V. (2008). Botulinum Toxin for Pain, *Drugs in R&D*, 9(1), pp. 11-27.

CDC, (2011). Tetanus Surveillance - United States, 2001-2008, *MMWR*, 60(12), pp. 366-395.

CDC, (2012). National Enteric Disease Surveillance: Botulism Surveillance Overview. Disponível em <http://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/PDFs/bot-overview_508c.pdf>. [Consultado em 08/09/2015].

CDC, (2015). National Botulism Surveillance. [Em linha]. Disponível em <<http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/botulism-surveillance.html>>. [Consultado em 06/09/2015].

Cereser, N. et alii. (2008). Botulismo de origem alimentar. *Ciência Rural*, 38 (1), pp. 280-287.

Chen, S. (2012). Clinical Uses of Botulinum Neurotoxins: Current Indications, Limitations and Future Developments, *Toxins*, 4, pp. 913-939.

Colhado, O., Boeing, M. e Ortega, L. (2009). Toxina Botulínica no Tratamento da Dor, *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 59(3), pp. 366-381.

Collins, M. D. e East A. K. (1998). Phylogeny and taxonomy of the food-borne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins, *Journal of Applied Microbiology*, 84, pp. 5-17.

Collins, M. D. et alii. (1994). The Phylogeny of the Genus *Clostridium*: Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(4), pp. 812-826.

Connan, C. et alii. (2013). Regulation of toxin synthesis in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*, *Toxicon*, 75, pp. 90-100.

Cook, T. M., Protheroe, R. T. e Handel, J. M. (2001). Tetanus: A Review of the Literature, *British Journal of Anaesthesia*, 87(3), pp. 477-487.

Currà, A. et alii. (2004). Central Effects of Botulinum Toxin Type A: Evidence and Supposition, *Movement Disorders*, 19(8), pp. S60-S64.

Deinhardt, K. et alii. (2006). Tetanus toxin is internalized by a sequential clathrin-dependent mechanism initiated within lipid microdomains and independent of epsin1, *The Journal of Cell Biology*, 174(3), pp. 459-471.

Delbos, V. et alii. (2005). Botulisme alimentaire, aspects épidémiologiques, *La Presse Médicale*, 34(6), pp. 455-459.

DGS (2012). Boletim Vacinação. Disponível em <file:///C:/Users/nelson/Downloads/i017577%20(3).pdf>. [Consultado em 19/10/2015].

DGS (2014). Doenças de Declaração Obrigatória 2009-2012. [Em linha]. Disponível em <https://www.dgs.pt/estatisticas-de-saude/estatisticas-de-saude/publicacoes/doencas-de-declaracao-obrigatoria-2008-2012-volume-i-pdf.aspx>. [Consultado em 15/09/2015].

DGS (2015). Programa Nacional de Vacinação 2015, Disponível em <file:///C:/Users/nelson/Downloads/i021473%20(1).pdf>. [Consultado em 20/10/2015].

Dolly, J. O. e Aoki, K. R. (2006). The structure and mode of action of different botulinum toxins, *European Journal of Neurology*, 13(4), pp. 1-9.

Dressler, D., Saberi, F. A. e Barbosa, E. R. (2005). Botulinum Toxin Mechanisms of action, *Arq Neuropsiquiatr*, 63(1), pp. 180-185.

Dressler, D. (2013). Botulinum toxin therapy: its use for neurological disorders of the autonomic nervous system, *Journal of Neurology*, 260, pp. 701-713.

Dürre, P. (2007). Clostridia, *Encyclopedia Of Life Sciences*. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0020370/full>> [Consultado em 13/07/2015].

Dürre, P. (2014). Physiology and Sporulation in Clostridium, *Microbiology Spectrum*, 2(4), pp. 1-14.

Ebneshahidi, A. (2010). Disponível em <<https://mymission.lamission.edu/userdata/ebnesha/docs/Chap%207%20Autonomic%20Nervous%20System.pdf>> [Consultado em 1/09/2015].

