

# Universidade de São Paulo Instituto de Medicina Tropical



## **Giselle Pacifico Sartori**

Caracterização e avaliação da atividade enzimática da toxina tetânica submetida à radiação gama por Cobalto 60

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Prof. Dr. Andrés Jimenez Galisteo Júnior

São Paulo 2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

© Reprodução autorizada pelo autor

## Sartori, Giselle Pacifico

Caracterização e avaliação da atividade enzimática da toxina tetânica submetida a radiação gama por Cobalto 60 / Giselle Pacifico Sartori. – São Paulo, 2019.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional Orientador: Andrés Jimenez Galisteo Jr.

Descritores: 1. CLOSTRIDIUM TETANI. 2. TÉTANO. 3. TOXINAS. 4. RADIAÇÃO GAMA. 5. PROTEÍNAS - ESTRUTURA.

USP/IMTSP/BIB-11/2019.

Dedico esta dissertação à minha mãe Zulmira Pacifico Sartori que sempre esteve ao meu lado me apoiando em todos os momentos da vida e, com grande esforço, contribuiu para os meus estudos.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador **Dr. Andrés Jimenez Galisteo Júnior** pela orientação, dedicação e paciência e pela oportunidade de me receber como aluna mesmo sem conhecimento prévio nas linhas de pesquisas realizadas no laboratório. Suas críticas construtivas, reflexões e discussões foram fundamentais para meu crescimento científico.

Ao professor **Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior** por abrir as portas do laboratório de Protozoologia e dar oportunidade para o primeiro contato com o laboratório.

Ao Instituto de Medicina Tropical e ao Laboratório de Protozoologia por disponibilizar a infraestrutura para a realização deste trabalho.

Ao **Dr. Patrick Jack Spencer** pelas discussões e sugestões e por me ajudar prontamente sempre que precisei.

Á **Fernanda Lucio dos Santos Macarini**, coordenadora de produção do Serviço de Bacteriologia - Seção de Vacinas Anaeróbicas: Tétano e Botulínico do Instituto Butantan que contribuiu grandemente pela doação da toxina tetânica para a realização do nosso projeto.

Á Prof.<sup>a</sup> **Dra. Marta Heloísa Lopes** - Coordenadora do Centro de Imunizações do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelo fornecimento da vacina dupla toxóide diftérico e tetânico.

Ao Dr. **Douglas Ceolin Mariano** e Dr. **Daniel Carvalho Pimenta** pela acolhida e solicitude no laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan para a realização do MALDI-TOF e Análise de peptídeos. Os ensinamentos que vocês proporcionaram foram valiosos.

Ao Dr. Ivo Lebrun do laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan pelo fornecimento do substrato FRET contribuindo para a etapa final deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pela bolsa de mestrado.

Ao Luciano Monteiro da Silva por sempre auxiliar no dia a dia do laboratório.

À secretária da pós-graduação do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, **Eliane Araújo**, por todo suporte prestado.

À **Monica de Paula Leal** pela assistência diária e pelas experiências que compartilhou comigo.

Aos meus queridos colegas da Protozoologia, Marilva Savoia, Norival Kesper, Flávia Freitas, Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman, Cayuan Brandão, Angélica Moura, Elizama Carneiro, Dennis Fujita, Sandra Regina pelos momentos de descontração.

Aos amigos que fiz no Instituto de Medicina Tropical: Andréa Costa, Alex Nazaré,

Camila Carvalho, Jaqueline Polizeli, Thiago Fidelis pelo auxílio nos

experimentos e apoio no dia a dia. Obrigada por todo carinho, pelos bons

momentos compartilhados e as várias histórias e risadas que tornaram os dias no laboratório muito mais alegres.

Ao **Luiz Henrique da Silva Nali** pelo amor, por sempre me incentivar, seu apoio nesses dois anos foi essencial. Obrigada pela parceria nessa luta diária e pelos momentos ao seu lado tornando tudo especial.

Ao meu filho **Ricardo Toledo Damião Neto**, por sempre compreender as minhas ausências e minhas falhas. Por hoje vê-lo forte e com valores admiráveis iniciando sua jornada na vida. Obrigada por ser o meu maior motivo para nunca ter desistido e permanecido firme todos esses anos, sempre pensei no seu melhor.

Aos meus irmãos **Leandro Pacifico Sartori** e **Flávio Pacifico Sartori** pela amizade e por sempre torcerem por mim, a ajuda no dia a dia fez toda a diferença para que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais Mauro Sartori (in memorian) e Zulmira Pacifico Sartori por mostrarem o valor dos estudos e a importância do respeito ao próximo, me mostrando que a honestidade e a luta é a melhor forma de alcançar os nossos objetivos. Obrigada por todo apoio e por lutarem sempre comigo, só consegui chegar aqui graças a tudo que fizeram por mim. Pai, mesmo não estando mais presente, o senhor foi importante no início deste sonho, me ajudou até os seus últimos momentos, jamais esquecerei...saudade!

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

vii		٧	i	i	
-----	--	---	---	---	--

"Não há arte patriótica nem ciência patriótica. As duas, tal como tudo que é bom e elevado, pertencem ao mundo inteiro e não pode progredir a não ser pela livre ação recíproca de todos os contemporâneos e tendo sempre em contra aquilo que nos resta e aquilo que conhecemos do passado."

**Johann Goethe** 

## **RESUMO**

Sartori GP. Caracterização e avaliação da atividade enzimática da toxina tetânica submetida à radiação gama por Cobalto 60 (Dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo; 2019.

O tétano é uma doença aguda de alta letalidade que acomete os terminais nervosos impedindo a liberação de neurotransmissores inibitórios. Considerada uma das toxinas microbianas mais potentes, o tétano ainda é um grave problema de saúde pública em países subdesenvolvidos e sua principal forma de prevenção se dá através da imunização. A vacina antitetânica é produzida a partir da inativação da TeNT por formaldeído e pode causar diversos efeitos adversos. Uma alternativa atualmente estudada é o uso da radiação ionizante para a diminuição da toxicidade de proteínas melhorando sua capacidade imunogênica e reduzindo reações adversas pós-vacinais. A partir disso, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar o efeito da radiação ionizante na estrutura da toxina tetânica submetida a diferentes doses de radiação gama por Cobalto 60 e analisar a atividade enzimática residual após a exposição à radiação. A modificação estrutural na toxina tetânica após a radiação foi determinada por SDS PAGE, que evidenciou uma modificação gradual no perfil das proteínas com perda no volume da banda conforme o aumento da dose e o surgimento de bandas a partir da dose de 5 kGy. A análise por MALDI-TOF demonstrou fragmentações nas massas moleculares conforme o aumento da dose e possíveis agregações de fragmentos proteicos em doses mais elevadas. Na análise da preservação dos peptídeos por digestão enzimática e espectrometria de massa, houve uma discreta modificação no reconhecimento até a dose de 4 kGy, nas doses subsequentes, o reconhecimento foi mínimo. A análise da atividade enzimática residual por fluorescência demonstrou preservação de 65% da atividade mesmo em doses mais elevadas. Na avaliação antigênica realizada por ELISA e Western Blot, foi possível observar o reconhecimento de anticorpos anti-TeNT frente às toxinas irradiadas nas diferentes doses, com queda gradual conforme o aumento da dose, mas permanecendo com níveis satisfatórios em todas as doses. Nossos dados sugerem que a radiação ionizante promoveu alterações estruturais na toxina tetânica, promovendo fragmentação e/ou agregação com o aumento da dose, porém também foi possível observar que a radiação atenuou a atividade enzimática e que seu reconhecimento antigênico mesmo em doses mais elevadas permaneceu com bons níveis o que indica a possibilidade de um possível uso como imunógeno, contudo, estudos da atividade enzimática sobre doses mais elevadas necessitam serem realizados.

Descritores: Clostridium tetani. Tétano. Toxinas. Radiação Gama. Proteínas - Estrutura

## **ABSTRACT**

Sartori GP. Characterization and evaluation of the tetanic toxin enzymatic activity, exposed to gamma radiation by Cobalt 60 (Dissertation). Sao Paulo: Instituto de Medicina Tropical da Universidade de Sao Paulo; 2019.

Tetanus is an acute disease of high lethality which affects nervous terminals blocking the liberation of inhibitory neurotransmitters. Tetanus toxin (TeNT) is considered one of the most potent microbial toxins and the disease is still a major issue to public health in developing countries. Its prevention is based on immunization. Anti tetanic vaccine is produced by the inactivation of TeNT with formaldehyde, which may cause several side effects. On alternative for this is the use of ionizing radiation to reduce the toxicity and also improving its immunogenic capacity and finally reducing the post vaccination side effects. Therefore, the aim of this study is to characterize the effects of the ionizing radiation in the TeNT structure exposed to different gamma radiation doses by Cobalt 60 and also to assess the residual enzymatic activity. The structural modifications of the toxin after radiation was assessed by SDS PAGE, which revealed a gradual modification on protein profile with loss of the band volume according to doses increase, and the appearance of distinct bands in doses higher than 5kGy. MALDI-TOF analysis showed fragmentation in molecular masses according to doses increase and possible aggregation of the protein fragments in higher doses. In the analysis of the preservation of the peptides by enzymatic digestion and mass spectrophotometry, there was a slight modification of the the recognizing up to 4kGy doses, on the subsequent doses, the recognizing was minimal. The residual enzymatic activity analysis revealed that 65% of protein activity remained even in higher doses. TeNT antigenic evaluation assessed by ELISA and Western Blot revealed the recognizing of anti-TeNT antibodies even in higher doses with gradual decrease as doses increase, however satisfactory levels were observed in all doses. Our findings suggests that ionizing radiation promoted structural modifications in TeNT, such as fragmentation and/or aggregation, however it was possible to observe that the radiation attenuated the enzymatic activity and its antigenic recognition even in higher doses, however still with good levels, which indicates a possible usage as immunogen, yet more studies should be done to assess the enzymatic activity of TeNT in higher doses.

Descriptors: Clostridium tetani. Tetanus. Toxins. Gamma Radiation. Protein - Structure

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Clostridium tetani em sua forma esporulada e vegetativa	20
Figura 2 -	Esporulação do Clostridium tetani	21
Figura 3 -	Esquema demonstrando a estrutura da toxina tetânica	26
Figura 4 -	Estrutura esquemática da toxina tetânica	26
Figura 5 -	Mecanismo de ação da toxina tetânica	30
Figura 6 -	Fusão da vesícula sináptica com a membrana plasmática	31
Figura 7 -	Índice de óbitos por tétano acidental e neonatal e cobertura vacinal no Brasil entre os anos de 1998-2017	36
Figura 8 -	Representação esquemática da radiólise da água	41
Figura 9 -	Análise eletroforética (SDS-PAGE), na ausência de agente redutor, da toxina tetânica nativa e irradiadas	57
Figura 10 -	Análise eletroforética (SDS-PAGE), na presença do agente redutor, da toxina tetânica nativa e irradiadas	58
Figura 11 -	Análise densitométrica das bandas da toxina tetânica nativa e irradiada a diferentes doses por densitometria digital	59
Figura 12 -	Análise densitométrica das bandas da toxina tetânica irradiada a diferentes doses por densitometria digital	60
Figura 13 -	Análise densitométrica das bandas da toxina tetânica irradiada a diferentes doses por densitometria digital	61
Figura 14 -	Análise do volume das bandas da toxina tetânica em seu estado nativo e submetidas à radiação gama <sup>60</sup> Co	62
Figura 15 -	Análise do peso molecular das bandas do perfil das proteínas nativa e irradiadas a doses distintas	63
Figura 16 -	Número de peptídeos da toxina tetânica nativa e irradiada, a diferentes doses, identificados por espectrometria de massa tipo ESI-IT-TOF	64
Figura 17 -	Espectro da toxina tetânica nativa e frações irradiadas a 1 kGy e 2 kGy	66
Figura 18 -	Espectro da toxina tetânica de frações irradiadas a 3 kGy, 4 kGy e 5 kGy	67

Figura 19 -	Espectro da toxina tetânica de frações irradiadas a 6 kGy, 7 kGy e 8 kGy	68
Figura 20 -	Avaliação da antigenicidade, por ensaio imunoenzimático, da toxina tetânica nativa e irradiada a diferentes doses	69
Figura 21 -	Antigenicidade da toxina tetânica nativa e irradiada, a diferentes doses, por anticorpos anti-TeNT	70

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição do gel de poliacrilamida para o gel de empilhamento e de resolução	49
Tabela 2 -	Etapas de centrifugação da toxina tetânica	52
Tabela 3 -	Atividade enzimática residual da toxina tetânica nativa e irradiada a diferentes doses	71

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Manifestações Clínicas do tétano. Classificação de Ablett para	
	a gravidade do tétano	33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**4N** 4 normal

**a.C.** antes de Cristo

Abz orto-aminobenzóico
 aprox. Aproximadamente
 ATP Adenosina Trifosfato
 bpm batimentos por minuto

C. tetani Clostridium tetani

**COBEA** Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

**d.C.** depois de Cristo

**DAB** 3,3'Diaminobenzidina tetrahidrocloreto

**DL50** dose letal 50%

**DNA** Ácido Desoxirribonucleico

**dT** vacina adsorvida difteria e tétano

**dTp** vacina adsorvida difteria, tétano e pertússis.

dTpa vacina adsorvida difteria, tétano e pertússis (acelular adulto)

**DTT** Ditiotreitol

**e-aq** elétron aquoso

EDDnp N-[2, 4-dinitrofenil]-etilenodiaminoEGPA eletroforese em gel de poliacrilamidaELISA Enzime-Linked Immunosorbent Assay

**EROs** espécies reativas de oxigênio

ESI-IT-TOF Electrospray - Ion Trap - Time of Flight

**Fig.** figura

FRET Fluorescence Resonance Energy Transfer

GABA Gamma-AminoButyric Acid

HCC subdomínio carboxi-extremo

**HCN** subdomínio N-proximal

HCR domínio de ligação ao receptor

HCT domínio de translocaçãoHSP90 Heat Shock Protein 90 kDa

IAA Iodoacetamida

IgG Imunoglobulina G

**LC-MS** Espectrometria de Massa por Cromatrografia Líquida

MALDI-TOF Matrix Associated Laser Desorption-Ionization-Time of Flight

MS Mass Spectrometry

OMS Organização Mundial da Saúde

OPD Diamina Ortofenila
ORFs Open Reading Frame

**pb** pares de bases

PBS Phosphate Buffered Saline

**PM** peso molecular

rpm respirações por minutorpm rotações por minuto

SDS Dodecil Sulfato de Sódio

**Snap 25** Synaptosomal nerve-associated protein 25

**SNARE** Soluble N-ethylmaleimide—sensitive factor attachment receptor

TeNT toxina tetânica
TFA Trifluoroacético

**UFLC** Ultra Fast Liquid Chromatrography

VAMP Vesicle-Associated Membrane Protein

VS vesícula sináptica

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	História do tétano	18
1.2	Agente etiológico	19
1.3	Toxina Tetânica	23
1.4	Estrutura da toxina tetânica	25
1.5	Mecanismo de ação da toxina tetânica	27
1.6	Manifestações clínicas	32
1.7	Epidemiologia	34
1.8	Diagnóstico e tratamento	36
1.9	Vacina anti-tetânica	37
1.10	Radiação ionizante como ferramenta de novos imunógenos	39
2	OBJETIVOS	44
3	MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1	Obtenção da vacina dupla para a imunização de camundongos C57BI/6j	45
3.1	Obtenção da vacina dupla para a imunização de camundongos	
	Obtenção da vacina dupla para a imunização de camundongos C57BI/6j	45
3.2	Obtenção da vacina dupla para a imunização de camundongos C57BI/6j	45 45
3.2 3.3	Obtenção da vacina dupla para a imunização de camundongos C57BI/6j  Animais experimentais	45 45 46
3.2 3.3 3.4	Obtenção da vacina dupla para a imunização de camundongos C57BI/6j  Animais experimentais	45 45 46 46
3.2 3.3 3.4 3.5	Obtenção da vacina dupla para a imunização de camundongos C57BI/6j  Animais experimentais	45 45 46 46 47
3.2 3.3 3.4 3.5 3.6	Obtenção da vacina dupla para a imunização de camundongos C57BI/6j	45 46 46 47 47
3.2 3.3 3.4 3.5 3.6 3.7	Obtenção da vacina dupla para a imunização de camundongos C57BI/6j	45 46 46 47 47

3.11	Espectrometria de massas das amostras de toxina tetânica nativa e irradiadas	52
3.12	Análise da antigenicidade por ELISA da toxina tetânica nativa e irradiada a diferentes doses	52
3.13	Análise da reatividade por western blot da toxina tetânica nativa e irradiada a diferentes doses	53
3.14	Atividade enzimática da toxina tetânica nativa e frações irradiadas	54
3.15	Análise estatística	55
4	RESULTADOS	56
4.1	Caracterização do perfil eletroforético por SDS Page da toxina tetânica nativa e irradiada	56
4.2	Identificação dos peptídeos da toxina tetânica por digestão em gel e espectrometria de massa	63
4.3	Análise estrutural das amostras proteicas nativa e irradiada por espectrometria de massa – MALDI-TOF	65
4.4	Avaliação do reconhecimento da toxina tetânica nativa ou irradiada em diferentes doses por anticorpos de camundongos C57Bl/6j imunizados com vacina dupla por ELISA e western blot	69
4.5	Atividade enzimática das alíquotas de toxina tetânica nativa e irradiadas sobre o substrato FRET	70
5	DISCUSSÃO	72
6	CONCLUSÃO	82
REFE	RÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
ANEX	O	100

## 1 Introdução

#### 1.1 Histórico do tétano

A palavra tétano vem do grego teítein, que significa esticar, estirar, distender¹. Já no latim quer dizer rigidez de um membro, contração espasmódica dos músculos do corpo¹. Os seus sintomas foram descritos desde a antiguidade no papiro de Edwin Smith do antigo Egito (aprox. 1600 a.C.), nos escritos de Aristóteles (aproximadamente 400 a.C.) e nos textos ayurvédicos da Índia antiga (400 d.C.)². Hipócrates também descreveu os sintomas da doença³, em que o médico nada poderia fazer para salvar seu paciente⁴.

Umas das primeiras hipóteses de o tétano ser causado por um microrganismo foi sugerida por Pirogov em 1867, mas foram Carte e Rattone que em 1884 descobriram sua etiologia<sup>5</sup>. No mesmo ano, Pirogov mostrou a transmissão da doença em animais inoculados com material humano de lesões cutâneas de pacientes doentes<sup>6</sup>. Ao mesmo tempo, o médico alemão Arthur Nicolaier causou o tétano, injetando amostras de solo contaminado em animais<sup>7</sup>, e concluiu que o agente é um bacilo anaeróbio dificilmente obtido em cultura pura e facilmente encontrado no solo, transmissível aos animais, não invasivo e produtor de um veneno semelhante à estricnina<sup>8</sup>.

Em 1889, foi demonstrado que uma proteína produzida pelo *Clostridium tetani* era responsável por todos os sintomas do tétano e, após isso, foi chamada de toxina tetânica<sup>9</sup>.

Em 1898 Wassermann e Takaki observaram que a toxina fixava em tecidos nervosos, principalmente no tecido cerebral e que causava mais danos do que na medula espinhal<sup>10</sup>. Em 1905, Sherrington descobriu o mecanismo de ação da toxina na medula espinhal e os efeitos deletérios para a coordenação<sup>11</sup>.

Em 1909, Edward Loewenstein investigou a ação do formol sobre a toxina tetânica obtendo um derivado atóxico e sugeriu o seu uso em vacinas<sup>12</sup>, mas só em 1924 a vacina antitetânica passou a ser desenvolvida, quando Gaston Ramon também descreveu a inativação da toxina por formaldeído e, consequentemente, a obtenção do toxóide tetânico<sup>13</sup>. A partir de 1926, Ramon e Christian Zoeller utilizaram a vacina para imunização humana e, na década de 40, deu início à produção em larga escala<sup>14</sup>. Desde então, o maior impacto na prevenção da doença ocorreu na Segunda Guerra Mundial com a vacinação de rotina dos soldados iniciada em 1941, contudo, a vacinação já acontecia esporadicamente desde 1933<sup>5</sup>.

Em 1942, Acheson *et al.*<sup>15</sup> após inocular a toxina por via intramuscular em gatos, descobriram que a toxina tetânica atingia a medula espinhal através dos nervos periféricos. Em 1986 foi determinada a sequência de aminoácidos da toxina tetânica<sup>16</sup> e o mecanismo intracelular de ação da toxina<sup>17,18</sup>.

Após um século das primeiras descobertas sobre o tétano, a toxina tetânica atualmente desperta interesse por causa de suas propriedades biológicas para o uso na farmacologia<sup>19</sup> e em estudos para terapias futuras contra o tétano<sup>20</sup>.

## 1.2 Agente Etiológico

As bactérias do gênero *Clostridium* são definidas como bacilos grampositivos, anaeróbios obrigatórios, formadores de esporos e estão amplamente
distribuídos no mundo e em ambientes diversificados<sup>21</sup>. As espécies não
patogênicas são saprófitas, vivem de forma comensal na flora de animais e
representam 80% das espécies do gênero *Clostridium*<sup>22</sup>. Há patógenos que causam
infecções na mucosa ou em órgãos internos e não são tão graves e nem tão

frequentes como os agentes patogênicos principais. Apenas 13 espécies são consideradas patogênicas para humanos ou animais<sup>22</sup>.

Dentre essas espécies, encontra-se o *Clostridium tetani*, agente causador do tétano<sup>23</sup>, que pertence ao filo Firmicutes<sup>24</sup> classe Clostridia, ordem Clostridiales, e família Clostridiaceae<sup>25</sup>. Produtor da toxina tetânica, é um bacilo gram-positivo anaeróbio obrigatório, não capsulado<sup>26</sup> que possui 4 a 10 µm de comprimento e sua mobilidade é assegurada por 20 a 50 cílios peritríquios<sup>27</sup>. Sua morfologia apresenta uma forma vegetativa e esporulada<sup>28</sup>. Seus esporos em forma de haste são semelhantes a uma baqueta que possuem terminais com alargamentos<sup>29</sup> (Figura 1).



**Figura 1 -** Clostridium tetani em sua forma esporulada (A), semelhante a uma baqueta e em sua forma vegetativa (B), fase responsável pela produção da toxina tetânica<sup>30</sup>.

