

Botulismo:

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

Carlos E. Santos - Graduando em Farmácia, Faculdade de Farmácia do Centro Universitário da Bahia. Bolsista do ProUni desde 2007. Estagiário de toxicologia da Intertox.

Email: carlos@intertox.com.br

Resumo

Nos últimos anos, o tema botulismo passou a permear os mais diversos campos do conhecimento, num múltiplo panorama de circunstâncias (em ataques biológicos; no uso clínico da toxina botulínica; em cosmiatria; e outros) distinto da antiga conhecida intoxicação alimentar. Como fator de preocupação, as opções terapêuticas atualmente disponíveis para a intoxicação botulínica, se limitam a neutralizar a toxina circulante, sendo que numa intoxicação já estabelecida, apresentam efeito terapêutico pouco significativo. Com os adventos da biotecnologia farmacêutica, como novo campo da farmacologia contemporânea, novos estudos buscam opções terapêuticas mais efetivas no tratamento do botulismo. O presente trabalho apresenta recentes e relevantes pesquisas sobre o tratamento do botulismo, com destaque de modernas abordagens farmacológicas; além de atualizar/discutir informações toxicológicas; as de caráter epidemiológico e as de saúde pública.

Palavras-chave: Botulismo, *Clostridium botulinum*, ataques biológicos, defesa química/biológica e neurotoxina botulínica.

Abstract

In recent years, the issue of botulism has begun to permeate the most diverse fields of knowledge, in a multiple view of circumstances (in biological attacks, the clinical use of botulinum toxin, in cosmiatry, and others), distinct from the earliest known food poisoning. As matter of concern, the therapeutic options currently available for botulism, are limited to neutralize the circulating toxin, with an already established poisoning, have hardly therapeutic effect. With advances in pharmaceutical biotechnology as a new field of pharmacology contemporary, new studies seek more effective therapeutic options in the treatment of botulism. This paper presents recent and relevant research on the treatment of botulism, especially in modern pharmacological approaches, and to update / discuss toxicological information, of epidemiological character and public health.

Keywords: Botulism, *Clostridium botulinum*, biological attacks, chemical and biological defense and botulinum neurotoxin.

Introdução

Com os adventos das ciências toxicológicas, o tema botulismo passou a permear os mais diversos campos do conhecimento, como o da toxicologia veterinária; da toxicologia de alimentos; da segurança de medicamentos (relacionado ao uso clínico da toxina); da segurança de cosméticos (uso da toxina em cosmética); e da segurança/defesa química (no contexto dos atentados terroristas e da guerra química/biológica). Assim, atualmente, a busca de antídoto eficaz para o botulismo, não está relacionada apenas às intoxicações alimentares, mas ao tratamento do botulismo em outras demais relevantes circunstâncias.

Conforme visto em publicação anterior¹, a neurotoxina botulínica (NTBo), produzida pela bactéria gram-positiva *Clostridium botulinum*, é considerada uma das mais potentes toxinas existentes (Arnon, 2001). A NTBo é sintetizada na sua forma inativa, como cadeia única, e é ativada por uma protease, formando uma molécula de cadeia dupla; uma cadeia leve (50 kDa) e uma cadeia pesada (100 kDa), ambas ligadas por ponte dissulfeto. A cadeia leve é uma enzima zinco-dependente, responsável pela atividade tóxica, e a segunda, atóxica, é responsável pela translocação seletiva da cadeia leve ao citosol da célula nervosa (Moe, 2009; Zangh, 2009; Thanongsaksrikul, 2010).