ECDC, 2014 Annual epidemiological report 2014 – vaccine preventable diseases. Disponível em <<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/AER-VPD-IBD-2014.pdf>> [Consultado em 25/10/2015].

Famularo, C. A. (2009). Infantile Botulism: Clinical Manifestations, Treatment, and the Role of the Nurse Practitioner, *The Journal for Nurse Practitioners*, 5(5), pp. 335-343.

Farrar, J. J. et alii. (2000). Tetanus, *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 69, pp. 292-301.

Fenicia, L. e Anniballi, F. (2009). Infant botulism, *Ann Ist Super Sanità*, 45(2), pp. 134-146.

Fujinaga, Y. (2009). Interaction of Botulinum Toxin with the Epithelial Barrier, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, pp.1-9.

Goonetilleke, A. e Harris, J. B. (2004). Clostridial Neurotoxins, *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 75, pp. 35-39.

Grumelli, C. et alii. (2005). Internalization and Mechanism of Action of Clostridial Toxins in Neurons, *NeuroToxicology*, 26, pp. 761-767.

Gu, S. e Jin, R. (2013). Assembly and Function of the Botulinum Neurotoxin Progenitor Complex, *Current Topics in Microbiology and Immunology* 364, pp. 21-44.

Guo, B-L. et alii. (2013). A closer look to botulinum neurotoxin type A-induced Analgesia, *Toxicon*, 71, pp. 134-139.

Hassel, B. (2013). Tetanus: Pathophysiology, Treatment, and the Possibility of Using Botulinum Toxin against Tetanus-Induced Rigidity and Spasms, *Toxins*, 5, pp. 73-83.

Herreros, J. e Schiavo, G. (2002). Lipid microdomains are involved in neurospecific binding and internalisation of clostridial neurotoxins, *Int. J. Med. Microbiol*, 291, pp. 447-453.

Hörtnagl, H. e Brucke, Th. (1979). The Involvement of the Sympathetic Nervous System in Tetanus, *Klinische Wochenschrift*, 57, pp. 383-389.

Hsu, S. S. e Groleau, G. (2001). Tetanus in the Emergency: A Current Review, *The Journal of Emergency Medicine*, 20(4), pp. 357-365.

Humeau, Y. et alii. (2000). How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release, *Biochimie*, 82, pp. 427-446.

Johnson, E. A. (2005). Clostridium botulinum and Clostridium tetani. In: Borriello, S.P., Murray P. R. e Funke, G. (Ed). *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 8ª edição. Hodder Arnold, Londres, pp. 1035–1088.

King, J. M. e Jennifer, M. H. (2002). Physiology of the neuromuscular junction, *British Journal of Anaesthesia*, 2(5), pp. 129-133.

Lalli, G. et alii. (2003). The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons, *TRENDS in Microbiology*, 11(9), pp. 431-437.

Lang, T. e Janh, R. (2009). Botulinum and Tetanus Toxins. *Reference Module in Biomedical Sciences*, pp.289-294.

Mallick, I. H. e Winslet, M. C. (2004). A Review of the Epidemiology, Pathogenesis and Management of Tetanus, *International Journal of Surgery*, 2, pp. 109-112.

Malveiro, D. et alii. (2013). Botulismo infantil em Portugal – um lactente com hipotonia, *Acta Pediátrica Portuguesa*, 44(4), pp. 179-82.

Masuyer, G. et alii. (2011). Structure and activity of a functional derivative of Clostridium botulinum neurotoxin B, *Journal of Structural Biology*, 174, pp. 52-57.

McLauchlin, J., Grant, K. A. e Little, C. L. (2006). Food-borne botulism in the United Kingdom, *Journal of Public Health*, pp. 1-6.