Na fase de esporulação, um núcleo é formado a partir da fusão de duas unidades nucleares (Figura 2a, 2b e 2c), esse núcleo divide-se em duas hastes pequenas (Figura 2d), uma delas se degenera e a outra permanece com o esporo (Figura 2e, 2f e 2g)<sup>31</sup>. O núcleo permanece em forma de haste até a maturação do esporo quase completo, quando é transformado em um núcleo esférico e excêntrico de esporos (Figura 2h, 2i e 2j)<sup>31</sup>.

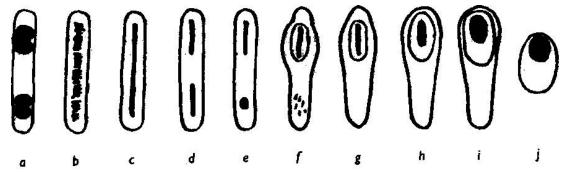


Figura 2 - Esporulação do *Clostridium tetani: a)* Células vegetativas contendo dois pares de bases de cromossomos típicos da morfologia; b) Haste irregular em fragmentos; c) Formação do núcleo de fusão; d) O núcleo de fusão em forma de haste compactada e se dividindo em dois; e,f) Uma haste filha tornando-se um esporo nucleado e a desintegração da outra haste; f, g, h) Núcleo remanescente mantendo a forma de haste até o total preenchimento da unidade nuclear; i, j) Transformação da haste nuclear em um corpo excêntrico e esférico<sup>31</sup>.

É uma bactéria estritamente anaeróbia por não possuir enzimas oxirredutoras, assim, na presença de oxigênio, os radicais se acumulam levando a bactéria à morte<sup>32</sup>. No entanto, os seus esporos são resistentes ao calor e a antissépticos, persistindo nos tecidos durante meses<sup>33</sup> e no meio ambiente durante anos<sup>26</sup> mantendo-se viáveis em diferentes condições adversas, suportando extremos de temperatura e exposição à luz solar direta<sup>34</sup>. A presença de um gene expresso no *C. tetani*, o gene *hem T* que codifica a enzima heme oxigenasse, possivelmente contribui para a resistência da bactéria a tais fatores ambientais, conferindo certa tolerância ao oxigênio<sup>35</sup>. Essa enzima também contribui no processo de colonização da ferida proporcionando um microambiente anóxico para a instalação do microrganismo<sup>35</sup>.

A destruição dos esporos realiza-se por meio de autoclavagem a 120 °C por 15 minutos<sup>36</sup> ou exposição prolongada ao iodo, peróxido de hidrogênio, formalina ou glutaraldeído<sup>37</sup>. No ambiente, o esporo encontra-se não patogênico permanecendo nessas circunstâncias no tecido contaminado até haver condições favoráveis para a mudança em forma vegetativa e patogênica<sup>38</sup>.

Existem diferentes tipos de cepas, dentre elas, as mais utilizadas são a cepa A, uma variante da Harvard, e a cepa E88, sendo esta utilizada para o sequenciamento genômico e produção de vacinas<sup>39</sup>.

Com baixo conteúdo C+G (cerca de 26,8%)<sup>40</sup>, o genoma do *C. tetani* consiste em um cromossomo de 2.799.250 pb e um plasmídeo de 74.082 pb<sup>41</sup>. A toxicidade do *Clostridium tetani* está relacionada a este plasmídeo extra cromossomal, portanto, cepas que não possuem o plasmídeo não são tóxicas<sup>42</sup>.

O *C. tetani* é encontrado em todo o mundo, com maior frequência em regiões de clima quente e úmido, onde o solo é rico em matéria orgânica<sup>43</sup>. Pode ser isolado em fezes de animais domésticos e humanos<sup>44</sup>, e é frequentemente encontrado no trato gastro-intestinal de animais herbívoros e onívoros, no entanto, a formação de toxinas por essa via é rara<sup>45</sup>.

No homem, o *C. tetani* penetra em feridas profundas nos membros, infecções no útero pós-aborto ou pós-parto<sup>46</sup>, queimaduras, circuncisões, injeções intramusculares, acupuntura, piercing, tatuagens, problemas dentários e picadas de serpentes, entretanto em mais de 30% dos casos, a porta de entrada da infecção ainda é desconhecida<sup>47</sup>. Uma hipótese sobre os casos de tétano que não possuem fonte identificável pode ocorrer devido ao bacilo não germinar imediatamente e, algumas vezes, ativar após a cicatrização da ferida<sup>48</sup>. O *C. tetani* não é uma bactéria invasora, a infecção fica localizada na região lesionada e o desenvolvimento do microrganismo é auxiliado pelo tecido necrosado<sup>49</sup>. Após a penetração nos tecidos, o bacilo permanece em estado latente por algumas horas ou dias até ocorrer o processo de oxirredução<sup>50</sup>. Sob condições anaeróbicas, os esporos germinam e inicia a produção da toxina<sup>51</sup>, esta, por sua vez, se liga a terminações nervosas e é conduzida por transporte retrogrado do sistema nervoso periférico ao sistema nervoso central<sup>52</sup> em que interfere nas sinapses impedindo a

liberação de neurotransmissores inibitórios e causando os primeiros sintomas do tétano<sup>53</sup>.

O Clostridium tetani não é uma bactéria frequentemente estudada, até o momento, a maioria das pesquisas realizadas estão direcionadas a ação da toxina tetânica no organismo<sup>54</sup> e ao desenvolvimento de novas vacinas antitetânicas<sup>55</sup>, isso pode ser explicado devido à eficácia da vacinação, em que a doença deixa de ser uma ameaça à saúde pública e também porque o *C. tetani* possui baixa diversidade genética entre as cepas<sup>56</sup>.

## 1.3 Toxina tetânica

Toxinas são substâncias exógenas nocivas aos organismos vivos capazes de interferir em seu funcionamento<sup>57</sup>. Devido sua importância médica, tem se estudado cada vez mais a atividade biológica de diversas toxinas como: toxinas de cianobactérias<sup>58</sup>, escorpiões<sup>59</sup>, aracnídeos<sup>60</sup>, abelhas<sup>61</sup>, serpentes<sup>62</sup> e outras toxinas de origem microbiana<sup>63</sup>.

As toxinas microbianas podem ser endotoxinas, provenientes da parede celular, ou exotoxinas, que são proteínas secretadas ao meio extracelular<sup>64</sup>. Muitas destas toxinas são proteínas codificadas por genes cromossômicos ou plasmídeos que tem como característica danificar a membrana de células eucarióticas através da associação com receptores específicos na membrana de superfície<sup>65</sup>. As endotoxinas são lipopolissacarídeos produzidos por bactérias gram positivas como *Pseudomonas aeruginosa*<sup>66</sup>. Já as exotoxinas, como as da difteria e tétano, são produzidas internamente pelas bactérias, provocam doenças específicas, atingem vários tipos de células e tecidos e podem causar necrose tecidual e até óbito<sup>67</sup>. Dentre as toxinas conhecidas, a toxina responsável pelo tétano é considerada uma das mais potentes toxinas microbianas até o momento<sup>68</sup>.

Em condições anaeróbias encontradas em tecidos necrosados e infectados, o bacilo do tétano secreta duas toxinas: a tetanolisina e a tetanospasmina (toxina tetânica)<sup>69</sup>. A tetanolisina é uma hemolisina de 48 kDa que tem seu mecanismo de ação baseado na lise celular através da formação de poros por hidrólise de fosfolipídios de membrana<sup>70</sup>. O tecido sadio ao redor da ferida então é danificado e essa lesão contribui para a diminuição de oxigênio do local<sup>71</sup>. Devido à oxidorredução na região, as condições para a multiplicação bacteriana são otimizadas, o que promove maior crescimento de microrganismos anaeróbicos<sup>72</sup>.

Já a tetanospasmina, ou toxina tetânica, é liberada por autólise bacteriana que infiltra nos fluídos corporais até alcançar os terminais nervosos<sup>44</sup> e impede a exocitose de neurotransmissores<sup>73</sup> o que causa a síndrome do tétano e sua sintomatologia<sup>74</sup>.

A toxina tetânica (TeNT) é codificada pelo plasmídeo pCL1 constituído de 74.082 pb contendo 61 ORFs que abriga os genes para a toxina (*Tet* X) e seu regulador de transcrição direto *Tet* R<sup>75</sup>.

A TeNT está entre as substâncias mais potentes já descritas e é a principal causa de morte neonatal em áreas não vacinadas<sup>20</sup>. A sensibilidade à toxina tetânica varia em diferentes espécies, a dose letal 50% (DL50) em camundongos está entre 0,1 a 1ng toxina/Kg de peso corporal, os humanos e cavalos são tão sensíveis quanto os camundongos, enquanto pássaros, cobras e anfíbios são mais resistentes e as tartarugas são insensíveis<sup>32</sup>. No entanto, a toxina tetânica é destruída pelo suco gástrico, são termorresistentes e raramente são absorvidos pela mucosa<sup>76</sup>.

#### 1.4 Estrutura

A toxina tetânica é classificada como toxina AB porque tem duas partes componentes<sup>77</sup>. O componente A é composto por uma região catalítica que atua nos alvos intracelulares e o componente B, que se liga aos receptores extracelulares<sup>77</sup>.

Com maior concentração de Isoleucina (10,19%) e menor índice de Císteína (0,76%) (Figura 3A), a estrutura da toxina tetânica é formada por 1315 resíduos de aminoácidos (Figura 3B) constituindo um polipeptídio de 150 kDa constituído por duas cadeias: uma cadeia leve (*light chain*) de 50 kDa e uma cadeia pesada (*heavy chain*) de 100 kDa unidas por uma ligação dissulfeto<sup>78</sup> (Figura 4).

Α	F	requência dos ami	noácido	S	
Aminoácido	(%)	Aminoácido	(%)	Aminoácido	(%)
Cisteína	0,76	Prolina	4,03	Ácido aspártico	6,69
Triptofano	0,99	Fenilalanina	4,26	Serina	7,53
Histidina	1,07	Glicina	4,79	Lisina	8,14
Metionina	1,90	Valina	4,79	Leucina	8,67
Arginina	2,89	Ácido glutâmico	5,32	Asparagina	9,20
Glutamina	3,27	Treonina	5,55	Isoleucina	10,19
Alanina	3,95	Tirosina	6,01		

MPITINNFRYSDPVNNDTIIMMEPPYCKGLDIYYKAFKITDRIWIVPERYEFGTKPEDFN PPSSLIEGASEYYDPNYLRTDSDKDRFLQTMVKLFNRIKNNVAGEALLDKIINAIPYLGN SYSLLDKFDTNSNSVSFNLLEQDPSGATTKSAMLTNLIIFGPGPVLNKNEVRGIVLRVDN KNYFPCRDGFGSIMQMAFCPEYVPTFDNVIENITSLTIGKSKYFQDPALLLMHELIHVLH GLYGMQVSSHEIIPSKQEIYMQHTYPISAEELFTFGGQDANLISIDIKNDLYEKTLNDYK AIANKLSQVTSCNDPNIDIDSYKQIYQQKYQFDKDSNGQYIVNEDKFQILYNSIMYGFTE IELGKKFNIKTRLSYFSMNHDPVKIPNLLDDTIYNDTEGFNIESKDLKSEYKGQNMRVNT NAFRNVDGSGLVSKLIGLCKKIIPPTNIRENLYNRTASLTDLGGELCIKIKNEDLTFIAE KNSFSEEPFQDEIVSYNTKNKPLNFNYSLDKIIVDYNLQSKITLPNDRTTPVTKGIPYAP EYKSNAASTIEIHNIDDNTIYQYLYAQKSPTTLQRITMTNSVDDALINSTKIYSYFPSVI SKVNQGAQGILFLQWVRDIIDDFTNESSQKTTIDKISDVSTIVPYIGPALNIVKQGYEGN FIGALETTGVVLLLEYIPEITLPVIAALSIAESSTQKEKIIKTIDNFLEKRYEKWIEVYK LVKAKWLGTVNTOFQKRSYOMYRSLEYQVDAIKKIIDYEYKIYSGPDKEQIADEINNLKN KLEEKANKAMININIFMRESSRSFLVNOMINEAKKOLLEFDTOSKNILMOYIKANSKFIG ITELKKLESKINKVFSTPIPFSYSKNLDCWVDNEEDIDVILKKSTILNLDINNDIISDIS GFNSSVITYPDAQLVPGINGKAIHLVNNESSEVIVHKAMDIEYNDMFNNFTVSFWLRVPK VSASHLEOYGTNEYSIISSMKKHSLSIGSGWSVSLKGNNLIWTLKDSAGEVROITFRDLP DKFNAYLANKWVFITITNDRLSSANLYINGVLMGSAEITGLGAIREDNNITLKLDRCNNN continua

#### continuação

NQYVSIDKFRIFCKALNPKEIEKLYTSYLSITFLRDFWGNPLRYDTEYYLIPVASSSKDV QLKNITDYMYLTNAPSYTNGKLNIYYRRLYNGLKFIIKRYTPNNEIDSFVKSGDFIKLYV SYNNNEHIVGYPKDGNAFNNLDRILRVGYNAPGIPLYKKMEAVKLRDLKTYSVQLKLYDD KNASLGLVGTHNGQIGNDPNRDILIASNWYFNHLKDKILGCDWYFVPTDEGWTND

**Figura 3** - Composição de aminoácidos da toxina tetânica: A) Frequência (%) dos aminoácidos<sup>79</sup>; B) Sequência dos 1315 aminoácidos responsáveis pela estrutura molecular<sup>80</sup>.

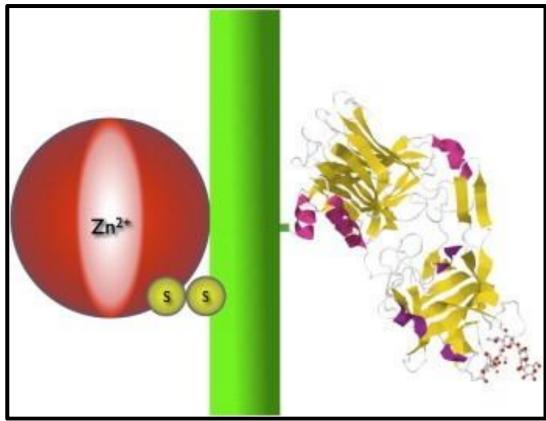


Figura 4 - Esquema demosntrando a estrutura da toxina tetânica. A cadeia leve N-terminal de 50 kDa com o átomo de zinco no centro do sítio ativo (vermelho). Ligação dissufeto entre as duas cadeias (S). Cadeia pesada (100 kDa): N-terminal (25 kDa): responsável pela translocação da cadeia leve pela membrana do neurônio (verde). Domínio C-terminal: Constituído de dois subdomínios iguais de 25 kDa que abriga dois sítios de ligação aos glangliosídeos<sup>78</sup>.

A cadeia leve é uma peptidase dependente de zinco que cliva as proteínas SNAREs específicas de neurônios e a cadeia pesada é responsável pela entrada da toxina ao meio intracelular<sup>81</sup>. Os resíduos 233 a 237 na cadeia leve constitui o motivo de ligação His-Glu-XX-His Zn<sup>2+82</sup>, parte N-terminal do sítio ativo que se dobra em torno do átomo de zinco<sup>78</sup>. Os resíduos coordenados com o zinco formam

uma esfera primária ao redor do sítio ativo, o que contribui para o seu papel direto na catálise<sup>83</sup>.

A cadeia pesada é formada por dois domínios, um domínio de translocação de 50 kDa (HCT) situada na região N-terminal, que é responsável pela internalização e transporte da toxina pelo neurônio e um domínio de ligação ao receptor (HCR) de 50 kDa localizado na região C-terminal, que realiza uma dupla ligação aos gangliosídeos de membrana<sup>84</sup>.

O domínio C-terminal da cadeia pesada é denominado fragmento C e está dividido em dois subdomínios de 25 kDa respectivamente: o subdomínio N-proximal (HCN) e o subdomínio carboxi-extremo (HCC)<sup>85</sup>. No subdomínio HCC, encontra-se a estrutura cristalina, que abriga os sítios de ligação ao gagliosídeos<sup>86</sup>. Os gangliosídeos são receptores duplos funcionais para a toxina tetânica, o que significa ter alta afinidade pelos dois sítios de ligação do fragmento C<sup>87</sup>. Os gangliosídeos são um tipo de glicoesfingolipídeo de membrana plasmática de natureza ácida, é composta por resíduos de ácido siálico e servem como receptores para a sinalização entre células e o meio extracelular<sup>88</sup>. Embora os gangliosideos estejam presentes em todos os tecidos, eles são mais abundantes na membrana de células nervosas<sup>89</sup>.

## 1.5 Mecanismo de ação da toxina tetânica

O mecanismo de ação inicia-se a partir da entrada da toxina tetânica na circulação logo após a autólise bacteriana, esta, por sua vez se espalha até que se ligue na membrana pré-sináptica do neurônio motor na junção neuromuscular<sup>90</sup> por alta afinidade da cadeia pesada carboxi-terminal com o gangliosídeo Gt1b<sup>91</sup>. Essa interação, ao que tudo indica, promove a partição da bicamada ligando o HCT na membrana de uma forma que contribui para a formação de um canal para a

translocação da cadeia leve<sup>92</sup>. Uma vez que a TeNT está ligada a superfície, acontece uma complexa cascata de eventos envolvendo proteínas e lipídios que recruta outras proteínas reguladoras e clatrinas, esse recrutamento leva ao acúmulo de proteínas efetoras, alterando a curvatura da membrana nos locais endocíticos tendo como resultado a internalização do TeNT juntamente com receptores de neurotrofinas e seus ligantes em um endossomo<sup>93</sup>. Sua internalização ocorre por endocitose através de um mecanismo dependente de clatrina e Rab 5 que é seguido por transporte axonal retrógrado em direção ao sistema nervoso central<sup>94</sup> dentro do lúmen de endossomos neutros<sup>95</sup>. Após o transporte, o TeNT deixa o neurônio primário de captação (neurônio motor) e é exposto ao meio extracelular em que se liga em outro neurônio (neurônio inibitório) onde é internalizada<sup>96</sup> (Figura 5).

A informação sobre o mecanismo de captação da neurotoxina por vesículas endocíticas nos neurônios sinápticos ainda é escassa, no entanto, sugere-se que a internalização da toxina é realizada por vesícula sináptica (VS)<sup>97</sup>. Depois da endocitose, o lúmen da vesícula sináptica é acidificado pela ação do bombeamento de prótons por V-ATPases presentes na membrana da VS, esta ação reduz o pH luminal para um valor em torno de 5,8<sup>97</sup>. As V-ATPases são sistemas enzimáticos que funcionam exclusivamente como bombas de prótons dependentes de ATP, realizando diversas funções biológicas dentro das células, nas vesículas sinápticas, as V-ATPases contribuem para o acúmulo de neurotransmissores<sup>98</sup>.

Devido a essa nova condição no interior da vesícula sináptica, a acidificação do lúmen estimula a mudança conformacional da toxina, o que leva a inserção da HCT na membrana e a formação de um canal condutor de proteínas<sup>99</sup> e desdobramento da cadeia leve, e translocação para o citossol,<sup>84</sup>. Uma vez entregue ao lado citosólico, a cadeia leve redobra no pH neutro e se desprende após a redução da ligação dissulfeto<sup>100</sup>. O renovelamento da cadeia leve é mediado pelas

proteínas (chaperona citosólica) Hsp90 enquanto o sistema tiorredoxinatiorredoxina redutase (Trx-TrxR) reduz a ligação dissulfeto intercadeias<sup>101</sup>. A
importância de uma temperatura padrão também foi sugerida como um fator
importante para a translocação da toxina, em que a 37 °C houve maior eficiência da
translocação, o que pode explicar a baixa toxicidade em animais de sangue frio<sup>102</sup>.
No citossol, a cadeia leve hidrolisa a sinaptobrevina II na região entre a glutamina
76 e fenilalanina 77 inibindo a liberação de neurotransmissores<sup>80</sup> (Figura 5).

A sinaptobrevina II, também conhecida como VAMP (Vesicle-Associated Membrane Protein) está localizada na vesícula sináptica<sup>103</sup>. As VAMPs são membros da superfamília SNARE juntamente com as proteínas sintaxina e snap 25<sup>104</sup>.

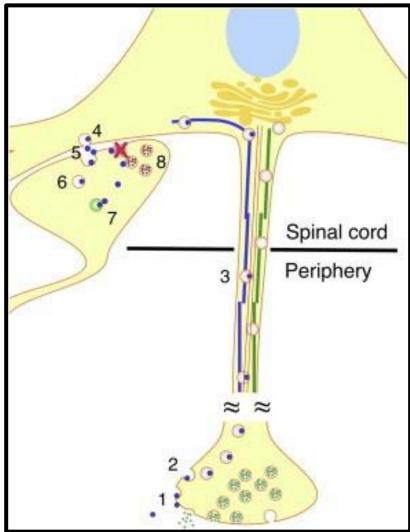
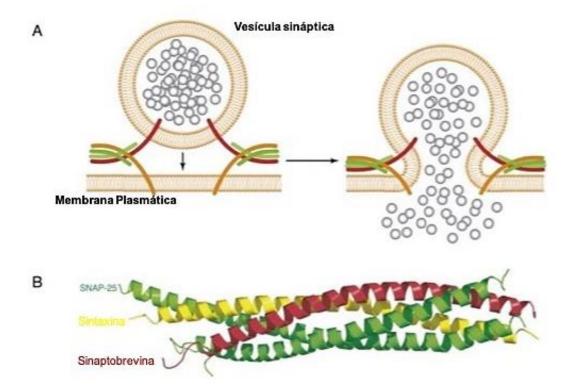


Figura 5 - Mecanismo de ação da toxina tetânica: 1) Ligação da toxina tetânica ao Glangliosídeo Gt1b; 2) Internalização e endocitose; 3) Transporte axonal retrógrado em direção ao sistema servoso central; 4) Liberação da neurotoxina no espaço intersináptico; 5) Internalização da toxina no neurônio inibitório; 6) Endocitose em vesículas de pH ácido; 7) Clivagem da ponte dissufeto e liberação da cadeia leve no citossol; 8) Clivagem da sinaptobrevina II<sup>78</sup>.