Segundo Simpsom (2004) *apud* Boldt (2006), a ação tóxica da neurotoxina botulínica envolveria quatro etapas: (1) a ligação da toxina na superfície do terminal neuromotor; (2) internalização do complexo toxina- receptor para o citoplasma; (3) translocação da toxina dependente de *pH*; (4) clivagem proteolítica de uma das proteínas do complexo *SNARE* envolvidas na exocitose, com conseqüente inibição da liberação de acetilcolina, causando a paralisia muscular. Arnon

e col. (2001) já haviam descrito que cada subgrupo de toxina (*A-G*) possui proteínas-alvo específicas do complexo *SNARE*, como no caso das toxinas *A*, *C* e *E* que clivam especificamente a *SNAP-25* (25 kDa synaptosomal associated protein).

Atualmente, existem antitoxinas disponíveis para a intoxicação botulínica, no entanto, sabe-se que a antitoxina neutraliza apenas a toxina circulante, sem reverter a síndrome quando já estabelecida (Arnon, 2001; Moe, 2009; Zhang, 2009; Roxas-Duncan, 2009;). Sugere-se que o antídoto ideal tenha que ser capaz de alcançar a toxina no citosol do neurônio afetado, restaurando o processo de exocitose, e conseqüentemente, a função sináptica no terminal neuromotor (Zhang, 2009; Thanongsaksrikul, 2010).

O Instituto de Pesquisa Médica da Defesa Química do Exército dos Estados Unidos (*United States Army Medical Research Institute of Chemical Defense – USAMRICD*) e o Instituto de Pesquisa Médica de Doenças Infecciosas do Exército dos Estados Unidos (*USARIID*) vêm realizando várias pesquisas em cooperação com universidades daquele país, relacionadas à defesa química, temendo atentados com agentes biológicos, como a toxina botulínica.

Com a união de conhecimentos de toxicologia, farmacologia, biotecnologia, imunologia e química farmacêutica, novas pesquisas afrontam o então conhecido “obstáculo cinético”, a fim de alcançar a toxina dentro do neurônio. O presente trabalho objetiva mostrar recentes e relevantes pesquisas sobre o tratamento do botulismo, destacando modernas abordagens farmacológicas; além de atualizar/discutir informações toxicológicas; as de caráter epidemiológico e as de saúde pública.

A Farmacologia Contemporânea e as Atuais Perspectivas Terapêuticas para o Botulismo

A farmacologia contemporânea não está mais relacionada, apenas, aos estudos de relação estrutura-atividade. Ela não se restringe unicamente à descoberta de moléculas menores compatíveis com receptores, através de técnicas computacionais da química medicinal (muito útil, e ainda considerada moderna); mas no contexto da biotecnologia farmacêutica, com a chegada das *modalidades terapêuticas baseadas em proteínas*: moléculas cada vez maiores (hormônios, fatores de crescimento, fragmentos de anticorpos e outros), mais específicas e funcionais, que junto à Farmacogenética e Farmacogenômica, constituem as fronteiras da nova Farmacologia.

A produção de modalidades terapêuticas baseadas em proteínas, através de engenharia genética, com a tecnologia do *DNA recombinante*, vem apresentando vantagens em relação a proteínas de origem biológica animal e humana (ex: soros de origem imunológica e proteínas de origem placentária); viabilidade de produção; pouca imunogenicidade; menor risco de exposição a doenças animais ou humanas a partir de seus respectivos produtos biológicos; e aumento da especificidade (Golan, 2009).

A primeira abordagem terapêutica da engenharia genética, que foi a produção de insulina humana recombinante, obtida pela inserção do gene humano da insulina em *Escherichia coli*, foi aprovada nos Estados Unidos já na década de 1980. Entre os produtos biológicos, um grande número de proteínas recombinantes para fins diagnósticos e terapêuticos já foi aprovado pela *FDA* (Food and Drug Administration) nos últimos anos, como fatores de coagulação, fatores de crescimento, anticorpos (e fragmentos), entre outros¹ (FDA, 2010).