Montecucco, C. e Molgó, J. (2005). Botulinal neurotoxins: revival of an old killer, *Current Opinion in Pharmacology*, 5, pp. 274-279.

Montecucco, C. e Rasotto, M. B. (2015). On Botulinum Neurotoxin Variability, *mBio*, 6(1), pp. 1-6.

Montecucco, C., Rossetto, O. e Schiavo, G. (2004). Presynaptic receptor arrays for clostridial neurotoxins, *TRENDS in Microbiology*, 12(10), pp. 442-4456.

Montecucco, C. e Schiavo, G. (1994). Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins, *Molecular Microbiology*, 13(1), pp. 1-8.

Neto, C. et alii., (2009). Botulismo: um receio latente, *Nascer e Crescer*, 18(1), pp.25-28.

Palomar, F. e Mir, P. P. (2012). Neurophysiological changes after intramuscular injection of botulinum toxin, *Clinical Neurophysiology*, 123, pp. 54-60.

Pavone, F. e Luvisetto, S. (2010). Botulinum Neurotoxin for Pain Management: Insights from Animal Models, *Toxins*, 2, pp. 2890-2913.

Pellett, S. (2012). Learning from the past: historical aspects of bacterial toxins as Pharmaceuticals, *Current Opinion in Microbiology*, 15, pp. 292-299.

Pellizzari, R. et alii. (1999). Tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses, *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 354, pp. 259-268.

Pickett, A. e Perrow, K. (2011). Towards New Uses of Botulinum Toxin as a Novel Therapeutic Tool, *Toxins*, 3, pp. 63-81.

Popoff, M. R. e Bouvet, Ph. (2009). Clostridial toxins, *Future Microbiology*, 4(8), pp. 1021-1064.

Popoff, M. R. e Bouvet, Ph. (2013). Genetic characteristics of toxigenic Clostridia and toxin gene evolution, *Toxicon*, 4583, pp. 1-27.

Popoff, M. R. (2014). Botulinum Neurotoxins: More and More Diverse and Fascinating Toxic Proteins, *The Journal of Infectious Diseases*, 209, pp. 168-169.

Purves, D. et alii. (2001). *Neuroscience 2nd edition*. Sunderland, Sinauer Associates.

Qiagen, (2003). Mechanism of Botulinum Toxin. Disponível em <<https://www.qiagen.com/pt/shop/genes-and-pathways/pathway-details/?pwid=285&action=Accept4>> [Consultado em 3/09/2015].

Ramakrishnan, A., Drescher, M. J. e Drescher, D. G. (2012). The SNARE complex in neuronal and sensory cells, *Molecular and Cellular Neuroscience*, 50, pp. 58-69.

Roper, M. H., Vandelaer, J. H. e Gasse, F. L. (2007). Maternal and neonatal tetanus, *Lancet*, 370, pp. 1947-1959.

Rosow, L. K. e Strober, J. B. (2015). Infant Botulism: Review and Clinical Update, *Pediatric Neurology*, 52, pp. 487-492.

Rossetto, O. et alii. (2000). Tetanus and botulinum neurotoxins: turning bad guys into good by research, *Toxicon*, 39, pp. 27-41.

Rossetto, O. et alii. (2006). Presynaptic enzymatic neurotoxins, *Journal of Neurochemistry*, 97, pp. 1534-1545.

Rossetto, O. et alii. (2011). An Update on the Mechanism of Action of Tetanus and Botulinum Neurotoxins, *Acta Chimica Slovenica*, 58, pp. 702-707.

Rossetto, O. et alii. (2013). Botulinum neurotoxins, *Toxicon*, 67, pp. 31-36.

Rossetto, O. et alii. (2013). Tetanus neurotoxin, *Toxicon*, 66, pp. 59-63.

Rossetto, O., Pirazzini, M. e Montecucco, C. (2014). Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights, *Nature Reviews Microbiology*, 12, pp. 535-549.