Nas sinapses do sistema nervoso central, a sinaptobrevina II, uma proteína SNARE vesicular importante, forma um complexo SNARE ternário com as proteínas SNARE da membrana plasmática, sintaxina 1 e SNAP25 que contribui para que a vesícula sináptica libere seu conteúdo no espaço extracelular (Figura 6A)<sup>105</sup>. A exocitose é um processo que envolve a fusão entre a vesícula e membrana plasmática, formando um canal através do qual as secreções são liberadas da

vesícula para o exterior da célula<sup>106</sup>. Neste processo, ocorre o emparelhamento entre a sinaptobrevina I ou II e a sintaxina (SNAP-25) formando o complexo SNARE (Figura 6B)<sup>107</sup>. Esse complexo é desencadeado pelo influxo de Ca<sup>2+108</sup> que promove a liberação mais rápida de neurotransmissores<sup>109</sup>. A cadeia leve da toxina tetânica ao clivar a sinaptobrevina II, bloqueia a liberação de neurotransmissores inibitórios, GABA e glicina no sistema nervoso central<sup>110</sup>. Essa ação causa um efeito de hiperatividade que leva à contração involuntária dos músculos esqueléticos<sup>111</sup> causando os primeiros sintomas do tétano<sup>112</sup>.



**Figura 6** - Fusão da vesícula sinápica com a membrana plasmática: A) A fusão da VS é conduzida pelo complexo SNARE constituído de três proteínas: sinaptobrevina, sintaxina e SNAP-25. Após a formação do complexo SNARE, os neurotransmissores são liberados; B) Estrutura do complexo SNARE composta por dois motivos de SNAP-25 e um motivo de sinaptobrevina e sintaxina<sup>113</sup>.

## 1.6 Manifestações clínicas

O tétano é uma doença aguda e geralmente fatal<sup>111</sup> causada pela produção de toxinas extracelulares<sup>22</sup>. A infecção geralmente manifesta-se entre 1 e 7 dias e os sintomas clássicos da doença são: trismo (tétano), espasmos, dor, rigidez, disfagia, ou disfunção autonômica<sup>114</sup>. A evolução do quadro infeccioso pode obstruir a laringe e reduzir a complacência da parede torácica causando insuficiência respiratória, sendo esta a causa mais comum de morte por tétano<sup>115</sup>.

Clinicamente, o tétano é divido em generalizado, local, cefálico e neonatal<sup>116</sup>. Nos casos de tétano generalizado, a toxina atinge o sistema circulatório e linfático, disseminando-se para outros terminais nervosos, os nervos mais curtos são os primeiros a serem afetados, o que permite explicar o acometimento sequencial da cabeça, tronco e por último, as extremidades<sup>26</sup>. O tétano generalizado é a forma mais comum da doença, atingindo cerca de 80% dos casos<sup>117</sup>. O tétano localizado consiste em espasmos musculares próximos ao local da lesão, apesar desse perfil ocorrer apenas em pessoas com imunidade parcial, é possível progredir para o tétano generalizado<sup>118</sup>. O tétano cefálico é determinado por sintomas do trismo e paralisia de um ou mais nervos cranianos<sup>119</sup> e por espasmos laríngeos frequentes com risco de morte por asfixia<sup>120</sup>. O tétano localizado, especialmente o componente cefálico, é extremamente raro<sup>120</sup>. Outros sintomas além das características musculares como febre sudorese, hipertensão e frequência cardíaca evelada podem aparecer, segundo a classificação de Ablett para a gravidade do tétano, a doença pode evoluir conforme quadro 1:<sup>121</sup>.

Grau	Manifestações Clínicas		
I (Leve)	Trismo leve, espasticidade, sem problemas respiratórios, sem disfagia.		
II (Moderado)	Trismo moderado, espasmos curtos, disfagia leve, frequência respiratória (rpm)> 30, disfagia leve.		
III (Severo)	Trismo grave, espasticidade generalizada, espasmos prolongados, frequência respiratória (rpm)> 40, disfagia grave, pulso (bpm)> 120.		
IV (Muito severo)	Grau III mais disfunção autonômica severa do sistema cardiovascular.		

**Quadro 1** - Manifestações Clínicas do tétano. Classificação de Ablett para a gravidade do tétano.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a determinação do tétano não neonatal baseia se em pelo menos um dos sinais clínicos: riso sardônico ou demais contrações musculares dolorosas. Embora essa definição necessite histórico de ferimento, o tétano também pode ocorrer em pacientes que não se lembram de feridas ou lesão específica<sup>122</sup>.

Já no tétano neonatal, o quadro clínico inicia-se entre 3 a 14 dias após o nascimento<sup>37</sup> e a principal porta de entrada para infecção é a contaminação do coto umbilical por esporos no momento do parto ou nos primeiros dias de vida<sup>123</sup>. O tétano neonatal resulta da contaminação do tronco do cordão umbilical em ou após a concepção de uma criança nascida de uma mãe que não possuía antitoxina circulatória suficiente para proteger a criança passivamente pela transferência transplacentária<sup>124</sup>. O diagnóstico por tétano neonatal é confirmado pela dificuldade de sucção, rigidez e espasmos entre três a 28 dias de vida<sup>125</sup>. É considerada uma infecção de alta mortalidade em países subdesenvolvidos<sup>126</sup>. Embora tenha havido diminuição do tétano neonatal, a doença ainda está presente com alta incidência em 18 países (Afeganistão, Angola, República Centro Africana, Chade, República Democrática do Congo, Etiópia, Guiné, Haiti, Quênia, Mali, Nigéria, Paquistão,

Papua Nova Guiné, Filipinas, Somália, Sudão, Sudão do Sul e lêmen), o que demosntra a necessidade da implantação de programas de governos vinculados a boas práticas de higienização nos partos e imunização<sup>127</sup>.

## 1.7 Epidemiologia

Determinar a verdadeira epidemiologia do tétano se torna difícil, uma vez que a maioria dos casos ocorre em países de baixa e média renda onde os sistemas de vigilância são limitados<sup>128</sup>. No entanto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) relata melhora nas taxas de mortalidade por tétano, associadas a campanhas agressivas de vacinação nos últimos anos<sup>43</sup>, e às medidas profiláticas junto com o crescimento sócio econômico cultural e não pela erradicação do bacilo do solo e nem na descontinuação na cadeia de transmissão da doença<sup>129</sup>.

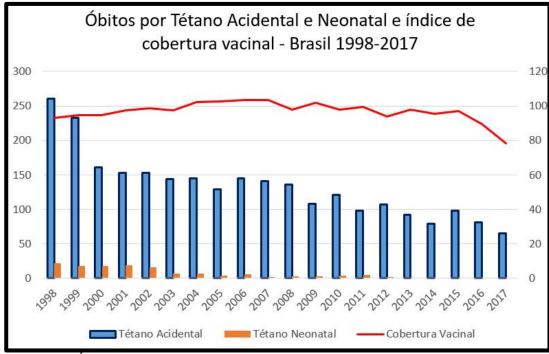
Em países desenvolvidos, o tétano é raro, mas continua a acontecer<sup>130</sup>, e a maior parte dos casos notificados está presente entre os indivíduos idosos<sup>131</sup>. No Japão, cerca de 100 pacientes são infectados com tétano anualmente<sup>132</sup>. Na Inglaterra, devido ao sucesso de imunização infantil, o tétano é considerado raro e todas as mortes associadas à doença, ocorreram em adultos acima e 45 anos e idosos não imunizados ou parcialmente imunizados<sup>133</sup>.

Em países subdesenvolvidos, o tétano ainda é um grave problema de saúde pública, apesar de estar bem documentado desde a antiguidade<sup>134</sup>, é responsável por cerca de 500.000 óbitos/ano<sup>131</sup>. Na África, ainda há uma elevada taxa de mortalidade por tétano e esse índice não mudou significamente em comparação aos valores de meio século atrás<sup>135</sup>. Nos anos 90, oitenta por cento destas mortes ocorreram na África e sudeste da Ásia permanecendo endêmicas na época em 90 países no mundo inteiro<sup>136</sup>. Em 1997, o tétano neonatal foi considerado uma das principais causas de mortalidade infantil nos países em desenvolvimento, chegando

a 277.376 mortes de neonatos por ano, o que corresponde a 2,1 mortes por 1000 nascidos vivos e em 2008, mesmo já com os programas de vacinação, o tétano neonatal foi responsável por 1% das mortes ocorridas no mundo<sup>137</sup>. Na Nigéria, as taxas de incidência e mortalidade do tétano neonatal ainda permanecem superestimadas, entre os anos de 2010 a 2014, pesquisas recentes mostram que foram registrados em sete estabelecimentos de saúde selecionados no estado de Katsina, 336 mortes por tétano neonatal, 3,4 mortes por 100 000 habitantes, respectivamente<sup>138</sup>. As infecções por tétano após desastres naturais são comuns, a maioria dos surtos, no entanto, ocorrem em locais com baixa cobertura vacinal, após o terremoto do Haiti, houve um aumento da doença em comparação com a sua incidência basal<sup>121</sup>. A mortalidade por tétano após desastres naturais graves variou de 19% a 31%<sup>121</sup>.

No Brasil, em consequência da negligência das revacinações, o tétano ainda tem altas taxas de mortalidade, dentre os casos notificados, 32% foram a óbito<sup>139</sup>. Entretanto, o tétano persiste principalmente em idosos devido à queda linear dos níveis séricos da antitoxina tetânica, à imunossenescência com prejuízo da atividade T-*helper*, e à negligência nas doses de reforço da vacina<sup>129</sup>. Dados publicados pelo Ministério da Saúde mostram que o número de casos de tétano no país caiu 66,09% desde o início dos anos 2000. Enquanto em 2001 o País registrou um total de 578 casos, em 2011 foram 196<sup>140</sup>. A redução foi ainda maior nos casos de tétano neonatal, chegando a 85% neste período. Entre os anos de 1998 á 2017 houve redução de 75% das mortes por tétano acidental<sup>141,142</sup> e redução de 100% no tétano neonatal, não havendo ocorrência registrada desde 2013<sup>143</sup> (Figura 7). No entanto, a região norte apresenta alta incidência de tétano neonatal, entre os anos de 2007 a 2017 ocorreram 35 casos, destes 15 casos só na região norte<sup>144</sup>. Em 2013, mesmo com o aumento e priorização de medidas de controle na região norte, a meta da OMS ainda não foi alcançada nestas áreas<sup>144</sup>. Além da vacina, o parto

limpo, cuidados higiênicos e adequados com o coto umbilical são fundamentais para o controle da infecção<sup>144</sup>.



**Figura 7** - Índice de óbitos por tétano acidental e neonatal e cobertura vacinal no Brasil entre os anos de 1998-2017<sup>143</sup>.

## 1.8 Diagnóstico e tratamento

O tétano é diagnosticado pelo histórico do paciente e sinais clínicos<sup>145</sup>, uma vez que não há exames laboratoriais confirmatórios<sup>146</sup>. O primeiro sinal de tétano é o espasmo, também podem estar incluídos inicialmente sintomas envolvendo o músculo da mandíbula, pescoço, costas, tórax e rigidez abdominal<sup>147</sup>. A hipertonia torácica, contração e crises espásticas contribuem para insuficiência respiratória, causa frequente de morte por tétano<sup>148</sup>. Após o diagnóstico ser efetivado, o tratamento é iniciado seguindo os seguintes objetivos: i) cuidados de suporte; ii) neutralização da toxina circulante e iii) erradicação do microrganismo produtor da toxina<sup>116</sup>.

Para o cuidado de suporte, pode ser aplicado intubação endotraqueal, ventilação mecânica, sedação profunda e miniminar a estimulação ambiental com o intuito de evitar espasmos<sup>149</sup>. Os sedativos utilizados variam de benzodiazepínicos, como midazolam e diazepam, a agentes anestésicos como o propofol e são terapias padrão para o controle de espasmos musculares e convulsões provocadas pela doença<sup>150</sup>. O sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) também é utilizado como terapia no controle dos espasmos e rigidez muscular, mas não é eficaz quando o tétano progride para uma forma mais severa<sup>151</sup>.

A neutralização da toxina tetânica é realizada pela administração de imunoglobulinas humanas por via intramuscular<sup>152</sup> de doadores ou antitoxinas contendo anticorpos policlonais de animais<sup>153</sup>. Recomenda-se o uso imediato das imunoglobulinas a partir do diagnóstico estabelecido, já que as mesmas só podem neutralizar a toxina circulante e não são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica<sup>154</sup>.

Para a eliminação do *Clostridum tetani* é utilizado antibióticos com cobertura para anaeróbios<sup>155</sup>. A penicilina era considerada a terapia padrão, contudo, hoje se usa o metronidazol com alternativa a penicilina sendo considerado como primeira linha de tratamento seguro<sup>156</sup>. Tetraciclina, macrolídeos, clindamicina, cefalosporina e cloranfenicol também são utilizados no tratamento do tétano<sup>156</sup>.

#### 1.9 Vacina

Atualmente, a melhor forma de prevenção do tétano é por meio da vacinação<sup>157</sup>. A toxina tetânica é utilizada para a produção de vacinas contra o tétano através de sua destoxicação por formaldeído, em que muda sua estrutura sem destruir os sítios antigênicos das proteínas, mantendo a capacidade de induzir produção de anticorpos<sup>158</sup>.

Os objetivos da vacina antitetânica segundo a Organização Mundial da Saúde são: garantir proteção integral contra o tétano e eliminar mundialmente o tétano materno e neonatal e garantir uma cobertura de seis doses, três doses iniciais e três doses de reforço através de esquemas de vacinação<sup>159</sup>. No Brasil, o Ministério da Saúde indica a administração de três doses nos primeiros 12 meses de vida, com reforço aos 15 meses, quatro e seis anos<sup>160</sup>. Após a última dose na infância, os reforços ocorrem a cada dez anos, cobrindo a adolescência, adultos e idosos<sup>161</sup>. Para a prevenção do tétano neonatal, gestantes com imunizações administradas a mais de cinco anos, devem atencipar o reforço<sup>160</sup>. O toxóide tetânico está presente nas seguintes vacinas:

**Pentavalente:** Foi introduzida no calendário básico de vacinação no Brasil a partir de 2012 e é composta pelos toxóides diftérico e tetânico, pertússis, hepatite B (recombinante) e *Haemophilus influenzae* tipo b (conjugada). A vacina pentavalente é aplicada aos 2, 4 e 6 meses de idade<sup>162</sup>.

**Tríplice bacteriana (dTp):** O esquema de vacinação para a tríplice bacteriana é a administração do primeiro reforço aos 15 meses de idade e o segundo aos quatro anos de idade<sup>163</sup>. É uma vacina adsorvida que protege contra difteria, tétano e pertussis<sup>164</sup>.

Vacina Dupla: A vacina adsorvida difteria e tétano adulto (dT) é indicada para adultos e crianças a partir dos 7 anos de idade<sup>165</sup> e nos reforços a cada 10 anos<sup>166</sup>.

**Tríplice Acelular:** A partir de novembro de 2014, a Organização Mundial da Saúde recomendou substituir a vacina dupla bacteriana (dT) pela tríplice acelular (dTpa)<sup>167</sup> para gestantes de 27 a 36 semanas de gestação por oferecer proteção indireta aos recém nascidos devido a elevada taxa de casos de coqueluche nessa faixa etária<sup>168</sup>.

Para a produção da vacina, o toxóide tetânico é adsorvido a um sal de alumínio coloidal para induzir uma resposta imune mais eficaz<sup>169</sup>. No Brasil a vacina antitetânica adulta (dT) além do uso com o hidróxido de alumínio, contém timerosal como estabilizador e contém menor concentração de toxóide diftérico quando comparada com a vacina dTp infantil<sup>170</sup>. Esses estabilizadores e adjuvantes contribuem para reações adversas pós vacinais como alergias e até doenças autoimunes sendo mais comuns reações inflamatórias locais<sup>171</sup>.

Embora as vacinas sejam altamente eficazes e um dos avanços médicos mais bem sucedidos<sup>172</sup>, por mais de um século, a produção de vacinas seguiu os protocolos de Pasteur em isolar, inativar e injetar microrganismos patogênicos como forma de imunização<sup>173</sup>. Em relação à toxina tetânica, o processo de destoxificação ocorre desde os anos 20<sup>13</sup> e permanece neste processo até os dias atuais<sup>174</sup>. Entretanto, novas tecnologias para a produção de vacinas vêm sendo desenvolvidas, como o exemplo de vacinas glicoconjugadas<sup>175</sup>, tecnologia do DNA recombinante, vacinologia reversa e vacinologia estrutural<sup>176</sup> e o uso da radiação ionizante para destoxicação de venenos para possíveis candidatos vacinais<sup>177</sup> e a inativação de microrganismos para o uso em vacinas<sup>178</sup>.

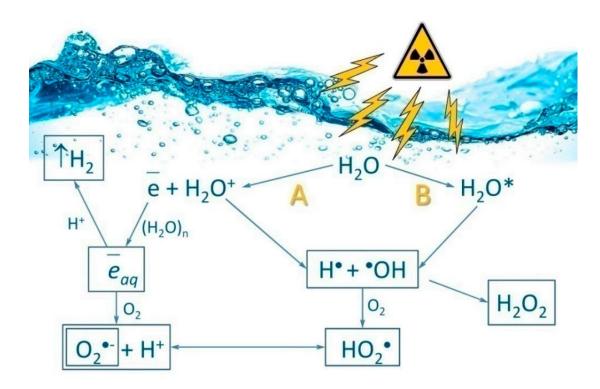
#### 1.10 Radiação Ionizante como ferramenta de novos imunógenos

A radiação ionizante consiste em ondas eletromagnéticas formadas a partir de transições nucleares, de alta energia, bem como a capacidade de promover ionização e excitação nos meios produzindo alto poder de penetração<sup>179</sup>. A ionização promovida pela radiação pode ser determinada como a transformação de átomos e moléculas neutras em íons e radicais<sup>180</sup>.

A ação da radiação ionizante atua por mecanismos diretos e indiretos<sup>181</sup>. A ação direta é capaz de causar danos moleculares<sup>182</sup> em que a radiação interage

diretamente com as biomoléculas podendo causar desde mutação genética até morte celular<sup>183</sup>. A ação indireta age através da interação da radiação com a água, formando espécies reativas de oxigênio (EROs) como os radicais superóxido (O<sub>2</sub>·), peroxila (HO<sub>2</sub>•), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), radical hidroxila (HO•) e oxigênio singlete (O<sub>2</sub>) (Figura 8). As EROs são moléculas instáveis e reativas que modificam moléculas alvos nas quais interagem<sup>184</sup>. A partir da radiólise, também são produzidos elétron aquoso (e-aq) e átomos de hidrogênio (H•)<sup>185</sup>. No entanto, o número de radicais livres gerados<sup>181</sup> e os efeitos causados, dependerão da dose de radiação e da natureza do material com a qual está interagindo<sup>186</sup>. A radiólise da água é determinada por dissociar moléculas pela radiação, o que resulta na quebra das ligações químicas por consequência da exposição a um fluxo de alta energia<sup>187</sup> formando subprodutos altamente reativos que podem danificar ácidos nucleicos, lipídios e proteínas<sup>188</sup>.

No que se diz respeito às proteínas, em solução aquosa a radiação ionizante pode provocar alterações na sua constituição e nas propriedades físico-químicas desde simples ionizações até grandes modificações na sua estrutura primária, conferindo cargas negativas devido a alterações oxidativas decorrente a interação dos radicais livres com a molécula de proteína<sup>189</sup>. Em geral, os efeitos da irradiação na conformação da proteína como quebra de ligações covalentes de cadeias polipeptídicas dependem da sua concentração, presença de oxigênio e a estrutura quaternária no que resulta em fragmentação aleatória e não aleatória<sup>190</sup>. As alterações causadas nas proteínas são: fragmentação, agregação, "cross linking" e oxidação pelos produtos gerados na radiólise da água<sup>191</sup>.



**Figura 8** - Representação esquemática da radiólise da água: (A) Ionização e (B) Excitação que produzem espécies reativas de oxigênio O<sub>2</sub>-, HO<sub>2</sub>•, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HO•, O<sub>2</sub>-, H• e e<sub>aq</sub>-192.

A tecnologia de radiação pode ser aplicada em escala industrial<sup>193</sup>. Devido ao conhecimento das propriedades da radiação ionizante, o seu uso tem contribuído para contínuos avanços científicos e tecnológicos<sup>180</sup>. No Brasil, o uso da radiação ionizante nas áreas de medicina, indústria, segurança, construção civil, engenharia e pesquisa vêm crescendo consideravelmente ao longo dos anos<sup>180</sup>.

Na preservação de alimentos, a radiação ionizante contribui para a redução de produtos químicos conservantes<sup>194</sup>. A decomposição radiolítica de fármacos presentes em ambientes aquáticos naturais e resíduos hospitalares por meio da radiólise da água têm mostrado resultados efetivos<sup>195</sup>. Na medicina, a radiação tem sido utilizada em radioterapia para o tratamento de câncer<sup>196</sup>, em hemocentros na esterilização de bolsas de concentrados de hemácias e seus derivados a fim de diminuir reações transfusionais por parte do paciente<sup>197</sup>.

A radiação também tem sido empregada no desenvolvimento de vacinas devido a grande procura para o aperfeiçoamento de novas estratégias de produção que proporcione maior eficiência, rapidez e segurança<sup>198</sup>. Em vacinas com microrganismos atenuados, a radiação se mostrou como uma técnica eficiente na inativação de fungos (*Paracoccidioides brasiliensis*)<sup>199</sup> e parasitas<sup>200</sup>. Em bactérias, a radiação proporcionou uma imunização sem acréscimo de adjuvante e uma proteção eficaz para Streptococus pneumoniae independente do sorotipo<sup>201</sup>. Vírus irradiados a 50 kGy também demosntraram ser canditados vacinais em potencial<sup>202</sup>. em especial o vírus da Influenza A, que demonstrou proteção contra cepas de vírus sazonais e pandêmicos<sup>203</sup>. Atualmente, as vacinas de células interias são produzidas a partir do tratamento por calor ou formalina, no entanto, este método pode causar danos estruturais moleculares de epítopos importantes<sup>178</sup>. Devido a isso, a radiação ionizante demonstra vantagens em relação aos métodos tradicionais de inativação<sup>204</sup>, já que tem capacidade de penetrar na maioria dos materiais biológicos tendo como alvo ácidos nucleicos prejudicando a replicação de microrganismos por fragmentação do DNA e causando menos danos as proteínas antigênicas de superfície<sup>178</sup>. Além disso, não há necessidade de remover qualquer resíduo químico após a inativação 198. Outra vantagem para o uso de imunógenos irradiados é a preparação de vacinas irradiadas liofilizadas, que podem ser relativamente baratas para produzir, armazenar e transportar sem refrigeração assim aumentando a disponibilidade para regiões carentes onde as vacinas são mais necessárias<sup>205</sup>.