No contexto do botulismo, como já destacado anteriormente, as atuais alternativas terapêuticas consistem na administração de antitoxinas disponíveis, que se limitam a neutralizar a NTBo circulante, mas

que estando a síndrome já estabelecida, devido ao tempo de pós-exposição ou da fase diagnóstica, o efeito terapêutico geralmente obtido é pouco significativo, já que as antitoxinas não alcançam a toxina no citosol do neurônio afetado. Ocorrem, com frequência, reações adversas no tratamento, devido à imunogenicidade do antídoto, como no caso de doença do soro e reação anafilática fatal; além da inviabilidade de uso em larga escala, como no caso de um atentado terrorista biológico (Capková, 2007; Zangh, 2009; Thanongsaksrikul, 2010). Tais fatores justificam a busca de novos antídotos com menor imunogenicidade e maior eficácia.

Derivados do ácido hidroxâmico inibidores da NTBo tipo A

Janda e col. (2007), através de técnicas de ensaio biológico automatizado, *high-throughput screening*, avaliaram uma quimioteca de derivados do ácido hidroxâmico quanto ao potencial de inibição à NTBo A. O ensaio revelou que o 4-clorocinâmico hidroxamato, com IC_{50} (Concentração inibitória 50) de 15 μ M, seria a estrutura mais adequada. A partir desta, os autores realizaram mudanças estruturais e obtiveram uma série de componentes para avaliação da relação estrutura-atividade. Os derivados obtidos do 2,4-diclorohidroxâmico hidroxamato, foram submetidos ao ensaio enzimático FRET-based assay, que examina a atividade enzimática através da intensidade de fluorescência, e mostraram-se, segundo os autores naquela data, o mais potentes inibidores não-peptídicos da NTBo, com $IC_{50} < 1 \mu$ M.

Análogos do mercaptoacetamida inibidores da NTBo tipo A

Moe e col. (2009), baseados em estudos de Janda e col. (2006), verificaram a hipótese de que inibidores de metaloproteínases, que agem através de efeito quelante, seriam modelos adequados para o

¹ FDA – Produtos biológicos aprovados para uso - 2010:

<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/DevelopmentApprovalProcess/BiologicalApprovalsbyYear/default.htm>

planejamento de inibidores da cadeia leve da NTBo tipo A, já que a mesma é uma enzima zinco-dependente. Partindo da estrutura do princípio ativo do Captopril, (S)-1-(3-mercaptopropil)-L-prolina, um conhecido anti-hipertensivo, inibidor da ECA (Enzima Conversora da Angiotensina I), planejou-se um modelo de inibidor da toxina tipo A. Os estudos de Relação Estrutura-Atividade (REA) demonstraram que a presença do átomo de enxofre, bem como sua posição na molécula, eram fatores críticos para a atividade inibitória da toxina A. Ao retirar o grupo tiol, e, ao mudar sua posição na estrutura, a atividade ou era abolida ou se tornava 40 vezes menor, respectivamente. Devido aos critérios de facilidade de síntese e os resultados obtidos em estudos de REA, chegou-se à conclusão de que os derivados seriam obtidos a partir da 2-mercaptopropionamida.

No ensaio bioquímico, a toxina (enzima) e o inibidor foram incubados por 30 minutos, antes de se adicionar os substratos, o que representa um importante aspecto a ser discutido (ver seção discussão). Para calcular a atividade inibitória, os autores utilizaram os resultados dos ensaios bioquímicos com substratos fluorescentes, calculando a atividade inibitória através de *software*.

Segundo os autores, o resultado dos estudos sugeriu que derivados da mercaptopropionamida possuem equipotência na atividade inibitória contra a toxina A, em relação aos derivados do ácido hidroxâmico, estudados por Janda e Col. (2007), que seriam os mais potentes até a referida data de publicação. Os melhores derivados da mercaptopropionamida apresentaram $IC_{50} = 2.4 \pm 0.6 \mu M$.

