

Botulismo:

Revisão dos aspectos toxicológicos e perspectivas terapêuticas. (Parte I)

Carlos E. M. Santos

Graduando em Farmácia. Faculdade de Farmácia do Centro Universitário da Bahia. Bolsista do ProUni desde 2007. Estagiário de toxicologia da Intertox.

Resumo

As intoxicações alimentares constituem um dos significantes problemas de saúde pública, com grande incidência mesmo em países desenvolvidos. Embora dentre as mais raras, a intoxicação botulínica é das mais severas e fatais existentes, devido à grande potência da toxina, dificuldade diagnóstica e curta margem terapêutica dos antídotos usados. Com o conhecimento dos mecanismos bioquímicos da exocitose vesicular, incluindo a composição da maquinaria exocitótica SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor [NSF] attachment receptor) e seu respectivo conjunto de proteínas envolvidas nas etapas exocitóticas, tornou-se possível elucidar o mecanismo de ação tóxica da toxina botulínica, e direcionar os estudos de potenciais agentes terapêuticos para o botulismo. Nesse trabalho, faremos uma revisão sobre o botulismo; abordaremos as atuais informações sobre o mecanismo da exocitose, relacionando-as aos novos dados toxicológicos da neurotoxina botulínica; na parte II, descreveremos as recentes pesquisas, avanços e perspectivas na produção de antídotos com maior margem terapêutica no contexto do botulismo.

Palavras-chave: Botulismo, *Clostridium botulinum*, exocitose e neurotoxina botulínica.

Abstract

The food poisoning is one of significant public health problems, which high incidence even in developed countries. Although rare, botulism is among the most severe and fatal poisonings existing because the great power of the toxin, diagnostic difficulty and short therapeutic margin of antidotes used. With the knowledge of the biochemical mechanisms of vesicular exocytosis, including the composition of the machinery exocytotic SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor [NSF] attachment receptor) and its corresponding set of proteins involved in exocytotic steps, it became possible to elucidate the mechanism toxic action of botulinum toxin, and direct studies of potential therapeutic agents for botulism. In this work, we will review on botulism, discuss current information

about the mechanism of exocytosis by linking them to new toxicological data of botulinum neurotoxin; in the Part II, we'll describe recent research, advances and perspectives in the production of antidotes with greater therapeutic margin in the context of botulism.

Keywords: Botulism, *Clostridium botulinum*, botulinum neurotoxin and exocytosis.

Introdução

As intoxicações alimentares constituem um dos significantes problemas de saúde pública, com grande incidência mesmo em países desenvolvidos. Segundo um documento publicado pelo departamento de saúde pública de Massachusetts, nos Estados Unidos, ocorrem cerca de 76 milhões de casos por ano naquele país, por causas diversas, resultando em pelo menos 300 mil hospitalizações e 5 mil mortes (Massachusetts Department of Public Health, 2008). No Brasil, apesar da ampla problemática da subnotificação de casos, foram registrados, em 2007, 1449 casos de intoxicação por alimentos, com pelo menos 2 óbitos notificados (SINITOX, 2007). Embora dentre as mais raras, a intoxicação botulínica está entre as mais severas e fatais intoxicações existentes, devido à grande potência da toxina, à dificuldade diagnóstica e à curta margem terapêutica dos antídotos usados.

A neurotoxina botulínica (NTBo) é produzida pela bactéria gram-positiva e anaeróbica *Clostridium botulinum*, responsável pelo bloqueio neuromuscular e paralisia, decorrente da inibição de liberação de acetilcolina na fenda sináptica, estando envolvida no grupo das mais graves intoxicações por alimentos. Os mais importantes veículos da toxina são vegetais em conserva, derivados de carne e frutos do mar, associados a processamento e armazenamento inadequados. Outras formas de exposição à toxina relatadas na literatura são: infecção de feridas comuns, ou decorrentes do uso de drogas por via parenteral; iatrogênicas (uso de formulações com a toxina); e potenciais ataques terroristas.