Uma alternativa que também vem sendo estudada é o uso da radiação ionizante para a diminuição da toxicidade de toxinas e possível uso dessas moléculas como candidatos vacinais, trabalhos com venenos ofídicos têm demonstrado a atenuação da toxicidade quando comparadas com as toxinas não irradiadas e um maior potencial imunogênico<sup>206</sup> e sugerem a utilização de radiação

ionizante para alterar essas moléculas de proteína, a fim de melhorar algumas das suas propriedades de acordo com a necessidade<sup>207</sup>. Também foi constatado que a radiação ionizante diminuiu a atividade toxica da peçonha de abelhas também melhorando suas características imunológicas<sup>208</sup>. A radiação ionizante apresenta-se como uma ótima ferramenta para produção de antígenos vacinais, uma vez que além de diminuir sua toxidade, o método também se mostra eficiente na produção de melhores imunógenos, somado a vantagem de não adicionar novas moléculas a amostra de interesse, como ocorre em outras metodologias como a incubação com folmaldeído<sup>209,210</sup>.

Considerando a importância médica da toxina tetânica e o uso promissor da radiação ionizante em modificar a estrutura conformacional de proteínas contribuindo para a diminuição da toxicidade sem o uso de calor ou componentes químicos que comprometem a antigenicidade das moléculas tratadas e, a capacidade de melhorar a imunogênicidade das mesmas sem a aplicação de componentes que causam reações adversas pós-vacinais, decidimos investigar o efeito da radiação ionizante na estrutura da toxina tetânica e avaliar a atividade enzimática residual após a irradiação.

#### 2 Objetivos

#### 2.1 Geral

a) Avaliar o efeito da radiação gama na toxina tetânica irradiada a diferentes doses por fonte de Cobalto 60 (60CO) e a sua atividade enzimática residual após exposição.

#### 2.2 Específicos

- a) Avaliar o efeito da radiação ionizante na estrutura da toxina tetânica nas doses de 1 kGy, 2 kGy, 3 kGy, 4 kGy, 5 kGy, 6 kGy, 7 kGy e 8 kGy;
- b) Avaliar a perda da antigenicidade de epítopos específicos da toxina tetânica irradiada a diferentes doses;
- c) Avaliar a atividade enzimática residual da toxina tetânica após serem submetidas à radiação.

#### 3 Material e métodos

Todos os sais e reagentes utilizados possuem qualidade pró-análise sendo a água deionizada purificada em sistema Milli- $Q^{\otimes}$  (Millipore $^{\otimes}$ ), apresentando resistividade de 18,2 mega  $\Omega$ .

#### 3.1 Obtenção da vacina dupla para a imunização de camundongos C57BI/6j

A vacina dupla (toxóide diftérico 2 Lf/0,5 mL e toxóide tetânico 8,8 Lf/0,5 mL adsorvidos em Fosfato de Alumínio – *Biological E. Limited*®) foi gentilmente cedida pela Prof.ª Dra. Marta Heloísa Lopes – Coordenadora do Centro de Imunizações – Crie. A vacina dupla foi armazenada na geladeira (aproximadamente 4 °C) em seu frasco original durante as etapas de imunização.

#### 3.2 Animais experimentais

Para a obtenção do soro contendo anticorpos antitoxina tetânica, foram utilizados camundongos C57BI/6j (isogênicos) (n=5), pesando entre 20 a 22g, obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP. Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico com maravalha de pinho autoclavada, recebendo ração comercial Nuvilab<sup>®</sup> e água *ad libitum*. Os animais foram eutanasiados com 150 mg/Kg (dose letal) de Tiopental Sódico, diluído em solução salina por via intraperitoneal e sua manipulação foi conforme as normas de cuidados de animais de laboratório<sup>211</sup> e pelos "Princípios de ética em experimentação animal (COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal)". O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo sob o número 000338A.

#### 3.3 Imunização dos animais e obtenção do soro

Um grupo de cinco camundongos C57BI/6j foi imunizado por via subcutânea com três doses de 1,76 Lf (100 µL) de vacina dupla com intervalo de 15 dias entre as aplicações. Após a administração da vacina, todos os animais foram monitorados por um período de 48 horas a fim de observar quaisquer sinais clínicos de hiperimunização. Depois de 15 dias da última dose, os camundongos foram eutanasiados e o sangue total foi extraído por pulsão cardíaca e colocados em um único tubo de 1 mL (Eppendorf®). A amostra de sangue total foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos para a separação do soro. O soro foi fracionado em alíquotas de 100 µL por microtubo e armazenados em freezer (aproximadamente -20 °C) sem adição de conservante.

#### 3.4 Obtenção da toxina tetânica

A toxina tetânica concentrada foi gentilmente cedida pelo Serviço de Bacteriologia - Seção de Vacinas Anaeróbicas: Tétano e Botulínico do Instituto Butantan, pela coordenadora de produção Fernanda Lucio dos Santos Macarini.

A produção da toxina tetânica pelo Instituto Butantan para a produção de vacinas, inicia-se pelo cultivo do *Clostridium tetani* por processo fermentativo. Após o crescimento, o sobrenadante da cultura é obtido por filtração tangencial e concentração da toxina por membranas de 30 kDa. Na etapa seguinte, a toxina concentrada é incubada com formaldeído por 30 dias a uma temperatura de 37 °C para a destoxificação. Após esse período, a toxina tetânica destoxificada (toxóide tetânico) é submetida à diafiltração por membranas de 50 kDa, seguida de purificação por cromatografia de gel filtração e esterilização por filtração<sup>212</sup>.

A toxina tetânica utilizada em nosso trabalho foi retirada do processo de produção antes da incubação com o formaldeído, sendo assim, a nossa amostra encontra-se concentrada e não purificada. Um total de 30 mL da toxina tetânica nos foi fornecido e, inicialmente, utilizamos 20 mL de toxina tetânica para o início dos experimentos (lote1) e, depois, recebemos mais 10 mL para os experimentos finais (Lote 2). Ambas as toxinas foram armazenadas em seus frascos originais a 4 °C até o momento de serem irradiadas

#### 3.5 Quantificação de proteínas

quantificação proteínas determinada método das foi pelo quimioluminescente com o auxílio do Qubit® Fluorometer utilizando os reagentes do Qubit® Protein Assay Kit. Inicialmente, a solução de trabalho (Working Solution -WS) foi preparada com 199 µL tampão + 1 µL de fluoróforo próprios do kit. Para a leitura, foi feita a diluição da toxina tetânica na solução de trabalho em uma concentração de 1/200 em microtubo de 500 µL molecular probs life technologies® e agitada por 3 segundos no vórtex. Logo em seguida, a amostra foi incubada em temperatura ambiente por 15 minutos na ausência de luz antes da leitura. Após a incubação, a amostra foi inserida no equipamento para a quantificação. A leitura realizada definiu uma concentração de 1374 µg/mL de proteínas para o lote 1 e 2060 µg/mL para o lote 2.

#### 3.6 Irradiação da toxina tetânica

Dois lotes da toxina tetânica foram submetidos à radiação em períodos distintos. O primeiro lote foi fracionado em quatro alíquotas e dispostos em tubos Falcon® com 4,0 mL cada. Uma amostra permaneceu nativa (não irradiada) e as

outras alíquotas foram submetidas a doses de 1 kGy, 2 kGy e 3 kGy a uma taxa dose de 765 Gy/h.

O segundo lote foi fracionado em seis alíquotas com 2,0 mL cada e colocadas em microtubo de 2 mL. Uma amostra deste lote também permaneceu em seu estado nativo e as seguintes amostras foram irradiadas entre as doses de 4 kGy a 8 kGy respectivamente numa taxa dose de 690 Gy/h. As amostras nativas de ambos os lotes permaneceram do lado externo da fonte durante o tempo de radiação. A radiação foi distribuída de forma homogênea, sem blindagem e na presença de oxigênio. Todo o processo foi realizado em temperatura ambiente e logo após a radiação, as amostras foram aliquotadas em microtubos com 100µl cada e armazenadas na geladeira em temperatura de aproximadamente 4 °C até o uso.

# 3.7 Caracterização da toxina tetânica nativa e irradiada por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS

As amostras nativa e irradiadas foram submetidas a análise da mobilidade eletroforética por meio de EGPA-SDS, num sistema descontínuo e desnaturante<sup>213</sup> utilizando o sistema Mini-Protean IV (BIO-RAD®). O gel de empilhamento foi preparado a uma concentração de 4% e o gel de resolução a uma concentração de 7,5%, ambos é composto por acricalida/bis-acrilamida (Tabela 1).

Cinco μL (1μg/μL) de cada alíquota da toxina tetânica foram diluídas em 15 μL de tampão de amostra redutor (Tris-HCl 0.0625, SDS 2%, Glicerol 10%, 2-Mercaptoetanol 5%, Uréia 1M, Azul de Bromofenol 50%) e não redutor (Tris-HCl 0.0625, SDS 2%, Glicerol 10%, Ureia 1M, Azul de Bromofenol 50%) e aquecidas a 100 °C por 5 minutos. Após serem desnaturadas, foi aplicado 20 μl de cada amostra

por poço no gel de empilhamento. A corrida eletroforética decorreu na presença do tampão de corrida (Tris 0.025M-Glicina 0.192 M pH8.3) por duas horas. No início, a corrida foi submetida a uma corrente de 80 *volts* (20-30 mA) e, após as proteínas se deslocarem do gel de empilhamento, foi aplicada a voltagem de 100 *volts* até o final da corrida. Após a corrida, o gel foi incubado em solução fixadora (Metanol 40% e Ácido Acético 10%) por uma hora. Em seguida, o gel foi corado por 40 minutos numa solução corante (Metanol 50%, Ácido Acético 10%, Coomassie Blue R 250 0,1%). Posteriormente, o gel foi imerso na solução descorante (Metanol 10%, Ácido Acético 5%) e deixado sob agitação *overnight* para total visualização das bandas.

**Tabela 1** - Composição do gel de poliacrilamida para o gel de empilhamento e de resolução.

Solução	Gel de empilhamento 4% (mL)	Gel de resolução 7,5% (mL)
Solução A (Acrilamida 29,2%, Bis-acrilamida 0,8%)	0,8	4,5
Solução B (Tris-HCl (2M), SDS 10%)	_	4,5
Solução C (Tris-HCl (1M), SDS 10%)	1,5	_
Persulfato de amônio 10%	0,05	0,07
TEMED	0,01	0,01
Água	3,6	9,0

#### 3.8 Digestão Enzimática por Tripsina

As bandas da toxina tetânica nativa e irradiadas a diferentes doses foram recortadas, descoradas (75 mM de bicarbonato de amônio e 40% de etanol) e reduzidas com Ditiotreitol (DTT), por 30 minutos a 37 °C. Para alquilação, as

amostras foram incubadas com lodoacetamida (IAA 50 mM) em temperatura ambiente, na ausência de luz por 30 minutos. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado e os "spots" foram lavados com 25 mM de bicarbonato de amônio. O sobrenadante foi novamente descartado e as amostras foram desidratadas com acetonitrila por três lavagens de 10 minutos cada. Logo após, as bandas foram secas e reidratadas por 45 minutos a 4° C com uma solução de 50 mM de bicarbonato de amônio contendo 100 ng de Tripsina. Para a etapa da digestão das proteínas, foi removido o excesso da solução com tripsina, foi acrescido 50 mM de bicarbonato de amônio até cobrir totalmente cada "spot" e armazenado por um período de 18 horas a uma temperatura constante de 30° C. Para a extração dos peptídeos das bandas, foi acrescentada uma solução de acetonitrila, 5% de ácido trifluoroacético (1:1), e colocados em banho de ultrassom durante 10 minutos. Em seguida, os sobrenadantes foram removidos e guardados em um novo tubo. Este procedimento repetiu-se três vezes<sup>214</sup>.

### 3.9 Análise Proteômica dos peptídeos da toxina tetânica nativa e das frações irradiadas

A análise para a identificação proteômica foi realizada em colaboração com o laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan pelo doutorando Douglas Mariano sob a supervisão do Dr. Daniel Carvalho Pimenta. Os materiais adquiridos por digestão *in gel* foram analisados através da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS), utilizando um sistema UFLC binário (20A Prominence, Shimadzu Co<sup>®</sup>, Japan) interligado ao espectrômetro de massas do tipo *Electrospray - Ion Trap - Time of Flight* - ESI-IT-TOF (Shimadzu Co<sup>®</sup>, Japão). Inicialmente as amostras foram ressuspendidas em água / 0,1% ácido acético e analisadas na coluna C18 (Discovery C18, 5 μm, 50 mm x 2.1 mm), tendo

como solventes (A) ácido acético / água (1:999) e (B) ácido acético / ACN / água (1:900:99). Por meio de um fluxo constante de 0,2 mL/min, o gradiente variou de 5 a 40% de solvente B, durante 35 minutos, a 37 °C, e monitorado a 214 nm por um detector Shimadzu SPD-M20A PDA. Após o ensaio cromatográfico, foi realizada a análise por espectrometria de massas, numa temperatura de 200 °C. A voltagem utilizada da interface foi de 4,5 kV e a voltagem do detector, 1,8 kV. A fragmentação foi causada por gás de colisão argônio, com 50% de energia, os espectros MS foram adquiridos no modo positivo e coletados na faixa de 350 - 1400 *m/z* (razão massa carga) e os espectros MS/MS foram coletados na faixa de 500 *m/z* - 1950 *m/z*. O padrão de fragmentação para cada amostra foi processado pelo programa Peaks Studio V7 <sup>215</sup> para sequenciamento 'de novo' e análises proteômicas e de comparação de sequências, realizando as buscas contra o banco de dados UniProt-SwissProt.

#### 3.10 Dessalinização da toxina tetânica nativa e irradiadas por centrifugação

As amostras da toxina tetânica foram submetidas à filtração por centrifugação para a remoção dos sais e posteriormente utilizadas na análise por MALDI-TOF. As amostras foram homogeneizadas com tampão bicarbonato de amônio 100 mM e filtradas utilizando um filtro para centrifugação Centricon YM-3 3 kDa (Millipore®). Foram realizadas três centrifugações a 4500 g. A cada centrifugação, foram acrescidos volumes do tampão bicarbonato de amônio e tempos distintos (Tabela 2). Após essa etapa, foi colocado o tubo de coleta na parte superior do filtro e centrifugado por mais 30 minutos de forma invertida para a recuperação do filtrado.

**Tabela 2** – Etapas de centrifugação da toxina tetânica.

Centrifugação	Toxina tetânica (µL)	Tampão bicarbonato de amônio 100mM (μL)	Tempo (minutos)
1º etapa	200	500	30
2º etapa		300	20
3º etapa		300	20

### 3.11 Espectrometria de massas das amostras de toxina tetânica nativa e irradiadas

Alíquotas de toxina tetânica nativa e irradiadas filtradas foram liofilizadas e ressuspendidas com 5 μL de solução 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA). As amostras (1 μL) então foram co-cristalizadas em uma placa metálica com uma solução matriz composta de ácido sinapínico (solução saturada em ACN / água / 0,1% de TFA). Após a secagem em temperatura ambiente, foram analisadas em um espectrômetro de massas do tipo *Matrix Associated Laser Desorption Ionization - Time of Flight* MALDI – TOF/TOF (Axima Performance, Shimadzu®). Os espectros foram obtidos utilizando o modo linear positivo, num intervalo de massas entre 10000 *m/z* a 200000 *m/z*.

# 3.12 Análise da antigenicidade por ELISA da toxina tetânica nativa e irradiada a diferentes doses

Placas depoliestireno com 96 poços *high binding* (Costar<sup>®</sup> 3590) foram sensibilizadas pela adição de tampão Carbonato de Sódio 0.1M contendo as amostras nativa ou irradiadas da toxina (1 μg/ml), por 18 horas em câmara úmida a 4° C. Após esse período, as placas são lavadas com PBS Tween 0,02% na

lavadora de placas *HidroSpeed* (Tecan®) programada para 5 lavagens. O bloqueio foi feito com PBS Tween + 0.3% de leite em pó desnatado (Molico®) durante uma hora na estufa a 34 °C. Após a lavagem para a remoção dos resíduos do bloqueio, foram adicionados 20 µl de soro de camundongos imunizados com vacina dupla (toxóide tetânico e diftérico) em hexaplicata numa diluição de 1/400 e levadas na estufa a 34 °C por mais uma hora. Após, foi aplicado 20 µl por poço de conjugado diluído anti-IgG de camundongo (1/10000) Peroxidase (SIGMA®) e incubados novamente na estufa a 34 °C. A revelação da reação foi realizada pela adição de OPD (diamina ortofenila) aos poços, interrompiada após 30 minutos pelo acréscimo de HCl 4N. A leitura das placas foi realizada em Espectrofluorímetro *Multi-mode Microplate Reader FilterMax* F5 (Molecular Devices®, Califórnia, USA) em filtro de absorbância de 492 nm²<sup>16</sup>.

### 3.13 Análise da reatividade por western blot da toxina tetânica nativa e irradiada a diferentes doses

Para a separação das proteínas, foi realizado EGPA-SDS conforme descrito acima até a etapa da corrida eletroforética. Em seguida, as proteínas separadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em sistema de transferência semi-seco Trans-Blot RD (BIO-RAD®), embebidas em tampão de transferência Towbin (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, pH 8,1-8,5). A transferência foi conduzida a uma amperagem constante de 10 volts por 40 minutos. As membranas foram bloqueadas por imersão em solução de PBS Tween Leite 5% por 1 hora sob agitação. Em seguida, a membrana contendo o antígeno foi incubada "overnight" com o soro de camundongo imunizado com a vacina dupla numa diluição de 1/400.

A ligação antígeno-anticorpo foi realizada por incubação com anti-IgG de

camundongo conjugado a peroxidase (SIGMA®) por 1 hora. A revelação foi feita utilizando a solução DAB (DAB 10 mg, 10 ml PBS, 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%)<sup>217</sup>. Entre as etapas, foram realizadas as lavagens da membrana com PBS Tween 0,05% com repetições de três vezes por 5 minutos cada lavagem.

#### 3.14 Atividade enzimática

A atividade enzimática foi realizada segundo o protocolo descrito por Perpetuo et al.,218 com alteração na concentração da toxina tetânica, já que utilizamos amostra não purificada. Em uma microplaca preta de 96 poços high binding (Costar®) foram adicionados 167,52 µL/poço de tampão Tris-NaCl pH 7,5 (Tris 50mM, NaCl 150mM). A seguir, foram acrescidos 27,48 µg/poço de toxina tetânica nativa e irradiadas em duplicata da seguinte forma: O primeiro lote foi realizado com a toxina nativa e com as frações irradiadas de 1 kGy a 3 kGy e o segundo lote com a nativa correspondente ao mesmo e com as proteínas irradiadas de 5 kGy a 8 kGy. E, por fim, foi incluído 5 mM/poço do substrato FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) para o início da reação. Os valores da fluorescência foram medidos a cada 30 segundos num período de 5 minutos totalizando 10 leituras, o detector de fluorescência foi ajustado para 320 nm de excitação e 420 nm de emissão. O substrato FRET foi gentilmente cedido pelo Dr. Ivo Lebrun do laboratório de Bioquímica e Biofíca do Instituto Butantan. O substrato FRET é composto pelos resíduos de aminoácidos 73-81 da proteína sinaptobrevina ligados ao grupo fluorescente Abz (orto-aminobenzóico) e o grupo supressor EDDnp (N-[2, 4-dinitrofenil]-etilenodiamino): Abz-GASQ\FETSA-Q-EDDnp.

#### 3.15 Análise Estatística

Para análise da caracterização proteica por SDS PAGE foi utilizado o software Cliqs 1D. Os testes t-Student para análise da antigenicidade e o cálculo de regressão linear para a análise da atividade enzimática residual, foram realizados pelo pacote estatístico GraphPad Prism 6.0.

#### 4 Resultados

### 4.1 Caracterização do perfil eletroforético por SDS Page da toxina tetânica nativa e irradiada

Para o ensaio de caracterização das proteínas em seu estado nativo ou irradiado a diferentes doses, realizamos eletroforese SDS-PAGE a uma concentração de 7,5% em condições redutoras e não redutoras.

A partir da análise visual das proteínas não tratadas com agente redutor, observamos um perfil heterogêneo de bandas com maior número de proteínas de massa molecular alta, com maior evidência nas bandas de 100 kDa e 150 kDa e algumas moléculas proteícas de média e baixa massa (Figura 9A). Ao compararmos as frações das proteínas irradiadas a diferentes doses com as proteínas em seu estado nativo, observamos uma modificação discreta na intensidade das bandas até a dose de 4 kGy. Nas doses de 5 KGy até 8 kGy, notamos um arraste e desaparecimento das bandas até a massa de100 kDa. A partir da massa molecular de 75 kDa, notamos perfis de bandas pouco definidas e a presença de uma banda de baixa massa molecular inferior a 37 kDa, persistindo até a dose de 8 kGy. Não foi observado a formação de agregados com massa acima de 150 kDa mesmo com o aumento da dose de radiação. (Figura 9).

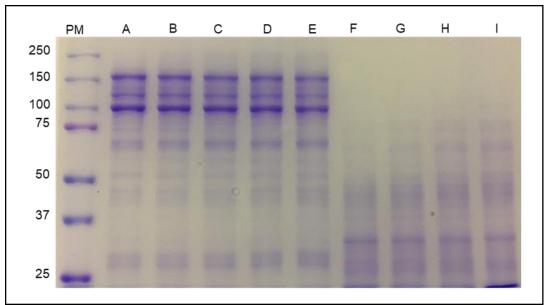


Figura 9 - Análise eletroforética (SDS-PAGE), na ausência de agente redutor, da toxina tetânica nativa e irradiadas: (PM) Peso molecular; (A) nativa; (B) 1 KGy; (C) 2 KGy; (D) 3 KGy; (E) 4 KGy; (F) 5 KGy; (G) 6 KGy, (H) 7 KGy e (I) 8 KGy.

No perfil eletroforético obtido em condições redutoras, observamos uma mudança no alinhamento das proteínas quando comparadas às amostras sem o uso de agente redutor. Neste perfil, a toxina tetânica corresponde as bandas de 100 kDa, referente a cadeia pesada e outra banda de 50 kDa, relacionada a cadeia leve.

Nas alíquotas das proteínas submetidas a radiação em doses distintas, percebemos uma modificação gradual nos perfis conforme o aumento da dose, contudo, as bandas permanecem definidas até a dose de 8 kGy. Ao comparar as alíquotas de proteínas irradiadas com a nativa, a dose de 1 kGy não apresentou modificações significativas. Entre as doses de 2 kGy a 4 kGy, o perfil permaneceu semelhante. A partir da dose de 5 kGy, as bandas estão menos expressivas e notase o aparecimento de bandas de massa molecular menor não observadas em doses anteriores. Entre as doses de 7 kGy e 8 kGy, houve um alargamento da banda de 100 kDa. Não há evidência de formação de agregados de massa molecular acima de 100 kDa (Figura 10).