Derivados no quinolinol inibidores da NTBo tipo A

Roxans-Duncan e col. (2009), integrantes do grupo de pesquisa do Instituto de Pesquisa Médica de Doenças Infecciosas do Exército dos Estados Unidos (USARIID), utilizaram tecnologias computacionais para a obtenção de pequenas moléculas inibidoras da cadeia leve da neurotoxina botulínica, para realização de posteriores ensaios enzimáticos, *in vivo* e *ex vivo*. Após triagem inicial virtual de moléculas, 100 componentes selecionados foram avaliados em ensaio enzimático, dos quais, apenas 7 inibiram a atividade da NTBo A. O candidato inibidor avaliado como menos tóxico pelos autores, após pesquisa em base

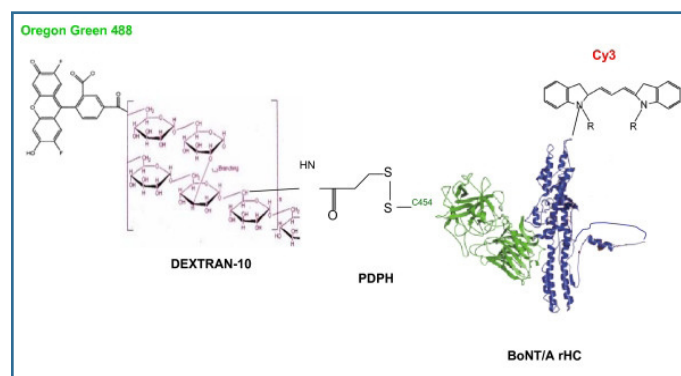
de dados, foi o [7-((4-nitroanilino)(fenil) metil-8-quinolinol)], modelo molecular a partir do qual foram sintetizados outros análogos. Dos análogos obtidos, cinco derivados do quinolinol inibiram potentemente a cadeia leve da toxina A, e foram submetidos a ensaios *in vivo* e *ex vivo*, utilizando-se células de neuroblastoma e tecido de nervo hemidiafragmático de ratos, respectivamente.

Como na abordagem de Janda e col. (2006), os autores misturaram primeiro a toxina e o inibidor numa mesma solução, expondo à mistura, a cultura e o tecido, e verificando o grau de proteção ao efeito tóxico da toxina. Os cinco análogos inibiram de maneira efetiva a toxina nos ensaios, sendo que um dos análogos apresentou proteção *ex vivo* a $0,5 \mu M$. Segundo os autores, até a data de publicação, este constituía o mais potente inibidor relatado em ensaio *ex vivo*.

Drug Delivery Vehicle – DDV

Sabendo que a ineficácia terapêutica da antitoxina botulínica deve-se à incapacidade da mesma de alcançar a neurotoxina no citosol do neurônio do terminal intoxicado, Zhang e col. (2009) desenvolveram o chamado *veículo de entrega da droga* (Drug Delivery Vehicle - DDV), um composto baseado em proteína, nesse caso, na cadeia pesada da toxina A (*recombinant heavy chain ou rHC*) – responsável pela entrega da toxina em sua forma natural –, obtido com ferramentas da biotecnologia.

O DDV é composto pela cadeia pesada recombinante da neurotoxina A ou rHC, acoplado ao dextran de 10 kDa, pela fração amino, através do ligador heterobifuncional ou “*linker*” PDPH ou 3-(2-piridiltio)-propionil-hidrazida (ver Fig. 1). O rHC serve como direcionador alvo-celular específico,

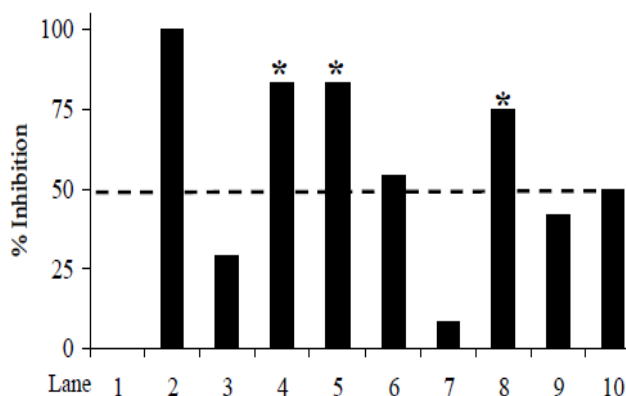


promovendo a internalização do complexo pelos neurônios sensíveis à toxina A; e o dextran como uma plataforma de entrega de agentes terapêuticos específicos para o citosol da célula-alvo.