Sagane, Y. et alii. (2012). Botulinum Toxin Complex: A Delivery Vehicle of Botulinum Traveling Digestive Tract, *Structure and Function of Food Engineering*, pp. 138-150.

Saraiva, M. et alii. (2013). O Primeiro Caso de Botulismo Infantil em Portugal, disponível em <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/PublicacoesRepositorio/Documents/observacoesN52013_artigo6.pdf> [Consultado em 7/7/2015].

Shapiro, R. L., Hatheway, C. e Swerdlow, D. L. (1998). Botulism in the United States: A Clinical and Epidemiologic Review, *Annals of Internal Medicine*, 129(3) pp. 221-228.

Sheean, G. (2002). Botulinum Toxin for the Treatment of Musculoskeletal Pain and Spasm, *Current Pain and Headache Reports*, 6, pp. 460-469.

Silberstein, S. (2004). Botulinum Neurotoxins: Origins and Basic Mechanisms of Action, *Pain Practice*, 4, pp. S19-S26.

Simpson, L. (2004). Identification of the Major Steps in Botulinum Toxin action, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44, pp. 167-93.

Simpson, L. (2013). The life history of a botulinum toxin molecule, *Toxicon*, 68, pp. 40-59.

Singhal (2011). [Em linha]. Disponível em
<<http://www.authorstream.com/Presentation/RKSinghal-1137748-tetanus/>>.
[Consultado em 7/10/2015].

Singh, B. R., Li, B. e Read, D. (1995). Botulinum Versus Tetanus neurotoxins: Why is Botulinum Neurotoxin But Not Tetanus Neurotoxins a Food Poison?, *Toxicon*, 33(12), pp. 1541-1547.

Sobel, J. (2004). Foodborne Botulism in the United States, 1990-2000, *Emerging Infectious Diseases*, 10(9), pp. 1606-1611.

Sposito, M. (2009). Toxina Botulínica do Tipo A: mecanismo de ação, *Acta Fisiatras* 16(1), pp. 25-37.

Swaminathan, S. (2011). Molecular structures and functional relationships in clostridial neurotoxins, *FEBS Journal*, 278, pp. 4467-4485.

Taylor, A. M. (2006). Tetanus, *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, 6(3), pp. 101-104.

Thwaites, C. L. (2014). Botulism and tetanus, *Medicine*, 42(1), pp.11-13.

Thwaites, C. L., Beeching, N. J. e Newton, C. R. (2015). Maternal and neonatal tetanus, *Lancet*, 385, pp. 362-370.

Tighe, A. P. e Schiavo, G. (2013). Botulinum neurotoxins: Mechanism of action, *Toxicon*, 67, pp. 87-93.

Ting, P. e Freiman, A. (2004). The story of *Clostridium botulinum*: from food poisoning to Botox, *Clinical Medicine*, 4, pp. 258-261.

Turton, K., Chaddock, J. A. e Acharya, K. R. (2002). Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility, *TRENDS in Biochemical Sciences*, 27(11), pp. 252-258.

Verderio, C. et alii. (2006). Entering neurons: botulinum toxins and synaptic vesicle recycling, *EMBO reports*, 7(10), pp. 995-999.

Victoria (2013). [Em linha]. Disponível em
<<https://www.studyblue.com/notes/n/mico-exam-4-lecture-slides/deck/9050779>>.
[Consultado em 26/10/2015].

WHO, Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe 7th Report. Disponível em
<<http://www.bfr.bund.de/internet/7threport/CRs/por.pdf>> [Consultado em 1/09/2015].

WHO, 2005. Neonatal Tetanus Elimination Field Guide Second edition. Disponível em
<http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2011/FieldGuide_NeonatalTetanus_2ndEd_e.pdf>.
[Consultado em 19/10/2015].

Zhang, Z-C. et alii. (2010). Botulism, where are we now?, *Clinical Toxicology*, 48(9), pp. 867-879.