A toxina foi inserida na prática médica em 1983, para tratar pacientes com estrabismo, sendo seu

uso expandido a outras desordens neuromusculares, com injeção local de ínfimas quantidades no músculo afetado (Timbrell, 2008). Atualmente algumas formas da toxina têm sido comercializadas, como o Botox® (neurotoxina tipo *A*) e o Myobloc® (neurotoxina tipo *B*), ambos com usos específicos aprovados pela FDA (Food and Drug Administration). O primeiro, é aprovado para o tratamento de blefaroespasma (espasmo das pálpebras), distonia cervical (espasmos musculares graves no pescoço) e hiperidrose axilar primária severa; e o segundo, aprovado para adultos com distonia cervical. O Botox® cosmético, também composto pela toxina tipo *A*, é usado no campo cosmiatria, para melhoria temporária de linhas e rugas na face, muitas vezes relacionado ao uso indiscriminado, com alto risco à saúde. A FDA recebeu várias notificações de reações adversas, relacionadas com a ação sistêmica da toxina, com efeitos como dificuldade de deglutição e dificuldade respiratória, sendo necessários tubos de alimentação e/ou ventilação mecânica como medidas de intervenção, com casos graves que resultaram em internação e/ou óbito. Esses casos graves de botulismo ocorreram após tratamento em diversas condições, com uma ampla faixa de doses, principalmente em pacientes pediátricos. Nos casos ocorridos em pacientes com idade inferior a 16 anos, para o tratamento de desordens neuromusculares, as doses variaram de 6,25-32 unidades/ Kg para o Botox®, e, de 388-625 unidades/Kg para Myobloc®; relacionando efeitos graves em doses típicas em pacientes com condições subjacentes (FDA, 2008).

Sete subtipos (*A-G*) de toxina foram descobertas, através de suas características antigênicas específicas, sendo que *A*, *B*, *E* e *F* envolvem as intoxicações humanas, e *C* e *D*, as intoxicações de importância veterinária. Existe ainda a distinção entre os subtipos *C1* e *C2*, segundo alguns autores. As neurotoxinas botulínicas são proteínas de alto peso molecular (~150 kDa), sintetizadas na forma inativa (cadeia única), e são ativadas por uma protease, para formar uma molécula de cadeia dupla, ambas ligadas através de ponte dissulfeto: uma cadeia leve (50 kDa), responsável pela ação tóxica, e uma cadeia pesada (100kDa), responsável pela translocação seletiva da cadeia leve ao citosol da célula nervosa (Zangh, 2009).

A neurotoxina botulínica está entre os mais potentes agentes tóxicos e, segundo Arnon (2001) *apud* Zangh (2009), a toxina apresenta DL50 (toxina tipo *A*) para ratos de 0,1 ng/Kg. Estimou-se

que apenas um grama da toxina cristalina, se dispersa de maneira proporcional (condição pouco provável), poderia matar cerca de um milhão de pessoas. Sabe-se bem que a toxina é termolábil, e o tratamento mínimo de 20 minutos a 79° C ou de 5 minutos a 85° C para a inativação de 1×10^5 DL50 de toxina botulínica tipos *A*, *B*, *E* e *F* para alimentos ácidos ou de baixa acidez é suficiente (Vega, 1986).

Com o conhecimento dos mecanismos bioquímicos da exocitose vesicular, incluindo a composição da maquinaria exocitótica SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor [NSF] attachment receptor) e seu respectivo conjunto de proteínas envolvidas nas etapas exocitóticas, tornou-se possível elucidar o mecanismo de ação tóxica da toxina botulínica, já que, anteriormente, sabia-se apenas da consequência: a inibição da liberação de acetilcolina, sem, no entanto, conhecer-se por qual mecanismo ocorria a inibição.

Bioquímica da exocitose

Desde a sugestão de Katz e col., em 1952, quanto à existência de vesículas envolvidas na liberação de acetilcolina nas junções neuromusculares, e nesses últimos anos, com os adventos da bioquímica estrutural e funcional e da biologia molecular, tornaram-se possíveis avanços na elucidação das estruturas protéicas e suas funções na exocitose, com consequentes possibilidades de investigar melhor a liberação de neurotransmissores e os mecanismos de regulação.

A liberação de acetilcolina na junção neuromuscular é realizada através da fusão de dois componentes: o complexo protéico da membrana da vesícula e o complexo protéico da membrana do terminal sináptico. O primeiro (v-SNARE) possui uma proteína essencial, a sinaptobrevina ou VAMP 2 (Vesicle-associated Membrane Protein); e o segundo (t-SNARE), é composto pela syntaxina e a SNAP-25 (synaptosomal-associated protein of 25 kDa), cujo direcionamento à membrana da superfície celular é específico (Lin e Scheller, 2000).

Segundo outros modelos atuais de exocitose, sugere-se que outras proteínas estão envolvidas no processo, tais como a Munc 18-1, que interage com as proteínas SNARE na fusão das membranas da vesícula e do terminal; a sinaptogamina1(Ca^{2+} sensor), que é sensível ao influxo de Ca^{2+} e dispara rapidamente a exocitose; e a proteína vesicular Rab3,

que regula a liberação exocitótica através da ligação à zona ativa das proteínas RIM1 α e RIM2 α (Sudhof, 2004).