Para verificar a internalização do complexo e a liberação do dextran no citosol dos neurônios, os autores utilizaram culturas de neurônios de medula espinhal de camundongos, usando um composto OG-488 ligado ao dextran, observando a intensidade de fluorescência através de microscopia confocal. Os resultados sugeriram que o DDV é internalizado pelo mesmo receptor da toxina botulínica, via endocitose, ocorrendo a liberação do dextran para o citosol. Este processo foi dependente do grau de maturação das células, sendo que o nível de liberação da droga modelo foi de até 40% em células com grau de maturação de três semanas.

Heavy chain antibody fragment – VH/VHH

Com o conhecimento de que fragmentos de anticorpos possuem relativa estabilidade e alta capacidade de penetração tecidual, devido ao pequeno tamanho (~ 15-20kDa), e, considerando também que, em diferentes estudos, domínios variáveis de cadeia pesada de anticorpos (VH) de origem camelídea mostraram-se potentes inibidores enzimáticos, Thanongsaksrikul e col. (2010), do Instituto de Pesquisa Médica da Defesa Química do Exército dos Estados Unidos (*United States Army Medical Research Institute of Chemical Defense – USAMRICD*), construíram, por meio de ferramentas da biologia molecular, o *fragmento de cadeia pesada de anticorpo (heavy chain antibody fragment – VH/VHH)* específico para toxina botulínica tipo A. Foi feita extração do RNA de células B do sangue periférico de camelo não-imune (*Camelus dromedarius*), e através de transcrição reversa, obtiveram-se seqüências de DNA complementar (DNAC) que codificavam o domínio variável das imunoglobulinas. Os subtipos de fragmentos de imunoglobulina obtidos neutralizaram em diferentes escalas a atividade da neurotoxina em SNAP-25. (fig. 2)



Comparando os fragmentos que exibiram os melhores resultados de inibição no Western Blot (VH 15, VH 22 e VHH 17) em um segundo teste, o VHH 17 apresentou maior atividade inibitória (faixa de 73-92%) que o VH 15 e VH 22 (59% e 64%, respectivamente). A grande capacidade de neutralização do VHH17 é atribuída à longa seqüência da CDR3 (Região Determinante de Complementaridade 3), bastante compatível com sítio ativo da enzima/toxina, o qual é normalmente inacessível a outros anticorpos de tamanhos convencionais.

Discussão

Os três primeiros estudos sobre desenho de inibidores, apesar de considerarem a problemática da cinética da toxina, apresentaram em suas respectivas metodologias ensaios para verificar efeito protetor, e não o efeito reparador – capaz de restaurar a função do neurônio e apropriado para uma intoxicação já estabelecida. Nos ensaios bioquímicos e celulares, os autores expuseram primeiro a cadeia leve da toxina A aos inibidores, e posteriormente, verificavam o grau de inibição à toxina nas culturas submetidas à mistura inibidor-toxina (exceção da abordagem 1, que realizou apenas ensaio enzimático). Sendo assim, nos três primeiros estudos, foi avaliada apenas a capacidade de inibição da toxina livre pelos derivados, e a caracterização de efeito protetor às culturas expostas à mistura inibidor toxina. Desta categoria de efeito poderíamos reunir outras dezenas de estudos dos últimos três anos, mas avaliaríamos apenas uma cansativa seqüência de resultados de IC_{50} .