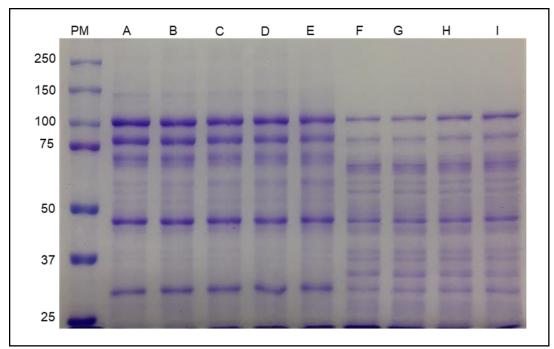


Figura 10 - Análise eletroforética (SDS-PAGE), na presença do agente redutor, da toxina tetânica nativa e irradiadas: (PM) Peso molecular; (A) nativa; (B) 1 KGy; (C) 2 KGy; (D) 3 KGy; (E) 4 KGy; (F) 5 KGy; (G) 6 KGy, (H) 7 KGy e (I) 8 KGy.

A fim de diminuir a subjetividade da análise visual dos perfis das proteínas no gel, realizamos a avaliação densitométrica das massas moleculares homólogas a toxina tetânica a partir das amostras tratadas com o agente redutor. A análise qualitativa mostrou diferença da área dos picos das bandas de 100 kDa e 50 kDa irradiadas a diferentes doses em relação a proteína nativa. Na dose de 1 kGy (Figura 11B), a área do pico foi equivalente com a área da proteína que não foi submetida a radiação. Entre as doses de 2 kGy a 4 kGy (Figura 11C, 12A e 12B), houve uma pequena alteração da área, mas ainda permaneceram semelhantes com a nativa. A partir da dose de 5 kGy (Figura 12C), houve uma maior mudança no perfil da área de todos os picos até a dose de 8 kGy (Figura 13A, 13B e 13C).

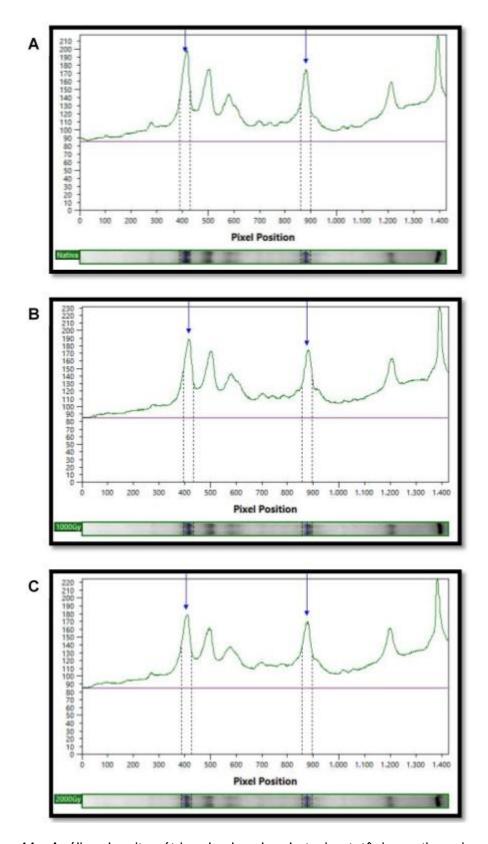
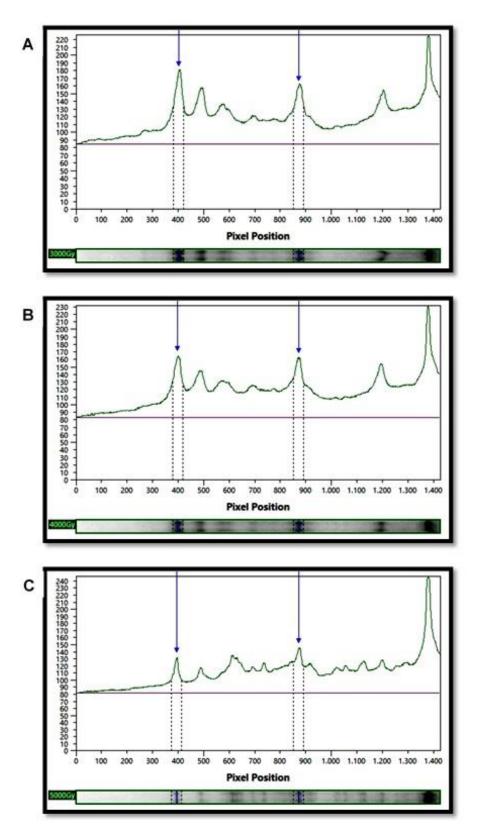


Figura 11 - Análise densitométrica das bandas da toxina tetânica nativa e irradiada a diferentes doses por densitometria digital. Setas: (Esquerda) Banda equivalente a 100 kDa. (Direita) Banda equivalente a 50 kDa. (A) Nativa; (B) 1 kGy; (C) 2 kGy.



**Figura 12** - Análise densitométrica das bandas da toxina tetânica irradiada a diferentes doses por densitometria digital. Setas: (Esquerda) Banda equivalente a 100 kDa. (Direita) Banda equivalente a 50 kDa. (A) 3 kGy; (B) 4 kGy; (C) 5 kGy.

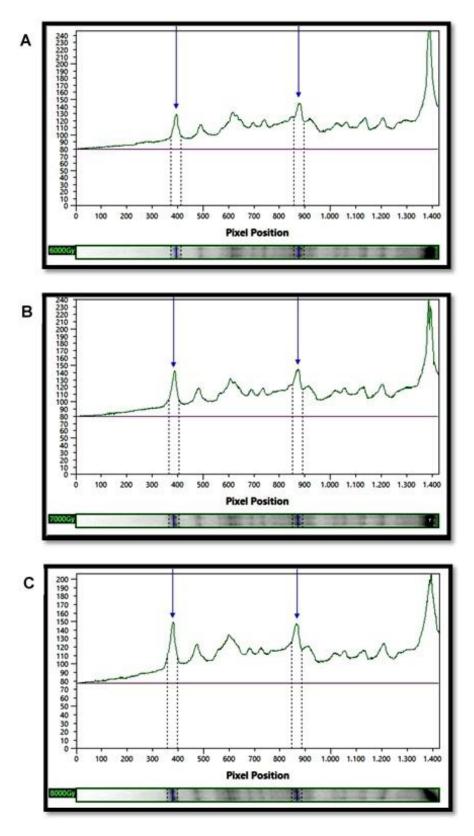
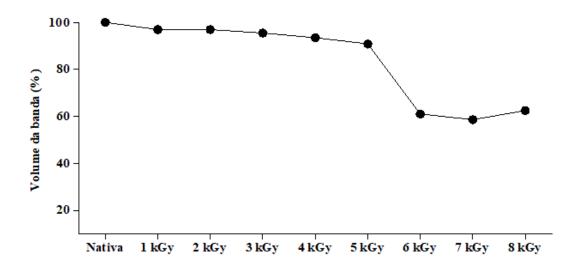


Figura 13 - Análise densitométrica das bandas da toxina tetânica irradiada a diferentes doses por densitometria digital. Setas: (Esquerda) Banda equivalente a 100 kDa. (Direita) Banda equivalente a 50 kDa. (A) 6 kGy; (B) 7 kGy; (C) 8 kGy.

Ao analisar de forma quantitativa as alterações dos volumes das bandas promovidas pela radiação ionizante nas massas de 100 kDa e 50 kDa, notamos uma perda progressiva de massa conforme o aumento da dose. Entre as doses de 1 kGy a 5 kGy, a perda do volume foi gradativa, a partir de 6 kGy, a diferença nos volumes foi mais evidente. A perda do volume das bandas das alíquotas irradiadas em relação à fração nativa foi de 1 kGy - 3,04%, 2 kGy - 3,05%, 3 kGy - 4,49%, 4 kGy - 6,32%, 5 kGy - 9,1%, 6 kGy - 38,97%, 7 kGy - 41,384% e 8 kGy - 37,44% (Figura 14).



**Figura 14** - Análise do volume das bandas da toxina tetânica em seu estado nativo e submetidas à radiação gama <sup>60</sup>Co.

Em uma análise geral do perfil eletroforético, no que diz respeito a massa molecular, observamos o aparecimento de novas bandas a partir da dose de 1 kGy com maior incidência na dose de 5 kGy e a dissociação de algumas proteínas a partir desta dose. A massa molecular de 100 kDa foi reconhecido pelo software em todas as doses de radiação, já a massa de 50 kDa apenas até a dose de 7 kGy (Figura 15).

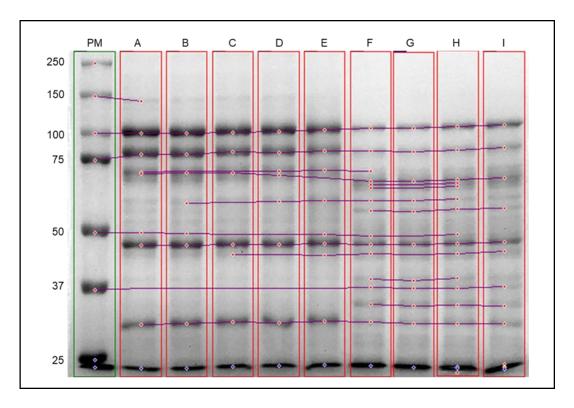
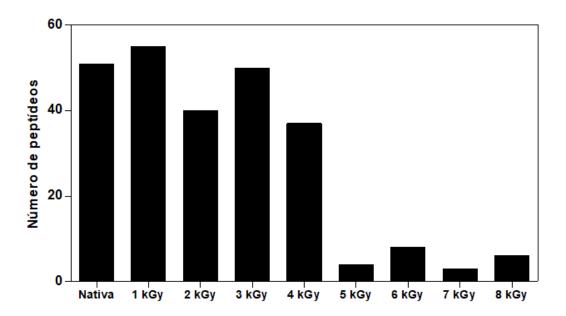


Figura 15 - Análise da massa molecular das bandas do perfil das proteínas nativa e irradiadas a doses distintas: (PM) Peso Molecular; (A) Nativa; (B) 1 kGy; (C) 2 kGy; (D) 3 kGy; (E) 4 kGy; (F) 5 kGy; (G) 6 kGy; (H) 7 kGy; (I) 8 kGy.

# 4.2 Identificação dos peptídeos da toxina tetânica por digestão em gel e espectrometria de massa

Para avaliação da integridade dos peptídeos após a exposição da toxina a diferentes doses de radiação, realizamos digestão das proteínas separadas em gel de poliacrilamida com tripsina e espectrometria de massa para identificação dos peptídeos. Na análise da amostra nativa e das amostras irradiadas entre as doses de 1 kGy e 4 kGy, foram extraídos do gel sem o uso de redutor, as proteínas coradas de aproximadamente 150 kDa. A partir da dose de 5 kGy, devido a radiação causar um arraste, foram recortadas as bandas equivalentes a 100 kDa e 50 kDa do gel em condições redutoras, já que as bandas nestas condições permaneceram definidas em todas as doses.

A toxina tetânica foi identificada em todas as amostras, mas o reconhecimento do número de peptídeos variou conforme o aumento da dose. Foram observados um padrão no número de peptídeos identificados na amostra nativa, 1 kGy e 3 kGy, também foi observado similaridade nas doses de 2 kGy e 4 kGy. A partir da dose de 5 kGy o número de peptídeos identificados diminuiu significativamente sem disparidade até a dose de 8 kGy (Figura 16).



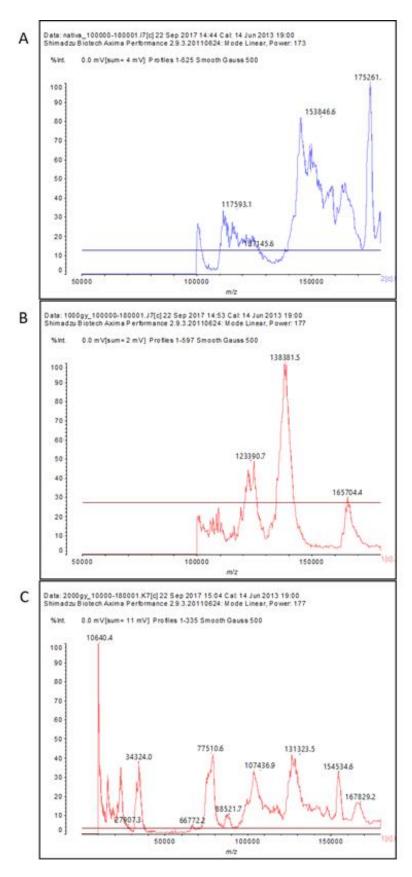
**Figura 16** - Número de peptídeos da toxina tetânica nativa e irradiada, a diferentes doses, identificados por espectrometria de massa tipo ESI-IT-TOF.

A partir da dose de 5 kGy, foi detectado peptídeos de diferentes proteínas do *Clostridium tetani* não relacionadas a toxina tetânica com massa molecular entre 137, 036 kDa a 18,627 kDa. As proteínas 7 metilasparato amônia-liase, repetição de ligação à parede celular putativa 2 e proteína putativa da camada s, foram observadas nas doses de 5 kGy a 8 kGy. A proteína metilasparato amônia liase foi identificada nas doses de 6 kGy a 8 kGy. As demais proteínas, foram observadas apenas na dose de 7 kGy (Anexo A).

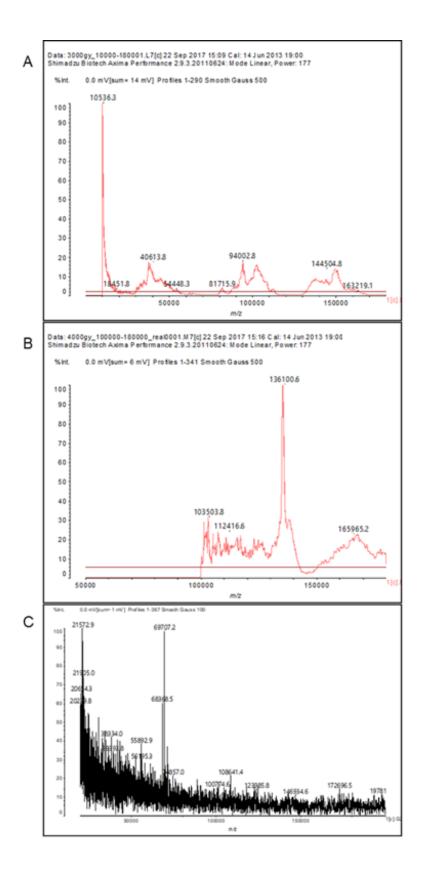
# 4.3 Análise estrutural das amostras proteicas nativa e irradiada por espectrometria de massa – MALDI-TOF

Para se obter uma análise mais sensível da ação da radiação gama na toxina tetânica, realizamos espectrometria de massas para a identificação de mudanças estruturais não observadas por SDS PAGE. Por se tratar de uma amostra não purificada, no espectro das proteínas em seu estado nativo, esperavase encontrar picos de massas moleculares distintos. Foram encontradas duas principais razões massa carga: a de 175261 *m/z* e 153846,6 *m/z* (Figura 17A). Devido a diferentes intensidades de sinal, a faixa de detecção variou entre os espectros. Nas amostras nativa, 1 kGy e 4 kGy a leitura foi entre 100000 *m/z* a 180000 *m/z*, nas amostras 3 kGy e 4 kGy foi entre 10000 *m/z* e 180000 *m/z*, já as amostras de 5 kGy a 8 kGy a detecção ocorreu de 20000 *m/z* a 200000 *m/z*.

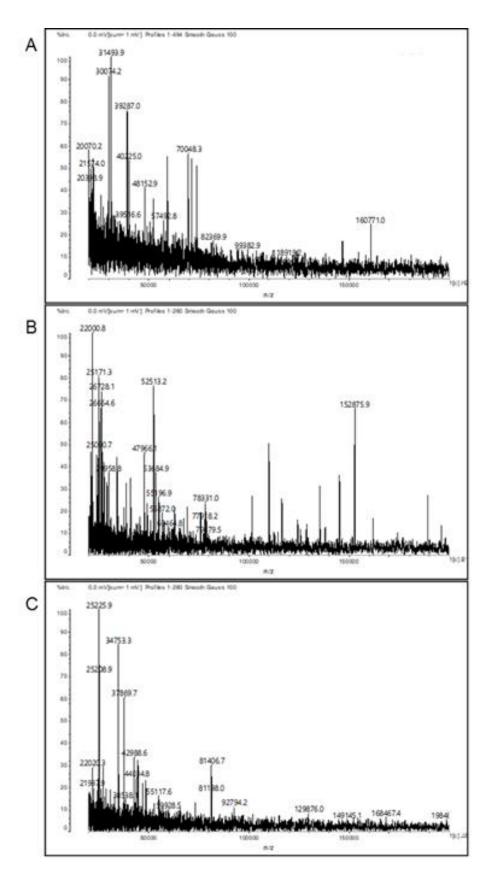
Quanto ao efeito da radiação, os picos majoritários citados acima não apareceram nos espectros das proteínas irradiadas, nas quais observamos a formação de fragmentos de menor massa molecular de forma gradativa até a dose de 4 kGy (Figura 17A, 17B, 17C, 18A e 18B). Mudanças mais significativas ocorreram a partir da dose de 5 kGy em que a presença de maior número de picos foi observada. Picos de massas altas maiores que 170000 *m/z* também foram notados a partir desta dose (Figura 18C, 19A, 19B e 19C).



**Figura 17 -** Espectro da toxina tetânica nativa e frações irradiadas. (A) Nativa; (B) 1 kGy; (C) 2 kGy.



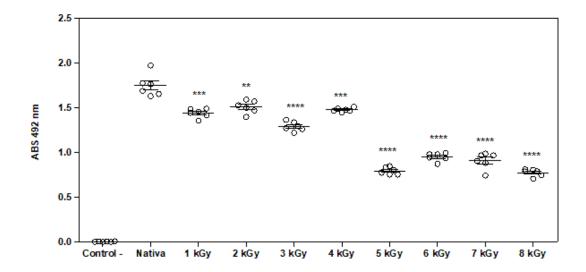
**Figura 18 -** Espectro da toxina tetânica de frações irradiadas. (A) 3 kGy; (B) 4 kGy; (C) 5 kGy.



**Figura 19 -** Espectro da toxina tetânica de frações irradiadas. (A) 6 kGy; (B) 7 kGy; (C) 8 kGy.

# 4.4 Avaliação do reconhecimento da toxina tetânica nativa ou irradiada em diferentes doses por anticorpos de camundongos C57BI/6j imunizados com vacina dupla por ELISA e Western Blot

A antigenicidade da toxina nativa e irradiada a diferentes doses foi analisada por ELISA, no qual houve reconhecimento dos anticorpos IgG de camundongos C57BI/6j imunizados com a vacina dupla independente da dose que a toxina foi submetida. Ao comparar a antigenicidade da toxina nativa em relação a toxina irradiada por Cobalto 60 a diferentes doses, observamos diferença significativa de todas as doses. Quando comparadas coma fração nativa, ocorreu uma redução gradual no reconhecimento dos anticorpos pelo antígeno. Nos antígenos irradiados a 1 kGy, 2 kGy e 4 KGy, a diferença significativa foi semelhante, seguida de uma maior perda do reconhecimento em 3 KGy, e nas amostras de 5 kGy a 8 kGy (Figura 20).



**Figura 20** - Avaliação da antigenicidade, por ensaio imunoenzimático, da toxina tetânica nativa e irradiada a diferentes doses. (\*\*p=0.0022, \*\*\* p=0.0003 e \*\*\*\* p<0.0001).

Ao confirmar os resultados obtidos por ELISA, foi realizada a análise qualitativa por Western Blot das bandas correspondentes a cadeia pesada (100k

Da) e a cadeia leve (50 kDa) da toxina tetânica. Na toxina nativa, houve o reconhecimento das duas cadeias, mostrando que há epítopos antigênicos nos dois polipeptídios (Figura 21A). Nas frações das amostras irradiadas, houve o reconhecimento dos anticorpos em todos os perfis, conforme o aumento da dose, esse reconhecimento pelos epítopos da toxina diminui gradualmente, sendo a banda de 8 kGy demonstrar menor reatividade (Figura 21).

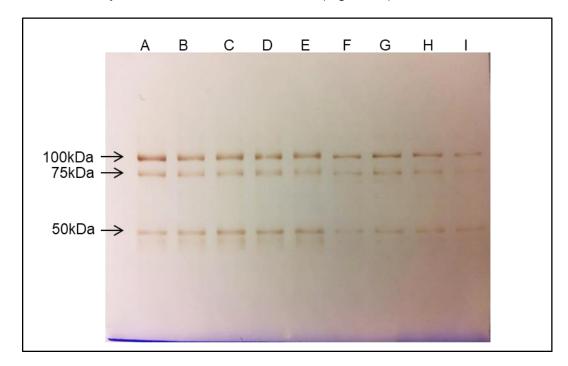


Figura 21 - Antigenicidade da toxina tetânica nativa e irradiada a diferentes doses, por anticorpos anti-TeNT: (PM) Peso Molecular; (A) Nativa; (B) 1 kGy; (C) 2 kGy; (D) 3 kGy; (E) 4 kGy; (F) 5 kGy; (G) 6 kGy; (H) 7 kGy; (I) 8 kGy.

# 4.5 Atividade enzimática das alíquotas de toxina tetânica nativa e irradiadas sobre o substrato FRET

A fim de analisar a capacidade da radiação ionizante em atenuar a atividade enzimática da toxina tetânica, realizamos o ensaio *in vitro* com o substrato FRET. No lote 1, com as alíquotas de toxina tetânica irradiadas de 1 a 3 kGy, observamos uma redução da atividade enzimática conforme o aumento da dose, a maior perda

de atividade deste lote foi de 37,2% relacionada a toxina irradiada a 3 kGy. No segundo lote, também observamos a atenuação da atividade enzimática conforme o aumento da dose de radiação. A alíquota de toxina irradiada a 4 kGy permaneceu com atividade enzimática residual de 94,32% e a amostra irradiada a 8 kGy preservou 65% de atividade (Tabela 3).