A exocitose ocorre em etapas definidas - transporte, direcionamento, travamento, ancoragem e fusão -, nas quais uma série de interações proteína-proteína regula o transporte da vesícula do citosol neuronal à fenda sináptica. Sabe-se também que o evento exocitótico acontece de forma cíclica, ocorrendo rápidas etapas de liberação, dependentes do influxo de cálcio, e ainda, etapas de reciclagem através de endocitose, disponibilizando as vesículas para nova liberação de moléculas (Site do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, 2010).

Mecanismo da ação da toxina botulínica

Conforme anteriormente descrito, as toxinas são sintetizadas na forma inativa (cadeia única), e são ativadas por uma protease, para formar uma molécula de cadeia dupla, ambas ligadas através de ponte dissulfeto. A cadeia leve (50 kDa) é responsável pela ação tóxica, e a cadeia pesada (100kDa), responsável pela translocação seletiva da cadeia leve ao citosol da célula nervosa. Para confirmar a ausência de toxicidade da cadeia pesada, Zang e col. (2009) fizeram um ensaio de liberação de glicina, estimulada com 80 mM de K⁺, usando concentrações crescentes de cadeia pesada recombinante (rHC ou *recombinant Heavy Chain*) de toxina botulínica, comparando o grau de inibição com crescentes concentrações da neurotoxina tipo A, confirmando a ausência de toxicidade na primeira e a alta toxicidade da neurotoxina tipo A. (fig. 1).

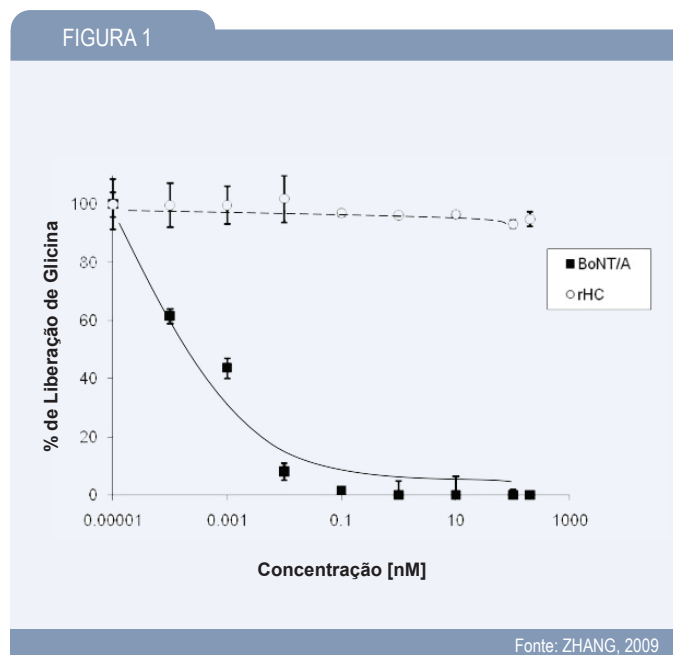


Figura 1. Curva concentração-efeito que expressa a taxa de liberação de glicina em culturas que foram

expostas a diferentes concentrações de neurotoxina-BoNT/A (■)-, ou de cadeia pesada recombinante - rHC (○)-, por 16 horas. A cadeia pesada da toxina (rHC), demonstrou ausência de atividade inibitória; enquanto, a BoNT/A (■) demonstrou potente atividade inibitória, sugerindo, portanto, ser a cadeia leve responsável pelo efeito tóxico. (Adaptado de Zhang, 2009.)

No citosol, essa cadeia leve age como uma Zn²⁺-endopeptidase contra proteínas-alvo intracelulares específicas, tanto na membrana plasmática como da vesícula sináptica, catalisando proteólise das mesmas, inibindo a liberação de neurotransmissores através da desativação da maquinaria exocitótica, assim causando o bloqueio e paralisia muscular.

Cada grupo de neurotoxina (A-G) cliva sítios específicos das proteínas do complexo SNARE, impedindo a montagem completa do complexo de proteínas envolvidas na fusão, e, conseqüentemente, o bloqueio da liberação de acetilcolina. As toxinas botulínicas tipo A, C e E clivam a SNAP-25 (25 kDa synaptosomal associated protein), sendo que o tipo C também cliva a syntaxina. As toxinas botulínicas do tipo B, D, F e G, clivam a sinaptobrevina (Arnon e Schechter, 2001).