Nos dois últimos estudos (DDV e VH/VHH), com as modalidades terapêuticas baseadas em proteínas, no entanto, almejava-se o efeito restaurador. A cultura era primeiro exposta à cadeia leve da toxina, sendo internalizada pelas células, e posteriormente, adicionava-se a molécula terapêutica (ou veículo), avaliando-se a capacidade do inibidor de alcançar a toxina no citosol, sendo portanto, estes ensaios, de avaliação de efeito restaurador.

Figura 2. Grau de inibição à cadeia leve da toxina botulínica A (LC/BoTx A) de cada uma das formas de VH/VHH produzidas, determinado através de Western blot. VH 15, VH 22 (Lane 4 e 8) e VH 17 (Lane 5) inibiram eficientemente a hidrólise de SNAP-25 exposta a 1 nM de LC/BoTx A. Lanes 1 e 2, correspondem às faixas dos controles negativo e positivo, respectivamente. (Adaptado de Thanongsaksrikul, 2010.)

Saúde Pública

Aspectos epidemiológicos

No Brasil, o botulismo já era doença de notificação compulsória (Portaria GM/MS nº 1943, de 18 de outubro de 2001), e, tendo em vista sua gravidade, apenas um caso já é considerado surto e emergência de saúde pública (Ministério da Saúde, 2006). Foi implantado, em 2002, o sistema de Vigilância Epidemiológica de Doenças Transmitidas por Alimentos (VE – DTA), no qual notificações, incluindo casos de botulismo alimentar, são feitas em nível municipal, estadual e federal, e com atribuições específicas às secretarias e outros órgãos participantes.

Atualmente, surge nova portaria do Ministério da Saúde (Portaria nº 2472, de 31 de agosto de 2010), cujo conteúdo se refere à relação de doenças, eventos e agravos à saúde pública de notificação compulsória em território nacional. Quanto ao botulismo, o referido documento normaliza a notificação imediata, em no máximo 24 horas a partir da suspeita inicial, às Secretarias de Saúde (municipal e estadual), as quais deverão informar imediatamente à Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde (MS, 2010).

Segundo dados do Ministério da Saúde, foram confirmados e notificados de 1999 a 2008, 41 casos de botulismo no Brasil (MS, 2008). O número de casos de botulismo é ainda relativamente alto nos países desenvolvidos, e consoante dados da Comunidade Européia, foram notificados 1376 casos de botulismo (por causas diversas) nos Estados Unidos de 1997 a 2006 (*European Commission Health And Consumers Directorate-General*, 2009)². Tais informações podem sugerir possível quadro de subnotificação no Brasil.

Conforme informações do CDC (*Center for Disease Control and Prevention*), entre os casos de botulismo registrados de 1997-2007 nos EUA, de 20

a 50 em cada ano eram relacionados ao “*Botulism others*”, ou botulismo por outras causas (inclui-se botulismo de feridas, quase que exclusivamente em usuários de um tipo específico de heroína e os casos não-especificados). O número de casos notificados de botulismo alimentar representou aproximadamente o mesmo número de casos da categoria anteriormente citada, sendo os surtos mais comuns provenientes do consumo de conservas caseiras, alimentos fermentados e enlatados. Segundo a mesma fonte, o botulismo infantil é o que possui maior incidência e prevalência naquele país (CDC, 2010)³.

A questão da segurança/defesa química

Atualmente, presenciam-se, ao lado do notável desenvolvimento científico da humanidade, as diversas faces de um uso indevido do conhecimento toxicológico, como os atos terroristas e a guerra em que empregam-se agentes químicos (e microbiológicos). Muitos países têm investido em pesquisas para o desenvolvimento de antídoto para o botulismo, em função das potenciais ameaças de ataques com agentes biológicos.