**Tabela 3** - Atividade enzimática residual da toxina tetânica nativa e irradiada a diferentes doses.

l	Lote 1		Lote 2	
Amostra	Atividade Enzimática (%)	Amostra	Atividade Enzimática (%)	
Nativa	100	Nativa 2	100	
1 kGy	94,4	4 kGy	94,32	
2 kGy	97,2	5 kGy	81,7	
3 kGy	62,8	6 kGy	75,66	
		7 kGy	68,22	
		8 kGy	65,0	

#### 5 Discussão

A toxina tetânica é uma potente neurotoxina de alta letalidade que age nos terminais nervosos causando o tétano. Atualmente, a melhor forma de prevenção e controle da doença é através da imunização com a toxina tetânica destoxificada por agente químico<sup>219</sup>. O processo de produção da vacina envolve o cultivo do microrganismo, extração e concentração do sobrenadante da toxina, inativação da molécula transformando-a em toxóide e purificação.

Em nossos experimentos, utilizamos a toxina concentrada não purificada resultante do processo de produção realizado pelo Instituto Butantan. Dentro do processo de produção, a alíquota utilizada foi extraída do meio de cultura por filtração logo após o cultivo do *C. tetani*<sup>220</sup>.

A vacina contra o tétano produzida com toxina tetânica inativada pelo formol vem sendo utilizada desde 1924 e confere alta proteção. No entanto, a vacina feita com o toxóide tetânico está relacionada a efeitos colaterais após a vacinação, toxicidade, perigos oferecidos pelo meio de produção e poluição ocasionados pelo uso do formaldeído<sup>221</sup>. Atualmente, vacinas contra o tétano que não necessitam de adjuvantes e do uso de formaldeído para o seu desenvolvimento estão sob investigação: como, por exemplo, o uso do fragmento C ligado a sulfidrilas<sup>222</sup>, fragmento C associado a flagelina<sup>223</sup> e vacina recombinante do fragmento C com a subunidade B da toxina colérica<sup>224</sup>.

Inicialmente, realizamos a caracterização da toxina tetânica concentrada e não purificada em seu estado nativo e das alíquotas submetidas à radiação.

Em relação à amostra da toxina nativa, no perfil eletroforético realizado em condições não redutoras, observamos a banda de 150 kDa correspondente a toxina e também a presença de proteínas distintas, com maior destaque da banda de 100 kDa. Ensaios realizados por Guilhen *et al.*<sup>212</sup> com a amostra da toxina nas mesmas

condições que a nossa, obtiveram resultados parecidos e sugeriram três hipóteses para bandas entre 70 kDa e 60 kDa: em primeiro lugar, a cadeia leve pode ter formado complexos com outras proteínas do meio de cultura ou do próprio microrganismo, em segundo lugar, estas bandas representam outras proteínas do *Clostridium tetani* não relacionadas a toxina tetânica e, em terceiro, pode ter ocorrido a degradação da cadeia pesada da toxina. Essas hipóteses também podem justificar a banda de 100 kDa, o que também pode ter ocorrido, é o rompimento da ponte dissulfeto e essa banda ser apenas a cadeia pesada da toxina. Uma possível explicação para a presença de diferentes proteínas do *Clostridium tetani* na amostra estudada, pode ser resultado da lise bacteriana que é realizada para obtenção da toxina logo após o cultivo do microrganismo<sup>225</sup>.

Na amostra incubada com o agente redutor, a toxina tetânica está representada pelas bandas de 100 kDa e de 50 kDa respectivamente. Quando comparamos os perfis da toxina tetânica em condições redutoras e não redutoras, observamos massas distintas da molécula. Na amostra não tratada com 2-mercaptoetanol, a toxina manteve sua massa molecular de 150 kDa, já a amostra que foi incubada com o agente redutor, há presença de uma banda de 100 kDa e outra de 50 kDa. Isso se dá devido ao 2-mercaptoetanol ser agente redutor e dissociar ligações feitas por pontes dissulfeto<sup>226</sup>. O perfil observado é o esperado, e a literatura mostra resultados semelhantes obtidos nas mesmas condições<sup>227,228</sup>.

A caracterização das amostras irradiadas demonstrou que a radiação ionizante causou modificação na massa molecular da toxina conforme o aumento da dose de radiação, sendo que a partir da dose de 5 kGy essa modificação foi mais representativa no perfil das bandas nos dois géis. O surgimento de novas bandas sugere que a radiação ionizante pode ter causado danos na estrutura primária das proteínas, provavelmente destruindo as ligações covalentes entre os aminoácidos e assim gerando fragmentos de proteínas. E apenas no gel em

condições redutoras, podemos sugerir que houve o início da formação de agregados ou *cross-link*, devido ao alargamento da banda nas doses de 7 kGy e 8 kGy.

Também podemos observar perfis distintos entre as proteínas irradiadas sem o uso de agente redutor e tratadas com agente redutor. No perfil eletroforético em condições redutoras, houve uma modificação gradual até a dose de 4 kGy e, a partir de 5 kGy, houve um arraste com a presença de apenas uma banda de baixa massa molecular pouco definida e não visualizada em doses anteriores. Já em condições redutoras, observamos maior quantidade de bandas de média e baixa massa molecular. O perfil também modificou gradualmente, mas as bandas permaneceram definidas até a dose mais elevada, mesmo que menos expressivas. Ao considerar os efeitos produzidos nas proteínas até a dose de 5 kGy, trabalhos anteriores sem o uso do agente redutor apresentam resultados semelhantes aos nossos, entretanto, em doses menores. Análises de caracterização da lectina do veneno da Bothrops leucurus irradiada, mostrou similaridade na dose de 1 kGy quando nenhuma alteração foi observada, no entanto, a partir da dose de 2 kGy houve mudanças significativas, como a degradação da banda principal, o que em nossa análise ocorreu a partir da dose de 5 kGy<sup>229</sup>. Abib e Laraba<sup>230</sup>, mostraram que as proteínas de alta massa molecular irradiadas foram clivadas nas doses de 2 kGy. O mesmo ocorreu nos achados de Clissa et al.231 em que os componentes com major massa molecular do veneno de Crotalus durissus terrificus foram destruídos após serem submetidos às doses de 2, 3 e 5 kGy. Em contrapartida, no perfil eletroforético da crotamina, não foi observado diferenca da toxina nativa e irradiada, isto sugere que não houve agregação ou ruptura dos fragmentos produzindo cadeias de polipeptídio<sup>232</sup>.

Trabalho realizado com venenos brutos irradiados em solução de cinco espécies dos gêneros *Echis* e *Bitis* e seis espécies dos gêneros *Naja* e

Dendroaspis, demonstraram perfis diferenciados quanto ao uso do redutor, mas em ambos foram observados agregação em doses mais elevadas que 4,5 kGy<sup>233</sup>. Por outro lado, Caproni *et al.*<sup>234</sup> mostraram que a radiação promoveu alterações estruturais caracterizadas por proteínas de maior massa molecular, mas não apresentou dissociação das subunidades mesmo na presença de agente redutor, sugerindo que a radiação resultou na formação de ligações intermoleculares resistentes ao agente redutor.

Em nosso experimento, as alterações da massa molecular como o aparecimento de novas bandas, formação de agregados e possível *cross link* em doses mais elevadas, são condizentes aos resultados demonstrados por outros autores, como os encontrados em estudo utilizando papaína<sup>235</sup> e β-Lactoglobulina<sup>236</sup>. No entanto, ainda não podemos comprovar que houve modificação, uma vez que os autores relatam tal observação nos produtos irradiados a partir de 10 KGy.

A espectrometria de massa MALDI-TOF confirmou as fragmentações observadas no gel causado pelo uso da radiação em todas as frações de proteínas expostas a diferentes doses. Essas fragmentações ocorreram de forma aleatória entre as doses podendo ser observadas a partir da dose de 1 kGy. A partir da dose de 5 kGy, observamos a formação de picos acima de 170000 *m/z* não observados nos espectros das doses de 1 kGy a 4 kGy, o que provavelmente indique a formação de agregados. De um modo geral, a literatura mostra observações semelhantes as nossas analises por MALDI-TOF. Em botropstoxina I, formas multiméricas até a dose máxima investigada de 2 kGy foram identificadas, enquanto na toxina nativa, apenas a forma monomérica foi detectada<sup>237</sup>. Estudos realizados com crotamina demonstraram aumento da massa nas doses de 2 kGy e 10 kGy que pode ser atribuída a oxidação do veneno<sup>238</sup>

Também observaram por meio desta análise, a formação de fragmentos menores na amostra irradiada em comparação a proteína nativa. Quanto à razão massa/carga de 175261, este pico sugere ser uma proteína de membrana do *Clostridium tetani*, já que esse tipo de proteína varia com o sua massa de 160 kDa a 180 kDa entre as cepas do microrganismo<sup>239</sup>.

O uso de diferentes faixas de detecção nos espectros pode ter ocorrido em razão da toxina ser uma molécula de massa molecular alta, ou devido à sensibilidade dos detectores de íons padrão diminuir com o aumento da massa iônica<sup>240</sup>.

A radiação ionizante vem sendo estudada ao longo dos anos por causar mudanças na estrutura das proteínas e por contribuir na diminuição da toxicidade de moléculas<sup>241–243</sup>. Trabalhos com proteínas irradiadas tem sido realizados há pelo menos 30 anos<sup>244</sup> e a etapa de caracterização é muito importante para observar os efeitos da radiação nas estruturas das moléculas. Vários estudos foram realizados para caracterizar essas ações e alterações estruturais entre as toxinas nativas e irradiadas<sup>177,245</sup>. Essa mudança conformacional e fragmentação ocorrem por degradação e outras ações causadas pela ação direta e indireta da radiação ionizante, onde efeitos diretos da radiação são causados quando os raios gama e os elétrons de alta energia interagem diretamente com as moléculas. Já o maior dano pode ser por via indireta, em que a partir da radiólise da água pela ionização, formam-se radicais livres que interagem com aminoácidos através de adição ou redução dos íons por oxidação<sup>246</sup>.

Os efeitos diretos da radiação surgem das interações de modo direto entre a radiação ionizante e as macromoléculas, em que outras moléculas não exercem nenhuma função nesses efeitos. Quando comparada aos efeitos indiretos, a ação direta sobre moléculas em solução é quantitativamente insignificante<sup>247</sup>.

Após a irradiação de moléculas em solução, os radicais livres produzidos reagem de forma muito eficiente com as proteínas, favorecendo modificações tais como dimerização e fragmentação<sup>248</sup>. Após a geração dos radicais livres, em uma solução altamente dinâmica e concentrada, os aminoácidos expostos a solventes são mais propensos a serem oxidados por radical hidroxila<sup>233</sup>. Desta forma, os efeitos biológicos da radiação ionizante em proteínas resultam em oxidação de aminoácidos, clivagem oxidativa do esqueleto proteico e modificação das cadeias laterais dos aminoácidos<sup>249</sup>.

A análise por espectrometria de massa comprovou que a radiação ionizante promoveu fragmentação e degradação progressiva de peptídeos conforme o aumento da dose e com maior efetividade a partir da dose de 5 kGy. Houve maior estabilidade nas doses de 1 kGy e 3 kGy em que possivelmente a degradação foi menor. Ensaios realizados com angiotensina II apontaram para resultados similares em que houve uma diminuição de forma não linear na quantidade à medida que a dose de radiação gama aumenta<sup>250</sup>. Em um estudo feito com diferentes peptídeos, Vieira et al.<sup>251</sup> avaliaram o efeito de espécies reativas de radicais gerados pela radiólise da água nessas moléculas, na qual também detectaram degradação progressiva não linear dos peptídeos investigados. Essa degradação e fragmentação pode ter ocorrido principalmente pela formação de radicais livres presentes na amostra, já que as proteínas são os principais alvos dos radicais nos sistemas biológicos devido a sua abundância e alta taxa de reação, esses radicais altamente reativos, provocam danos em vários locais dos aminoácidos resultando no aumento da hidrofilicidade da cadeia lateral, fragmentação, agregação por interligação covalente ou interação hidrofóbica, desdobramento da proteína e alteração em sua conformação<sup>252</sup>. A análise proteômica também contribuiu para a identificação de algumas das diferentes massas moleculares observadas no SDS Page, o que confirmou a presença de outros peptídeos do Clostridium tetani além

dos peptídeos da toxina tetânica. Baar *et al.*<sup>253</sup> ao realizar a caracterização do sobrenatante lisado do meio de cultura do *Clostridium tetani* também notaram a grande variedade de proteínas mesmo submetendo a amostra a filtração por um filtro de 100 kDa.

Os resultados obtidos por ELISA confirmaram que os anticorpos IgG específicos anti-toxina tetânica foram capazes de reconhecer os antígenos irradiados a diferentes doses, embora tenha ocorrido diferença significativa em todas as doses no reconhecimento dos epítopos antigênicos das proteínas quando comparadas às proteínas nativa. Apesar das modificações estruturais provocadas pelo processo de radiação, foi possível observar o reconhecimento de anticorpos anti-TeNT frente às toxinas irradiadas nas diferentes doses, com queda gradual em proporção ao aumento da dose, mas permanecendo com níveis satisfatórios até a maior dose.

O ensaio por *Western Blot* proporcionou observar a reatividade dos anticorpos apenas pelos epítopos antigênicos da toxina tetânica já que as proteínas foram separadas previamente por SDS Page. Assim como observado nos ensaios por ELISA, o reconhecimento dos anticorpos pela toxina diminuiu gradualmente conforme o aumento da dose, confirmando ter apresentado mudanças estruturais e destruição conformacional nos epítopos antigênicos dos dois polipeptídeos, já que os anticorpos reconheceram os epítopos duas cadeias da toxina. Teste de antigenicidade da toxina tetânica tratada com formaldeído para a sua destoxificação também foi realizado por Metz *et al.*<sup>169</sup> e mostraram resultados parecidos. Isso pode ter ocorrido devido às modificações estruturais em epítopos específicos na molécula da toxina. Experimentos realizados com α-lactoalbumina bovina irradiada demonstraram que as propriedades de ligação a IgE diminuíram gradualmente com o aumento da dose em até 10 kGy<sup>254</sup>. Resultados similares também foram encontrados em crotoxina<sup>255</sup> e extrato total de proteínas de *Toxoplasma gondii*<sup>256</sup>

em que esses antígenos mostram propriedades antigênicas e imunológicas conservadas após o processo de radiação.

O teste de atividade enzimática demonstrou atenuação da atividade da toxina tetânica à medida que a dose de radiação aumenta, com exceção da dose de 3 kGy que teve a menor atividade residual. Provavelmente, a diminuição da atividade nesta alíquota teve contribuição de fatores ambientais como a degradação da amostra, o que colaborou para essa queda juntamente com a dose de radiação absorvida.

Os resultados obtidos a partir desta análise estão de acordo com estudos anteriores que demonstram a atenuação da atividade enzimática pela radiação como, por exemplo, a perda de 52% da atividade enzimática do veneno total da serpente *Echis coloratus* irradiado a 3 kGy<sup>257</sup> e a atenuação dos venenos de *Cerastes cerastes* e *Vípera lebetina* irradiados a 2 kGy<sup>258</sup>.

A perda da atividade enzimática demonstrou que a radiação agiu na toxina tetânica, isso poderia ser explicado pelos efeitos diretos e indiretos da radiação causando fragmentação do sítio ativo, fragmentações nos aminoácidos e modificações nas estruturas secundárias, o que sugere que alguns fragmentos conservam sua atividade de forma parcial ou totalmente, enquanto algumas proteínas perderam a sua atividade permanecendo com a massa molecular intacta<sup>259</sup>.

Embora a radiação gama tenha causado os mesmos efeitos nesses experimentos, a dose de radiação utilizada é inferior à nossa, mostrando certa resistência por parte da toxina tetânica à radiação, que mesmo na dose de 8 kGy a toxina permaneceu com 65% de atividade residual. Tal resistência pode ter sido proporcionada por algum tipo de proteção contida no meio de cultura da amostra, como a presença de algumas substâncias antioxidantes. Segundo Fratelli, o meio de cultura IB produzido no Instituto Butantan para a produção da toxina tetânica é

composto por glicose, N Z-Case TT®, NaCI (cloreto de sódio), MgSO<sub>4</sub> (sulfato de magnésio), vitamina B12, ácido nicotínico, L-cistina, biotina, cloridrato de tiamina, riboflavina, cloridrato de piridoxina, pantotenato de cálcio, uracila e FeCI<sub>3</sub> .6H<sub>2</sub>O (cloreto férrico)<sup>260</sup>. Há evidências na literatura em que algumas vitaminas do complexo B tem desempenhado papel antioxidante, e algumas destas estão presentes no meio de cultura utilizado: a piridoxina (vitamina B6)<sup>261</sup>, a tiamina (vitamina B1)<sup>262,263</sup> e riboflavina (vitamina B2)<sup>264</sup>. O sulfato de magnésio, também presente no meio de cultura, foi descrito na literatura como um poderoso antioxidante que forma complexos com o radical hidroxila afetando a disponibilidade deste radical<sup>265,266</sup>. Outro fato que pode ter contribuído para a resistência da toxina perante a radiação, é a presença de outras proteínas, conferindo proteção mútua e competição pelos radicais formados pela ação indireta da radiação.

Por outro lado, estudo com enterotoxina de *Salmonella entérica* var *Typhimurium* parcialmente purificada, demonstrou inativação completa em um intervalo de dose de 25 kGy e 80 kGy mas permaneceu com uma ligeira enterotoxicidade na dose de 10 kGy, o que sugere que algumas proteínas podem precisar de doses mais elevadas para a atenuação de sua atividade<sup>267</sup>.

Diante desses resultados, optamos por não realizar o teste de potencial imunogênico da toxina tetânica irradiada, levando em consideração que todas as amostras irradiadas permaneceram com mais de 50% de atividade e o valor de concentração da dose letal da toxina tetânica é de 1 ng/Kg. Fica clara a necessidade de submeter a toxina á doses mais elevadas para ser considerada segura para a inoculação nos camundongos, evitando assim, alta mortalidade dos animais. No entanto, isso não será possível devido à falta de toxina tetânica em nosso laboratório e a indisponibilidade do fornecimento por parte do Instituto Butantan em que a linha de produção de vacinas anaeróbias encontra-se em reforma. Compreender o mecanismo de resistência da toxina tetânica à radiação

também se torna um ponto importante para estudos posteriores com proteínas resistentes a raios gama. Ainda que a toxina tetânica tenha permanecido com atividade enzimática acima de 50%, os dados sugerem a possibilidade de inativação em doses mais elevadas e o uso da radiação ionizante como método alternativo de destoxificação da toxina tetânica para o uso como imunógeno. O uso da radiação ionizante também contribuirá para a melhoria do processo de produção, otimizando o tempo de incubação para destoxificação, redução dos resíduos químicos resultante do processo e a possibilidade de elaborar uma vacina sem a necessidade de adjuvante.

#### 6 Conclusão

#### 6.1 Geral:

a) Os dados produzidos neste trabalho sugerem que a irradiação da toxina tetânica por raios gama de Cobalto 60, em diferentes doses, alterou a estrutura molecular conforme o aumento da dose, mantendo sua capacidade antigênica, porém não apresentando eficiência satisfatória na perda da atividade enzimática.

### 6.2 Específicas:

- a) A toxina tetânica, após ser submetida a radiação gama por Cobalto 60, apresentou modificações estruturais, proporcionalmente com o aumento da dose;
- b) Em todas as doses analisadas, foi possível observar a manutenção dos epítopos antigênicos, com reconhecimento por imunoglobulinas IgG anti-TeNT;
- c) A atividade enzimática demonstrou-se pouco comprometida mesmo após as maiores doses de radiação empregadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. Pagliuca LMF, Feitoza AR, Feijão AR. Tétano na população geriátrica: Problemática da saúde coletiva? Rev Latino-am Enferm. 2001;9(6):69–75.
- 2. Thwaites CL. Tetanus. Curr Anaesth Crit Care. 2005;16(1):50–7.
- 3. Silva AT, Fuentes MS, Rebeca R, Mayoral M, Mayorga C, Blanca M. Reacção anafilática ao toxóide tetânico. Rev Port Imunoalergologia. 2005;13(1):89–93.
- 4. Adams E, Laurence D, Smith J. Tetanus. Gt Britain Blackwell Sci Publ. 1969;1–5.
- 5. Hernández-Chavarría F, Chaves F, Freer E. *Clostridium tetani*, tétanos e su frecuencia en Costa Rica. Rev Costarric Cienc Med. 2000;21(3):191–202.
- 6. Dopter C, Sacquépee E. Precis de Bacteriolie. Libr JB. 1927;557–781.
- 7. Mallick IH, Winslet MC. A Review of the epidemiology, pathogenesis and management of tetanus. Int J Surg. 2004;2(2):109–12.
- 8. Tavares W. Contaminação do solo do estado do Rio de Janeiro pelo *Clostridium tetani*: Contribuição ao conhecimento da distribuição natural do bacilo tetânico [Tese]. Rio de Janeiro: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1975.
- 9. Tizzoni G, Cattani G. Uber das tetanusgift. Zentralbl Bakt. 1890;8:69–73.
- 10. Calvo AC, Oliván S, Manzano R, Zaragoza P, Aguilera J, Osta R. Fragment C of tetanus toxin: new insights into its neuronal signaling pathway. Int J Mol Sci. 2012;13(6):6883–901.
- 11. Sherrington CS. On reciprocal innervation of antagonistic muscles. R Soc Publ. 1905;76(509):269–97.
- 12. Bier OG. Técnicas Imunológicas. In: Bacteriologia e imunologia em suas aplicações à medicina e à higiene. 19 ed. São Paulo: Edições Melhoramentos; 1978. p. 870–918.
- 13. Ramon G. Sur ia toxine et sur fanatoxine diphtériques. Ann Inst Pasteur. 1924;38:1–10.
- 14. Simonsen O. Vaccination against tetanus and diphtheria. Evaluations of immunity in the Danish population, guidelines for revaccination, and methods for control of vaccination programs. Dan Med Bull. 1989;36(1):24–47.
- 15. Acheson GH, Ratnoff OD, Schoenbach EB. The localized action on the spinal cord of intramuscularly injected tetanus toxin. J Exp Med. 1942;75(5):465–80.
- 16. Eisel U, Jarausch W, Goretzki K, Henschen A, Engels J, Weller U, et al. Tetanus toxin: primary structure, expression in *E. coli*, and homology with botulinum toxins. EMBO J. 1986;5(10):2495–502.
- 17. Schiavo G, Poulain B, Rossetto O, Benfenati F, Tauc L, Montecucco C. Tetanus toxin is a zinc protein and its inhibition of neurotransmitter release and protease activity depend on zinc. EMBO J. 1992;11(10):3577–83.
- 18. Humeau Y, Doussau F, Grant NJ, Poulain B. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. Biochimie. 2000;82(5):427–46.