Sumarizando, observa-se que 7 subtipos da neurotoxina possuem toxicidades distintas, conseqüentemente, diferentes escalas de duração de efeito, com ação em três alvos protéicos da maquinaria exocitótica: SNAP-25, syntaxina e sinaptobrevina. As mais graves manifestações clínicas em intoxicações humanas estão relacionadas ao tipo A da neurotoxina, devido ao tempo prolongado de ação no neurônio afetado (Thanongsaksrikul, 2010).

As históricas barreiras no tratamento da intoxicação botulínica e as atuais perspectivas terapêuticas

A terapia atual envolve medidas de suporte respiratório e administração da antitoxina de origem animal (geralmente, de origem equina) ou anticorpos recombinantes multivalentes. A grande dificuldade no tratamento atribui-se principalmente a uma variável cinética, já que após a entrada da neurotoxina na célula nervosa, a antitoxina não pode alcançá-la. Assim, com a síndrome já estabelecida, devido ao tempo de pós-exposição ou da fase diagnóstica, a janela terapêutica torna-se extremamente curta. Outro importante aspecto é a frequência com que ocorrem reações adversas no tratamento, devido à imunogenicidade do

antídoto, como no caso de doença do soro e reação anafilática fatal (Zangh, 2009; Thanongsaksrikul, 2010).

Assim, nos últimos anos, as novas abordagens na produção dos antídotos vêm sendo feitas visando-se resolver/minimizar o problema de ineficácia terapêutica, devido à incapacidade do agente de alcançar a toxina no citosol do neurônio; bem como redução da toxicidade, devido ao potencial imunogênico. Nesse contexto, as ferramentas de biotecnologia, química farmacêutica e farmacologia, têm sido empregadas no desenvolvimento de novos antídotos. Apesar do pouco interesse da indústria farmacêutica quanto à pesquisa/produção de novos antídotos, surgiram novas hipóteses e estudos com potencial de redução de toxicidade nos tratamentos existentes, bem como desenvolvimento de novos antídotos a partir do conhecimento da cinética e dos mecanismos bioquímicos de ação da neurotoxina. Esses os aspectos que procuraremos aprofundar em artigo posterior.

Referências bibliográficas:

- ARNON, S. S.; SCHECHTER, R.; INGLESBY, T.V. [et al.]. **Botulinum toxin as a health weapon**. The Journal of the American Medical Association, v.285, n.8, p. 1059-1070, 2001.
- FDA. - Food and Drug Administration. **Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook - Clostridium botulinum**. (Acessado em 16 de março de 2010). Disponível em: <http://www.fda.gov/food/foodsafety/foodborneillness/orneillnessfoodbornepathogensnaturaltoxins/badbugbook/ucm070000.htm>
- FDA. - Food and Drug Administration. **Early Communication about an Ongoing Safety Review of Botox and Botox Cosmetic (Botulinum toxin Type A) and Myobloc (Botulinum toxin Type B)**. (Acessado em 22 de junho de 2010). Disponível em: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/gSafetyInformationforPatientsandProviders/SafetyInformationforHeathcareProfessionals/ucm070366.htm>
- LIN, R. C.; SCHELLER, R. H.; [et. Al.] **Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis**. Annual Review Of Cell And Developmental Biology Journal, Stanford, v.16, p.19-49, 2000.
- Massachusetts Department of Public Health. - Food Protection Program. **Food Poisoning: What It Is and How to Report It in Massachusetts**. (Acessado em março de 2010). Disponível em: http://www.mass.gov/Eeohhs2/docs/dph/environmental/foodsafety/foodborne_illness/report_foodborne_illness.pdf
- Site do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFGM) **Ancoragem e fusão de vesículas sinápticas**. (Acessado em 15 de março de 2010). Disponível em: <http://www.icb.ufmg.br/biq/neuronet/grupob/fusao.htm>
- SUDHOF, Thomas C. The Synaptic Vesicle Cycle. **Annual Review Of Neuroscience**, Dallas, v.27, p. 509-547, 2004.
- THANONGSAKSRIKUL, J.; SRIMANOTE, P. [et. al.]. **AV H that neutralizes the zinc-metalloproteinase activity^H of botulinum neurotoxin type A**. The Journal of Biological Chemistry, V. 285, p 1-23, 2010.
- TIMBRELL, J. A. **Principles of Biochemical Toxicology**, London: U.K., 2008. p. 352-354.
- VEGA, Pedro Valle. **Toxicologia de Alimentos**. Metepec: Eco, 1986. p.45-49.
- ZHANG, Peng; RAY, Radharaman; SINGH, B. R; DAN, Li; ADLER, M.; RAY, P. **An efficient drug delivery vehicle for botulism countermeasure**. BMC Pharmacology, v.9, p. 9-12, 2009.