Segundo Arnone col. (2010), em um documento intitulado “*Botulinum Toxin as a Biological weapon – Medical and Public Health Management*”, o Iraque teria admitido às Nações Unidas ter produzido 19 mil litros de toxina botulínica concentrada após a guerra do Golfo, em 1991, o que representaria o triplo da quantidade necessária para matar a população mundial inteira pela via inalatória. Segundo o mesmo documento, já na década de 1930, um grupo japonês teria utilizado culturas de *C. botulinum* contra prisioneiros na ocupação da Manchúria. O documento, além de relatar o histórico de diversos eventos relacionados ao uso da neurotoxina para fins bélicos, fornece informações de prevenção, controle e descontaminação em casos emergenciais.

² European Commission - Health and Consumers Directorate-General. Botulism, number of cases 1997-2007. (Acessado em 5 de agosto de 2010). Disponível em: http://ec.europa.eu/health/ph_information/dissemination/echi/docs/botulism_en.pdf

³ CDC – Center for Disease Control and Prevention. Summary of notifiable diseases. Botulism, number of reported cases 1987-2007. (Acessado em 5 de agosto de 2010). Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncepid/diss/nndss/annsum/2007/07graphs.htm>

Considerações Finais

Embora a disponibilidade de antídotos seguros e efetivos para o botulismo pareça estar próxima, as ações preventivas ainda são a alternativa mais apropriada. Torna-se necessário rever no Brasil três aspectos no contexto do botulismo: (i) a problemática da provável subnotificação de casos – Vigilância Epidemiológica integral; (ii) a questão do pouco interesse das lideranças no país na temática da segurança/defesa química – Segurança Química Nacional; e (iii) o pouco interesse em pesquisa no contexto de antídotos e outros aspectos relacionados ao botulismo.

Embora haja divergência entre os dados epidemiológicos da Comunidade Européia e os dados americanos (CDC), o número de casos de botulismo é relativamente alto nos EUA. Considerando-se que os países desenvolvidos possuem maior qualidade sanitária, econômica, social e científica, com conseqüente efetividade nas ações de vigilância sanitária e epidemiológica; questiona-se, numa amplitude de 9 anos, um número tão inferior de casos registrados de botulismo no Brasil.

Além da suspeita de subnotificação de casos, observa-se que é necessário visualizar o botulismo de uma forma mais contemporânea, em todos seus possíveis cenários e circunstâncias, como no uso de drogas de abuso injetáveis; o botulismo infantil; na cosmética; no uso terapêutico da toxina; e outros. Considerando que cada uma dessas circunstâncias de exposição à toxina possui diferentes variáveis, e carecem de medidas de intervenção e controle específicas; torna-se evidente a necessidade de dispor os dados de maneira organizada, almejando-

se conhecer os respectivos perfis epidemiológicos, e intervir por meio de políticas específicas para cada caso.

A ampla discussão de outros países em torno da segurança/defesa química evidencia o real cenário do mundo atual em relação a ataques químicos e biológicos. Como caminho mais sensato, o Brasil deve acompanhar e internalizar o tema da segurança/defesa química, e apesar de já existir setor de defesa química, biológica e nuclear no país, é necessário contextualizar a defesa nacional harmonicamente com as novas (e constantes) informações toxicológicas de qualidade. A informação toxicológica crível é ferramenta imprescindível para qualquer avaliação de risco, e conseqüentemente, para qualquer medida preventiva ou de remediação, especialmente em um eventual acometimento por ataque químico/biológico. O risco toxicológico deve ser visualizado à altura de sua importância para a saúde pública, em todas as possibilidades.

O desenvolvimento da toxicologia, da química farmacêutica e da biotecnologia no país demanda maiores investimentos e incentivos. Apesar de algumas intoxicações serem de baixa incidência, aquelas severas que não possuem tratamento, conhecidamente, demandam mais trabalho de manejo e representam custos elevados em saúde, necessitando de maiores investigações quanto ao seu impacto nos sistemas de saúde. A pesquisa de antídotos para o botulismo até o presente momento está ausente de nossas instituições de ensino e da indústria no país.