- 19. Francis JW, Figueiredo D, VanderSpek JC, Ayala LM, Kim YS, Remington MP, et al. A survival motor neuron:tetanus toxin fragment C fusion protein for the targeted delivery of SMN protein to neurons. Brain Res. 2004;995(1):84–96.
- 20. Bercsenyi K, Schmieg N, Bryson JB, Wallace M, Caccin P, Golding M, et al. Tetanus toxin entry. Nidogens are therapeutic targets for the prevention of tetanus. Science. 2014;346(6213):1118–23.
- 21. Fröschle B, Messelhäusser U, Höller C, Lebuhn M. Fate of *Clostridium botulinum* and incidence of pathogenic clostridia in biogas processes. J Appl Microbiol. 2015;119(4):936–47.
- 22. Dupuy B, Matamouros S. Regulation of toxin and bacteriocin synthesis in Clostridium species by a new subgroup of RNA polymerase  $\sigma$ -factors. Res Microbiol. 2006;157(3):201–5.
- 23. Ganesh M, Sheikh NK, Shah P, Mehetre G, Dharne MS, Nagoba BS. Detection of *Clostridium tetani* in human clinical samples using tetX specific primers targeting the neurotoxin. J Infect Public Health. 2016;9(1):105–9.
- 24. Muñoz-Gómez SA, Roger AJ. Leaving negative ancestors behind. Elife. 2016;5:1–5.
- 25. Prescott JF, MacInnes JI, Wu AKK. Taxonomic relationships among the Clostridia. In: Uzal FA, Songer JG, Prescott JF, Popoff MR, editores. Clostridial Diseases of Animals. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc; 2016. p. 3–5.
- 26. Gomes AP, Freitas BAC de, Rodrigues DC, Silveira GL da, Tavares W, Siqueira-Batista R. Infecção por *Clostridium tetani* no recém-nascido: revisão sobre o tétano neonatorum. Rev Bras Ter Intensiva. 2011;23(4):484–91.
- 27. Veronesi R, Focaccia R. Tétano. In: Tratado de infectologia. 2ª edição. São Paulo: Atheneu: 2002.
- 28. Thwaites CL. Tetanus. Pract Neurol. 2002;3:130–7.
- 29. Brüggemann H, Brzuszkiewicz E, Chapeton-Montes D, Plourde L, Speck D. Genomics of *Clostridium tetani*. Res Microbiol. 2015;166(4):326–31.
- 30. Abid F. Picture of *Clostridium tetani* [Internet]. 2016. [Acessado em 12 de junho de 2019]. Disponível em: https://www.quora.com/Why-does-a-rusty-nail-cause-tetanus
- 31. Bisset KA. The sporulation of *Clostridium tetani*. J Gen Microbiol. 1950;4(1):1–3.
- 32. Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. Physiol Rev. 2000;80(2):717–66.
- 33. Brook I. Current concepts in the management of *Clostridium tetani* infection. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008;6(3):327–36.
- 34. Almeida ACS, Ribeiro MG, Paes AC, Megid J, Oliveira VB, Franco MMJ. Tétano em pequenos ruminantes: estudo retrospectivo dos principais achados clínico-epidemiológicos em 11 casos. Arq Bras Med Veterinária e Zootec. 2012;64(4):1060–4.
- 35. Bruggemann H, Bauer R, Raffestin S, Gottschalk G. Characterization of a heme oxygenase of *Clostridium tetani* and its possible role in oxygen tolerance. Arch Microbiol. 2004;182(2–3):259–63.

- 36. Bhatia R, Prabhakar S, Grover VK. Tetanus. Neurol India. 2002;50(4):398–407.
- 37. Verma R, Khanna P. Tetanus toxoid vaccine: Elimination of neonatal tetanus in selected states of India. Hum Vaccin Immunother. 2012;8(10):1439–42.
- 38. Brook I. *Clostridium tetani*. In: Long SS, Prober CG, Fischer M, editores. Principles and practice of pediatric infectious diseases. 5<sup>a</sup> ed. Elsevier; 2018. p. 995–999.
- 39. Plourde-Owobi L, Seguin D, Baudin M-A, Moste C, Rokbi B. Molecular characterization of *Clostridium tetani* strains by pulsed-field gel electrophoresis and colony PCR. Appl Environ Microbiol. 2005;71(9):5604–6.
- 40. Connan C, Denève C, Mazuet C, Popoff MR. Regulation of toxin synthesis in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*. Toxicon. 2013;75:90–100.
- 41. Enany S. Structural and functional analysis of hypothetical and conserved proteins of *Clostridium tetani*. J Infect Public Health. 2014;7(4):296–307.
- 42. Brüggemann H. Genomics of clostridial pathogens: implication of extrachromosomal elements in pathogenicity. Curr Opin Microbiol. 2005;8(5):601–5.
- 43. Bae C, Bourget D. Tetanus. StatPearls. StatPearls Publishing; 2019.
- 44. Ahaduzzaman M. Updates on tetanus toxin: a fundamental approach. Vet Anim Res. 2015;2(1):23–9.
- 45. Sutili FJ, Farias LDA, Kowalski AP, Gressler LT, Vargas APC de. Diagnóstico de toxina tetânica em rebanho bovino e determinação da dl 50. In: 38° Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. Rev Ciências Agroveterinárias. 2011;
- 46. Farrar JJ, Yen LM, Cook T, Fairweather N, Binh N, Parry J, et al. Tetanus. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2000;69(3):292–301.
- 47. Goonetilleke A, Harris JB. Clostridial neurotoxins. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2004;75(3):35–9.
- 48. Bleck TP, Brauner JS. Tetanus. In: Scheld WM, Whitley R, Durack DT, editores. Infections of central nervous system. 2<sup>a</sup> ed. New York: Lippincott-Raven; 1997. p. 629–53.
- 49. Silva DM da. O tétano como doença de base para disfagia. Rev CEFAC. 2010;12(3):499–504.
- 50. Tavares W. Recentes avanços e necessidades de pesquisa em tétano. Rev Soc Bras Med Trop. 1978;12(1):39–43.
- 51. Brenner N, Butt J, Bomfim IL, Tabatabai J, Pawlita M, Schnitzler P, et al. Validation of monoplex assays detecting antibodies against *Corynebacterium diphtheriae* and *Clostridium tetani* toxins, rubella virus and parvovirus B19 for incorporation into Multiplex Serology. Methods. 2019;158:44–53.
- 52. Quevedo P de S. Clostridioses em ruminantes-Revisão. Rev Científica Med Veterinária. 2015;(25):1–2.
- 53. Valgaeren B, De Schutter P, Eeckhaut V, Boyen F, Immerrseel F Van, Deprez P. Thermic dehorning and ear tagging as atypical portals of entry of *Clostridium tetani* in ruminants. Vlaams Diergeneeskd Tijdschr. 2011;80(5):351–4.

- 54. Licona-Cassani C, Steen JA, Zaragoza NE, Moonen G, Moutafis G, Hodson MP, et al. Tetanus toxin production is triggered by the transition from amino acid consumption to peptides. Anaerobe. 2016;41:113–24.
- 55. Huh DH, Han SB, Shin HJ, Ahn DH, Choi GS, Kang KR, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a newly developed tri-component diphtheria, tetanus, and acellular pertussis vaccine in a murine model. J Microbiol Immunol Infect. 2018;51(6):732–9.
- 56. Cohen JE, Wang R, Shen R-F, Wu WW, Keller JE. Comparative pathogenomics of *Clostridium tetani*. PLoS One. 2017;12(8):1–24.
- 57. Secretaria Municipal da Saúde. Acidentes por animais peçonhentos, 1998 a 2014. Relatório epidemiológico. Serviço de Vigilância Epidemiológica. 2015;1–23.
- 58. Chaves PF, Rocha S de Ia, Dutra A, Yunes JS. Ocorrência de cianobactérias produtoras de toxinas no rio dos sinos (RN) entre os anos de 2005 e 2008. Oecologia Bras. 2009;13(2):319–318.
- 59. Pucca MB, Cerni FA, Pinheiro Junior EL, Bordon K de CF, Amorim FG, Cordeiro FA, et al. *Tityus serrulatus* venom A lethal cocktail. Toxicon. 2015;108:272–84.
- 60. Buch DR, Souza FN, Meissner GO, Morgon AM, Gremski LH, Ferrer VP, et al. Brown spider (Loxosceles genus) venom toxins: Evaluation of biological conservation by immune cross-reactivity. Toxicon. 2015;108:154–66.
- 61. Lee W-R, Kim K-H, An H-J, Kim J-Y, Lee S-J, Han S-M, et al. Apamin inhibits hepatic fibrosis through suppression of transforming growth factor β1-induced hepatocyte epithelial–mesenchymal transition. Biochem Biophys Res Commun. 2014;450(1):195–201.
- 62. Koh DCI, Armugam A, Jeyaseelan K. Snake venom components and their applications in biomedicine. Cell Mol Life Sci. 2006;63(24):3030–41.
- Souza CS. Infecções de tecidos moles: Erisipela. Celulite. Síndromes infecciosas mediadas por toxinas. Med (Ribeirao Preto Online). 2003;36:351–6.
- 64. Grandel U, Grimminger F. Endothelial responses to bacterial toxins in sepsis. Crit Rev Immunol. 2003;23(4):267–99.
- 65. Lubran MM. Bacterial toxins. Ann Clin Lab Sci. 1988;18(1):58–71.
- 66. Fleck CA. Differentiating MMPs, biofilm, endotoxins, exotoxins, and cytokines. Adv Skin Wound Care. 2006;19(2):77–81.
- 67. Ovington L. Bacterial toxins and wound healing. Ostomy Wound Manage. 2003 Jul;49(7A):8–12.
- 68. Lobato FCF, Salvarani FM, Gonçalves LA, Pires P, Silva R, Alves G, et al. Clostridioses dos animais de produção. Veterinária e Zootec. 2013;20:29–48.
- 69. Oviedo-Socarrás T, Cardona-Ávarez J, Oviedo-Pastrana M. Tétano en Cebus capucinus en cautiverio: reporte de caso. Rev UDCA Actual Divulg Científica. 2016;19(2):489–92.
- 70. Lobato FCF, Salvarani FM, De Assis RA. Clostridioses dos pequenos ruminantes Clostridiosis of small ruminants. Rev Port Ciências Veterinárias. 2007;102(561):23–34.
- 71. Lisboa T, Ho Y-L, Henriques Filho GT, Brauner JS, Valiatti JL dos S, Verdeal

- JC, et al. Diretrizes para o manejo do tétano acidental em pacientes adultos. Rev Bras Ter Intensiva. 2011;23(4):394–409.
- 72. Mahajan R, Kumar A, Singh S. General anesthesia in tetanus patient undergoing emergency surgery: A challenge for anesthesiologist. Anesth Essays Res. 2014;8(1):96–8.
- 73. Caleo M, Schiavo G. Central effects of tetanus and botulinum neurotoxins. Toxicon. 2009;54(5):593–9.
- 74. Hassel B. Tetanus: pathophysiology, treatment, and the possibility of using botulinum toxin against tetanus-induced rigidity and spasms. Toxins (Basel). 2013;5(1):73–83.
- 75. Bruggemann H, Baumer S, Fricke WF, Wiezer A, Liesegang H, Decker I, et al. The genome sequence of *Clostridium tetani*, the causative agent of tetanus disease. Proc Natl Acad Sci. 2003;100(3):1316–21.
- 76. Hernandes Leira M, Pereira De Oliveira M, Reghim LS, Peters AP, Pereira L, De Almeida S, et al. Tétano em um equino: Relato de caso. Med Veterinária e Zootec. 2017;11(1):50–4.
- 77. Zuverink M, Barbieri JT. Protein toxins that utilize gangliosides as host receptors. In: Progress in Molecular Biology and Translational Science. 156<sup>a</sup> ed. Science Direct; 2018. p. 325–54.
- 78. Rossetto O, Scorzeto M, Megighian A, Montecucco C. Tetanus neurotoxin. Toxicon. 2013:66:59–63.
- 79. AAT Bioquest. Calculate peptide and protein molecular weigh [Internet]. 2019. [Acessado em 15 de junho de 2019]. Disponível em: https://www.aatbio.com/tools/calculate-peptide-and-protein-molecular-weight-mw/
- 80. UniProt. Tetanus toxin [Internet]. 2019. [Acessado em 15 de junho de 2019]. Disponível em://www.uniprot.org/uniprot/P04958
- 81. Blum FC, Tepp WH, Johnson EA, Barbieri JT. Multiple domains of tetanus toxin direct entry into primary neurons. Traffic. 2014;15(10):1057–65.
- 82. Breidenbach MA, Brunger AT. A Crystal structure of tetanus neurotoxin light chain. Biochemistry. 2005;44(20):7450–7.
- 83. Rao KN, Kumaran D, Binz T, Swaminathan S. Structural analysis of the catalytic domain of tetanus neurotoxin. Toxicon. 2005;45(7):929–39.
- 84. Zuverink M, Chen C, Przedpelski A, Blum FC, Barbieri JT. A heterologous reporter defines the role of the tetanus toxin interchain disulfide in light-chain translocation. Infect Immun. 2015;83(7):2714–24.
- 85. Yousefi M, Khosravi-Eghbal R, Reza Mahmoudi A, Jeddi-Tehrani M, Rabbani H, Shokri F. Comparative in vitro and in vivo assessment of toxin neutralization by anti-tetanus toxin monoclonal antibodies. Hum Vaccin Immunother. 2014;10(2):344–51.
- 86. Fotinou C, Emsley P, Black I, Ando H, Ishida H, Kiso M, et al. The crystal structure of tetanus toxin Hc fragment complexed with a synthetic GT1b analogue suggests cross-linking between ganglioside receptors and the toxin. J Biol Chem. 2001;276(34):32274–81.
- 87. Chen C, Fu Z, Kim J-JP, Barbieri JT, Baldwin MR. Gangliosides as high affinity receptors for tetanus neurotoxin. J Biol Chem. 2009;284(39):26569–

77.

- 88. Von Kossel K, Ferreira R, Marinho L, Castro L, Nigro A, Montero E. Gangliosideos estudo do colágeno e da resposta inflamatória no processo cicatricial. Acta Cir Bras. 2000;15(1):16–9.
- 89. Schnaar RL. Gangliosides of the vertebrate nervous system. J Mol Biol. 2016 Aug 14;428(16):3325–36.
- Surana S, Tosolini AP, Meyer IFG, Fellows AD, Novoselov SS, Schiavo G. The travel diaries of tetanus and botulinum neurotoxins. Toxicon. 2018;147:58–67.
- 91. Behrensdorf-Nicol H, Weisser K, Krämer B. "BINACLE" assay for in vitro detection of active tetanus neurotoxin in toxoids. Altern to Anim Exp. 2015;32(2):137–42.
- 92. Burns JR, Baldwin MR. Tetanus neurotoxin utilizes two sequential membrane interactions for channel formation. J Biol Chem. 2014;289(32):22450–8.
- 93. Bercsenyi K, Giribaldi F, Schiavo G. The elusive compass of clostridial neurotoxins: deciding when and where to go? Curr Top Microbiol Immunol. 2013;364:91–113.
- 94. Masuyer G, Conrad J, Stenmark P. The structure of the tetanus toxin reveals pH-mediated domain dynamics. EMBO Rep. 2017;18(8):1306–17.
- 95. Blum FC, Chen C, Kroken AR, Barbieri JT. Tetanus toxin and botulinum toxin a utilize unique mechanisms to enter neurons of the central nervous system. Bliska JB, editor. Infect Immun. 2012;80(5):1662–9.
- 96. Bomba-Warczak E, Vevea JD, Brittain JM, Figueroa-Bernier A, Tepp WH, Johnson EA, et al. Interneuronal transfer and distal action of tetanus toxin and botulinum neurotoxins A and D in central neurons. Cell Rep. 2016;16(7):1974–87.
- 97. Pirazzini M, Azarnia Tehran D, Leka O, Zanetti G, Rossetto O, Montecucco C. On the translocation of botulinum and tetanus neurotoxins across the membrane of acidic intracellular compartments. Biochim Biophys Acta. 2016;1858(3):467–74.
- 98. Pérez-Sayáns M, Suárez-Peñaranda J, Barros-Angueira F, Diz P, Gándara-Rey J, García-García A. An update in the structure, function, and regulation of V-ATPases: the role of the C subunit. Brazilian J Biol. 2012;72(1):189–98.
- 99. Pirazzini M, Rossetto O, Bolognese P, Shone CC, Montecucco C. Double anchorage to the membrane and intact inter-chain disulfide bond are required for the low pH induced entry of tetanus and botulinum neurotoxins into neurons. Cell Microbiol. 2011;13(11):1731–43.
- 100. Pirazzini M, Bordin F, Rossetto O, Shone CC, Binz T, Montecucco C. The thioredoxin reductase-thioredoxin system is involved in the entry of tetanus and botulinum neurotoxins in the cytosol of nerve terminals. FEBS Lett. 2013;587(2):150–5.
- 101. Pirazzini M, Azarnia Tehran D, Zanetti G, Rossetto O, Montecucco C. Hsp90 and Thioredoxin-Thioredoxin Reductase enable the catalytic activity of Clostridial neurotoxins inside nerve terminals. Toxicon. 2018;147:32–7.
- 102. Pirazzini M, Rossetto O, Bertasio C, Bordin F, Shone CC, Binz T, et al. Time course and temperature dependence of the membrane translocation of tetanus and botulinum neurotoxins C and D in neurons. Biochem Biophys

- Res Commun. 2013;430(1):38-42.
- 103. Colhado OCG, Boeing M, Ortega LB. Toxina botulínica no tratamento da dor. Rev Bras Anestesiol. 2009;59(3):366–81.
- 104. Linial M. SNARE Proteins From Membranes to Genomes. Curr Genomics. 2001;2(4):337–47.
- 105. Shin O-H. Exocytosis and synaptic vesicle function. Compr Physiol. 2014;4(1):149–75.
- 106. Vardjan N, Jorgačevski J, Zorec R. Fusion Pores, SNAREs, and Exocytosis. Neurosci. 2013;19(2):160–74.
- 107. Wang Y, Tang BL. SNAREs in neurons beyond synaptic vesicle exocytosis (Review). Mol Membr Biol. 2006;23(5):377–84.
- 108. Zhou Q, Zhou P, Wang AL, Wu D, Zhao M, Südhof TC, et al. The primed SNARE-complexin-synaptotagmin complex for neuronal exocytosis. Nature. 2017;548(7668):420–5.
- 109. Shon MJ, Kim H, Yoon T-Y. Focused clamping of a single neuronal SNARE complex by complexin under high mechanical tension. Nat Commun. 2018;9(1):1–12.
- 110. Silm K, Edwards RH. One cycle fuels another: The energetics of neurotransmitter release. Neuron. 2017;93(3):470–2.
- 111. Stock I. Tetanus and *Clostridium tetani*-a brief review. Med Monatsschr Pharm. 2015;38(2):57–60.
- 112. Connan C, Popoff MR. Uptake of clostridial neurotoxins into cells and dissemination. Curr Top Microbiol Immunol. 2017;406:39–78.
- 113. Zucker RS, Kaeser PS. Release of neurotransmitters. In: Byrne JH, Heidelberger R, Waxham MN, editores. From molecules to networks An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience. 3ª ed. Elsevier; 2014. p. 443–8.
- 114. Vollman KE, Acquisto NM, Bodkin RP. A case of tetanus infection in an adult with a protective tetanus antibody level. Am J Emerg Med. 2014;32(4):392.e3-4.
- 115. Rhee P, Nunley MK, Demetriades D, Velmahos G, Doucet JJ. Tetanus and trauma: a review and recommendations. J Trauma. 2005;58(5):1082–8.
- 116. Khakheli MS, Khuhro BA, Jamali AH. Tetanus: still a killer in adults. Anaesth, Pain Intensive Care. 2013;17(2):149–53.
- 117. Hsu SS, Groleau G. Tetanus in the emergency department: a current review. J Emerg Med. 2001;20(4):357–65.
- 118. Novac RT, Thomas CG. Tetanus. In: CDC health information for international travel: the yellow book. [Internet]. Atlanta: Oxford University Press; 2012 [Acessado em 10 de junho de 2019]. 303 p. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=5vCQpr1WTS8C&pg=PA303&lpg=PA303&dq=Tetanus+in:+CDC+health+information+for+the+international+travel: +2012.&source=bl&ots=ORO04G3MCV&sig=ACfU3U3RjaIGKsBQK\_l8HMoXUTkkWHsxkA&hl=pt-BR&sa=X&ved=2ahUKEwjeosmOneDiAhX3JLkGHVJWC
- 119. Kotani Y, Kubo K, Otsu S, Tsujimoto T. Cephalic tetanus as a differential diagnosis of facial nerve palsy. BMJ Case Rep. 2017;1–3.

- 120. Ghiya R, Das B, Ghosh I. A0038 A rare case of cephalic tetanus: Diagnostic dilemma. In: Journal of Neuroanaesthesiology and Critical Care. 2019. p. S6.
- 121. Finkelstein P, Teisch L, Allen CJ, Ruiz G. Tetanus: A potential public health threat in times of disaster. Prehosp Disaster Med. 2017;32(3):339–42.
- 122. Health World Organization. Tetanus [Internet]. NEWSROOM. 2018. [Acessado em 10 de junho de 2019]. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tetanus
- 123. Pérez-Jacoiste Asín MA, Langbazounga M. Neonatal tetanus in an African newborn. Int J Infect Dis. 2018;67:1–2.
- 124. Poudel P, Budhathoki S, Manandhar S. Tetanus. Kathmandu Univ Med J (KUMJ). 2009;7(27):315–22.
- 125. Thwaites CL, Beeching NJ, Newton CR. Maternal and neonatal tetanus. Lancet. 2015;385(9965):362–70.
- 126. Guardiola A, Teixeira AM, Silva CA da, Grisólia JRG, Prates LZ, Schermann MTMT, et al. Tétano neonatal. J Pediatr (Rio J). 2000;76(5):391–4.
- 127. Burgess C, Gasse F, Steinglass R, Yakubu A, Raza AA, Johansen K. Eliminating maternal and neonatal tetanus and closing the immunity gap. Lancet (London, England). 2017;389(10077):1380–1.
- 128. Yen LM, Thwaites CL. Tetanus. Lancet. 2019 Apr 20;393(10181):1657-68.
- 129. Moraes EN, Pedroso ÊRP. Tétano no Brasil: doença do idoso? Rev Soc Bras Med Trop. 2000;33(3):271–5.
- 130. Thwaites CL, Yen LM, Nga NTN, Parry J, Binh NT, Loan HT, et al. Impact of improved vaccination programme and intensive care facilities on incidence and outcome of tetanus in southern Vietnam, 1993-2002. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2004 Nov;98(11):671–7.
- 131. Gouveia PA da C, Silva CEF, Miranda Filho D de B, Bernardino SN, Escarião AG, Ximenes RA de A. Tendência temporal do tétano acidental no período de 1981 a 2004 em Pernambuco com avaliação do impacto da assistência em unidade de terapia intensiva sobre a letalidade. Rev Soc Bras Med Trop. 2009;42(1):54–7.
- 132. Nakae H, Saito Y, Okuyama M, Igarashi T. A case of tetanus treated with Kampo medicines such as Kakkonto and Shakuyakukanzoto. Acute Med Surg. 2017;4(2):217–20.
- 133. Collins S, Amirthalingam G, Beeching NJ, Chand MA, Godbole G, Ramsay ME, et al. Current epidemiology of tetanus in England, 2001-2014. Epidemiol Infect. 2016;144(16):3343–53.
- 134. Nóbrega MVD da, Reis RC, Aguiar ICV, Queiroz TV, Lima ACF, Pereira EDB, et al. Patients with severe accidental tetanus admitted to an intensive care unit in Northeastern Brazil: clinical—epidemiological profile and risk factors for mortality. Brazilian J Infect Dis. 2016;20(5):457–61.
- 135. Woldeamanuel YW, Andemeskel AT, Kyei K, Woldeamanuel MW, Woldeamanuel W. Case fatality of adult tetanus in Africa: Systematic review and meta-analysis. J Neurol Sci. 2016;368:292–9.
- 136. Whitman C, Belgharbi L, Gasse F, Torel C, Mattei V, Zoffmann H. Progress towards the global elimination of neonatal tetanus. World Health Stat Q. 1992;45(2–3):248–56.