Referências

- 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.
- BOLDT, G. E.; EUBANKS, L. M.; JANDA, K. D. **Identification of a botulinum neurotoxin A protease inhibitor displaying efficacy in a cellular model**. Chemical Communication, p.3063-3065, 2006.
- Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Número de casos de Botulismo 1999-2000**. (Acessado em 5 de agosto de 2010). Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/CASOS%20CONF%20BOTULISMO.pdf>
- Brasil. Ministério da Saúde. **Portaria nº 2472 de 31 de agosto de 2010**: Define as terminologias adotadas em legislação nacional, conforme disposto no Regulamento Sanitário Internacional 2005 (RSI 2005), a relação de doenças, agravos e eventos em saúde pública de notificação compulsória em todo o território nacional e estabelecer fluxo, critérios, responsabilidades e atribuições aos profissionais e serviços de saúde. Brasília, DF, 2010.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância epidemiológica do botulismo**. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2006.
- CDC – Center for Disease Control and Prevention. **Summary of notifiable diseases. Botulism, number of reported cases 1987-2007**. (Acessado em 5 de agosto de 2010). Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncphi/diss/nndss/annsum/2007/07graphs.htm>
- CAPKOVÁ, K.; YONEDA, Y.; DICKERSON, T. J.; JANDA, K. D. **Synthesis and structure-activity relationships of second-generation hydroxamate botulinum neurotoxin A protease inhibitors**. Bioorganic & Medicinal Chemistry, vol.17, n.23, p. 6463-6466, 2007.
- European Commission - Health and Consumers Directorate-General. **Botulism, number of cases 1997-2007**. (Acessado em 5 de agosto de 2010). Disponível em: http://ec.europa.eu/health/ph_information/dissemination/echi/docs/botulism_en.pdf
- FDA- Food and Drug Administration. **Celebrating a Milestone: FDA's Approval of First Genetically-Engineered Product**. (Acessado em 01 de setembro de 2010) Disponível em: <http://www.fda.gov/AboutFDA/WhatWeDo/History/ProductRegulation/SelectionsFromFDLIUpdateSeriesonFDAHistory/ucm081964.htm>
- FDA- Food and Drug Administration. **Biological Approvals by Year**. (Acessado em 01 de setembro de 2010) Disponível em: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/DevelopmentApprovalProcess/BiologicalApprovalsbyYear/default.htm>
- GOLAN, D. E. [et. al.]. As fronteiras da farmacologia. In: LEADER, B. **As bases fisiopatológicas da farmacologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 859-875
- MOE, T. S.; THOMPSON, A. B.; SMITH, G. M. [et. al.]. **Botulinum neurotoxin serotype A inhibitors: small-molecule mercaptoacetamide analogs**. Bioorganic & Medicinal Chemistry, vol.17, n.8, p. 3072 - 3079, 2010.
- ROXAS-DUNCAN, V.; ENYEDY, I.; MONTGOMERY, V. A.; ECCARD, S. V. **Identification and biochemical characterization of small-molecule inhibitors of Clostridium botulinum neurotoxin serotype A**. American Society for Microbiology, v. 53, n.8, p. 3478-3486, 2009.
- SANTOS, C. E. M. **Botulismo: revisão dos aspectos toxicológicos e perspectivas terapêuticas (parte I)**. Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade, v.3, n.2, p.21-24, mar/jun, 2010. Disponível em: <http://www.intertox.com.br/documentos/v3n2/rev-v03-n02-03.pdf>
- THANONGSAKSRIKUL, J.; SRIMANOTE, P. [et. al.]. **A V H that neutralizes the zinc-metalloproteinase activity of botulinum neurotoxin type A**. The Journal of Biological Chemistry, V. 285, p 1-23, 2010.
- ZHANG, P.; RAY, R.; SINGH, B. R.; DAN, L.; ADLER, M.; RAY, P. **An efficient drug delivery vehicle for botulism countermeasure**. BMC Pharmacology, v.9, p. 9-12, 2009.