- 137. Demicheli V, Barale A, Rivetti A. Vaccines for women to prevent neonatal tetanus. In: Cochrane Database of Systematic Reviews. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. p. 1–37.
- 138. Nass SS, Danawi H, Cain L, Sharma M. Verification of neonatal tetanus surveillance systems in Katsina State, Nigeria. Heal Serv Res Manag Epidemiol. 2017;4:1–7.
- 139. Do Patrocínio Dias P, Ramos Ferrer S, Nunes Guerreiro HM. Tetanus an evaluation of epidemiologic data in Brazil. Brazilian J Med Hum Heal. 2014;2(1):26–9.
- 140. Brasil. Ministério da Saúde. Tabela de casos de Tétano Acidental. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2018 [Internet]. 2019. [Acessado em 10 de junho de 2019]. Disponível em: http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/tetano-acidental
- 141. Brasil. Ministério da Saúde. Tétano acidental casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação Brasil [Internet]. 2018. [Acessado em 10 de junho de 2019]. Disponível em: http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/tetacidbr.def
- 142. Brasil. Ministério da Saúde. Tabela de óbitos de Tétano Acidental. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1998 a 2018 [Internet]. 2018. [Acessado em 10 de junho de 2019]. Disponível em: http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/tetano-acidental
- 143. Brasil. Ministério da Saúde. Tabela de óbitos de Tétano Neonatal. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1998 a 2018 [Internet]. 2018. [Acessado em 10 de junho de 2019]. Disponível em: http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/tetano-neonatal
- 144. Oliveira LG de, Lopes MF da C, Tavares KB, Ferreira ENA, Mourão FC, Abreu A da S, et al. Epidemiologia do tétano neonatal no norte do Brasil entre os anos 2007 a 2017, Região Prioritária. Brazilian J Heal Rev. 2019;2(1):507–19.
- 145. Papadiochos I, Papadiochou S, Petsinis V, Goutzanis L, Atsali C, Papadogeorgaki N. Trismus as a clinical manifestation of tetanus: A Case Report. J Oral Facial Pain Headache. 2016 Oct [cited 2019;30(4):355–62.
- 146. Bernardes M, Lo Presti S, Ratzan K. A case of cephalic tetanus in an elderly patient with trismus. Case Rep Infect Dis. 2018;2018:1–3.
- 147. Coffey SS, Hollingsworth A. A 28-Year-Old Woman With Tetanus. J Emerg Nurs. 2019;45(2):197–9.
- 148. Brasil. Ministério da Saúde. Guia de vigilância em saúde. Volume único [Internet]. 1ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2016 [Acessado em 12 de junho de 2019]. 165-166 p. Disponível em: www.saude.gov.br/svs
- 149. Rhinesmith E, Fu L. Tetanus disease, treatment, management. Pediatr Rev. 2018;39(8):430–2.
- 150. Rodrigo C, Fernando D, Rajapakse S. Pharmacological management of tetanus: an evidence-based review. Crit Care. 2014;18(2):217.
- 151. Shanbag P, Mauskar A, Masavkar S. Intravenous magnesium sulphate infusion as first-line therapy in the control of spasms and muscular rigidity in childhood tetanus. Paediatr Int Child Health. 2018;1–7.
- 152. Loan HT, Yen LM, Kestelyn E, Hao N Van, Mai NTH, Thuy DB, et al. A pilot

- study to assess safety and feasibility of intrathecal immunoglobulin for the treatment of adults with tetanus. Am J Trop Med Hyg. 2018;99(2):323–6.
- 153. Wang H, Yu R, Fang T, Yu T, Chi X, Zhang X, et al. Tetanus neurotoxin neutralizing antibodies screened from a human immune scFv antibody phage display library. Toxins (Basel). 2016;8(9).
- 154. Aliprandini E, Takata DY, Lepique A, Kalil J, Boscardin SB, Moro AM. An oligoclonal combination of human monoclonal antibodies able to neutralize tetanus toxin in vivo. Toxicon X. 2019;2:1–11.
- 155. Mcelaney P, Iyanaga M, Monks S, Michelson E. The Quick and Dirty: A tetanus case report. Clin Pract cases Emerg Med. 2019;3(1):55–8.
- 156. Hanif H, Anjum A, Ali N, Jamal A, Imran M, Ahmad B, et al. Isolation and antibiogram of *Clostridium tetani* from clinically diagnosed tetanus patients. Am J Trop Med Hyg. 2015;93(4):752–6.
- 157. Borella-Venturini M, Frasson C, Paluan F, De Nuzzo D, Di Masi G, Giraldo M, et al. Tetanus vaccination, antibody persistence and decennial booster: a serosurvey of university students and at-risk workers. Epidemiol Infect. 2017;145(9):1757–62.
- 158. Thaysen-Andersen M, Jørgensen SB, Wilhelmsen ES, Petersen JW, Højrup P. Investigation of the detoxification mechanism of formaldehyde-treated tetanus toxin. Vaccine. 2007;25(12):2213–27.
- 159. World Health Organization. Relevé épidémiologique hebdomadaire. Wkly Epidemiol Rec. 2006;81(20):197–208.
- 160. Oliveira VC de, Guimarães EA de A, Oliveira VJ de, Guimarães IA, Almeida CS de, Silva CLL da. Situação vacinal contra o tétano em trabalhadores da Empresa Municipal de Obras Públicas do Município de Divinópolis, Estado de Minas Gerais, Brasil, 2009. Epidemiol e Serviços Saúde. 2012;21(3):497–504.
- 161. Ballalai I, Bravo F. Imunização: Tudo o que você sempre quis saber. Sociedade Brasileira de Imunizações, editor. Rio de Janeiro: RMCOM; 2016. 32-33 p.
- 162. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância Epidemiológica de Eventos Adversos Pós-Vacinação [Internet]. 3ª ed. Transmissíveis S deVigilância em SD de V de D, editores. Brasília: Minitério da Saúde; 2014. [Acessado em 12 de junho de 2019]. 254 p. Disponível em: http://editora.saude.gov.br
- 163. Nunes DM, Menezes FC de, Igansi CN, Araújo WN de, Segatto TCV, Costa KCC, et al. Inquérito da cobertura vacinal de tríplice bacteriana e tríplice viral e fatores associados à não vacinação em Santa Maria, Distrito Federal, Brasil, 2012. Rev Pan-Amazônica Saúde. 2018;9(1):9–17.
- 164. Secretaria de Vigilância em Saúde. Instrução normativa referente ao calendário nacional de vacinação [Internet]. 2019. [Acessado em 12 de junho de 2019]. Disponível em: http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/abril/24/Site-Instrucao-Normativa-Calendario-.pdf
- 165. Instituto Butantan. Vacina adsorvida difteria e tétano adulto (dT) Bula [Internet]. 2016. p. 3. [Acessado em 12 de junho de 2019]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransa cao=24865082016&pIdAnexo=4018773

- 166. Viegas SM da F, Sampaio F de C, Oliveira PP de, Lanza FM, Oliveira VC de, Santos WJ dos. A vacinação e o saber do adolescente: educação em saúde e ações para a imunoprevenção. Cien Saude Colet. 2019;24(2):351–60.
- 167. Verçosa RCM, Pereira T da S. Impacto da vacinação contra pertussis sobre os casos de coqueluche. Rev enferm UFPE line. 2017;11(9):3410–8.
- 168. Castro HWV de, Milagres BS. Perfil epidemiológico dos casos de coqueluche no Brasil de 2010 a 2014. Univ Ciências da Saúde. 2018;15(2):81–90.
- 169. Metz B, Tilstra W, van der Put R, Spruit N, van den Ijssel J, Robert J, et al. Physicochemical and immunochemical assays for monitoring consistent production of tetanus toxoid. Biologicals. 2013;41(4):231–7.
- Barbosa L do N, Silva RS da. Caso Clínico: psoríase desencadeada após vacinação anti-tetânica. Vol. 8, Revista Latinoamericana de Psoriasis y Artritis Psoriásica. 2013.
- 171. Aps LR de MM, Piantola MAF, Pereira SA, Castro JT de, Santos FA de O, Ferreira LCDS, et al. Eventos adversos de vacinas e as consequências da não vacinação: uma análise crítica. Rev Saude Publica. 2018;52:1–40.
- 172. Spencer JP, Trondsen Pawlowski RH, Thomas S. Vaccine adverse events: Separating myth from reality. Am Fam Physician. 2017;95(12):786–94.
- 173. Rappuoli R, Pizza M, Del Giudice G, De Gregorio E. Vaccines, new opportunities for a new society. Proc Natl Acad Sci. 2014;111(34):12288–93.
- 174. Alsarraf H, Dedic E, Bjerrum MJ, Østergaard O, Kristensen MP, Petersen JW, et al. Biophysical comparison of diphtheria and tetanus toxins with the formaldehyde-detoxified toxoids, the main components of diphtheria and tetanus vaccines. Virulence. 2017;8(8):1880–9.
- 175. Kay E, Cuccui J, Wren BW. Recent advances in the production of recombinant glycoconjugate vaccines. npj Vaccines. 2019;4(1):16.
- 176. Finco O, Rappuoli R. Designing vaccines for the twenty-first century society. Front Immunol. 2014;5:1–6.
- 177. Oliveira KC, Spencer PJ, Ferreira RS, Nascimento N. New insights into the structural characteristics of irradiated crotamine. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2015;21(14):1–10.
- 178. Jwa MY, Jeong S, Ko EB, Kim AR, Kim HY, Kim SK, et al. Gamma-irradiation of Streptococcus pneumoniae for the use as an immunogenic whole cell vaccine. J Microbiol. 2018;56(8):579–85.
- 179. Grosch DS, Hopwood LE. Biological effects of radiations. Academic Press; 1979. 338 p.
- 180. Lucena EA de, Reis RG dos, Pinho AS de, Silva JWS da, Alves AS, Rio MAP do, et al. Radiação ionizante, energia nuclear e proteção radiológica para a escola. Brazilian J Radiat Sci. 2017;5(1):1–17.
- 181. Desouky O, Ding N, Zhou G. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. J Radiat Res Appl Sci. 2015;8:247–54.
- Nascimento FJA, Bradshaw C. Direct and indirect effects of ionizing radiation on grazer-phytoplankton interactions. J Environ Radioact. 2016;155–156:63– 70.
- 183. Okuno E. Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia. Estud Avançados. 2013;27(77):185–200.

- 184. Silva AA da, Gonçalves RC. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. Ciência Rural. 2010;40(4):994–1002.
- 185. Kobayashi K. Pulse Radiolysis Studies for Mechanism in Biochemical Redox Reactions. Chem Rev. 2019;119(6):4413–62.
- 186. Flôr R de C, Kirchhof ALC. Uma prática educativa de sensibilização quanto à exposição a radiação ionizante com profissionais de saúde. Rev Bras Enferm. 2006;59(3):274–8.
- 187. Trojanowicz M, Bojanowska-Czajka A, Capodaglio AG. Can radiation chemistry supply a highly efficient AO(R)P process for organics removal from drinking and waste water? A review. Environ Sci Pollut Res Int. 2017;24(25):20187–208.
- 188. Azzam EI, Jay-Gerin J-P, Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. Cancer Lett. 2012;327(1–2):48–60.
- 189. Wales A, Kusel JR. Biochemistry of irradiated parasite vaccines: suggested models for their mode of action. Parasitol Today. 1992 Nov;8(11):358–63.
- 190. Lee S, Lee S, Song K Bin. Effect of gamma-irradiation on the physicochemical properties of porcine and bovine blood plasma proteins. Food Chem. 2003;82(4):521–6.
- Moon S, Song K Bin. Effect of γ-irradiation on the molecular properties of ovalbumin and ovomucoid and protection by ascorbic acid. Food Chem. 2001;74(4):479–83.
- 192. Sharapov MG, Novoselov VI, Gudkov S V. Radioprotective role of Peroxiredoxin 6. Antioxidants (Basel, Switzerland). 2019;8(1):1–23.
- Kovács K, He S, Mile V, Csay T, Takács E, Wojnárovits L. Ionizing radiation induced degradation of diuron in dilute aqueous solution. Chem Cent J. 2015;9:21.
- 194. Sá APN, Góes-Favoni SS, Giannoni JA, Arthur V, Villavicêncio ALC. Irradiation effect on lipid oxidation index on okarabased soybean flour. Brazilian J Radiat Sci. 2019;1–10.
- 195. Bojanowska-Czajka A, Kciuk G, Gumiela M, Borowiecka S, Nałęcz-Jawecki G, Koc A, et al. Analytical, toxicological and kinetic investigation of decomposition of the drug diclofenac in waters and wastes using gamma radiation. Environ Sci Pollut Res Int. 2015;22(24):20255–70.
- 196. Zhang S, Wang Q, Zhou C, Chen K, Chang H, Xiao W, et al. Colorectal cancer, radiotherapy and gut microbiota. Chinese J Cancer Res. 2019;31(1):212–22.
- 197. Ronsini GH, Colenci R. Importância da irradiação de bolsas de transfusão de concentrado de hemácias na prevenção de reações adversas. Tekhne e Logos. 2017;8:121–30.
- 198. Seo HS. Application of radiation technology in vaccines development. Clin Exp Vaccine Res. 2015;4(2):145.
- 199. do Nascimento Martins EM, de Andrade ASR. Mouse immunization with radioattenuated yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Kalkum M, Semis M, editores. Vaccines for Invasive Fungal Infections Methods in Molecular Biology. New York: Humana Press; 2017. p. 3–21.
- 200. Oakley MS, Verma N, Zheng H, Anantharaman V, Takeda K, Gao Y, et al.

- Molecular markers of radiation induced attenuation in intrahepatic *Plasmodium falciparum* parasites. PLoS One. 2016;11(12):1–20.
- 201. Babb R, Chen A, Hirst TR, Kara EE, McColl SR, Ogunniyi AD, et al. Intranasal vaccination with γ-irradiated *Streptococcus pneumoniae* whole-cell vaccine provides serotype-independent protection mediated by B-cells and innate IL-17 responses. Clin Sci (Lond). 2016;130(9):697–710.
- 202. Shahrudin S, Chen C, David SC, Singleton E V, Davies J, Kirkwood CD, et al. Gamma-irradiated rotavirus: A possible whole virus inactivated vaccine. PLoS One. 2018;13(6):3–15.
- 203. David SC, Lau J, Singleton E V., Babb R, Davies J, Hirst TR, et al. The effect of gamma-irradiation conditions on the immunogenicity of whole-inactivated Influenza A virus vaccine. Vaccine. 2017;35(7):1071–9.
- Magnani DM, Harms JS, Durward MA, Splitter GA. Nondividing but metabolically active gamma-irradiated *Brucella melitensis* is protective against virulent *B. melitensis* challenge in mice. Infect Immun. 2009 Nov;77(11):5181–9.
- 205. Datta SK, Okamoto S, Hayashi T, Shin SS, Mihajlov I, Fermin A, et al. Vaccination with irradiated Listeria induces protective T cell immunity. Immunity. 2006;25(1):143–52.
- 206. Rogero JR, Nascimento N. Atenuação da toxicidade de venenos ofídicos por meio da radiação ionizante. Biotecnol Ciência e Desenvolv. 1997;1(2):24–6.
- 207. Rogero JR, Nascimento N. Detoxification of snake venom using ionizing radiation. J Venom Anim Toxins. 1995;1(1):7–10.
- 208. Costa H. Estudo dos efeitos da radiação gama de <sup>60</sup>Co na peçonha de *Apis mellifera*: aspectos bioquímicos, farmacológicos e imunológicos [Tese]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2001.
- 209. Costa L, Takeda A, Barbosa S, Berra J, Adelina M, Soerensen B, et al. Estudo comparativo da resposta immune em cavalos ao veneno de *Crotalus durissus terrificus* in natura, tratado com formaldeído e submetido a ação térmica. Vacinas e soros. 1985;1:24–9.
- 210. Pinho JR, Cardi BA, Andrade HF, Barr PJ, Bathurst IC, Vicente EJ, et al. Immunogenic properties of the *M. leprae* recombinant 18-kDa antigen purified from *Saccharomyces cerevisiae*; enhancement of delayed-type hypersensitivity after gamma-irradiation. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1995;63(3):381–90.
- 211. Clark J. Guide for the care and use of laboratory animals. Institute of Laboratory Animal Resources Comission on Life Sciences. National Research Council. National Academy Press. Washington; 1996.
- 212. Guilhen FB, Trezena AG, Prado SMA, Higashi HG, Sonobe MH. Characterization of production processes for tetanus and diphtheria anatoxins. Biologicals. 2014;42(2):91–100.
- 213. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680–5.
- 214. Westermeier R, Naven T. Proteomics in Pratice. Weinheim: Wiley-VCH; 2002.
- 215. Ma B, Zhang K, Hendrie C, Liang C, Li M, Doherty-Kirby A, et al. PEAKS: powerful software for peptidede novo sequencing by tandem mass

- spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2003;17(20):2337-42.
- Venkatesan P, Wakelin D. ELISAs for parasitologists: or lies, damned lies and ELISAs. Parasitol Today. 1993;9(6):228–32.
- 217. Towbin H, Gordon J. Immunoblotting and dot immunobinding-current status and outlook. J Immunol Methods. 1984;72(2):313–40.
- 218. Perpetuo EA, Juliano L, Juliano MA, Fratelli F, Prado SMA, Pimenta DC, et al. Enzymatic profiling of tetanus and botulinum neurotoxins based on vesicle-associated-membrane protein derived fluorogenic substrates. Protein Pept Lett. 2008;15(10):1100–6.
- 219. Liang JL, Tiwari T, Moro P, Messonnier NE, Reingold A, Sawyer M, et al. Prevention of pertussis, tetanus, and diphtheria with vaccines in the United States: Recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). MMWR Recomm Reports. 2018;67(2):1–44.
- 220. World Health Organization. Tetanus vaccines: WHO position paper February 2017. RWkly Epidemiol Rec. 2017;92(6):53–76.
- 221. Yu R, Fang T, Liu S, Song X, Yu C, Li J, et al. Comparative immunogenicity of the tetanus toxoid and recombinant tetanus vaccines in mice, rats, and cynomolgus monkeys. Toxins (Basel). 2016;8(7).
- 222. Yu R, Yi S, Yu C, Fang T, Liu S, Yu T, et al. A conformational change of C fragment of tetanus neurotoxin reduces its ganglioside-binding activity but does not destroy its immunogenicity. Clin Vaccine Immunol. 2011;18(10):1668–72.
- 223. Lee SE, Nguyen CT, Kim SY, Thi TN, Rhee JH. Tetanus toxin fragment C fused to flagellin makes a potent mucosal vaccine. Clin Exp Vaccine Res. 2015 Jan;4(1):59.
- 224. Ibrahim EH, Asiri R, Al Syaad K. Genetic fusion of tetanus toxin fragment C (Hc) gene to cholera toxin subunit B (CTB) gene as a preparatory step for double vaccine production. Gene Reports. 2018;10:90–6.
- 225. Chung Y-J, Jung M-Y, Lee J-A, Kim T-Y, Choe Y-K, Kim I-H. Tetanus toxin production from *Clostridium tetani*, using a casein-based medium in a single-use bioreactor. Biotechnol Bioprocess Eng. 2016;21:531–6.
- Bodzon-Kulakowska A, Bierczynska-Krzysik A, Dylag T, Drabik A, Suder P, Noga M, et al. Methods for samples preparation in proteomic research. J Chromatogr B. 2007;849(1–2):1–31.
- 227. Bayart C, Peronin S, Jean E, Paladino J, Talaga P, Borgne M Le. The combined use of analytical tools for exploring tetanus toxin and tetanus toxoid structures. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2017;1054:80–92.
- 228. Stojićević I, Dimitrijević L, Dovezenski N, Živković I, Petrušić V, Marinković E, et al. Tetanus toxoid purification: chromatographic procedures as an alternative to ammonium-sulphate precipitation. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2011;879(23):2213–9.
- 229. Nunes ES, Souza MAA, Vaz AFM, Coelho LCBB, Aguiar JS, Silva TG, et al. Inactivation and fragmentation of lectin from *Bothrops leucurus* snake venom by gamma irradiation. Radiat Phys Chem. 2012;81(4):484–7.
- 230. Abib L, Laraba-Djebari F. Effect of gamma irradiation on toxicity and immunogenicity of *Androctonus australis hector* venom. Can J Physiol

- Pharmacol. 2003:81:1118-24.
- 231. Clissa PB, do Nascimento N, Rogero JR. Toxicity and immunogenicity of *Crotalus durissus terrificus* venom treated with different doses of gamma rays. Toxicon. 1999;37(8):1131–41.
- 232. Boni-Mitake M, Costa H, Spencer PJ, Vassilieff VS, Rogero JR. Effects of (60)Co gamma radiation on crotamine. Brazilian J Med Biol Res. 2001;34(12):1531–8.
- 233. de la Rosa G, Olvera F, Cruz E, Paniagua D, Corzo G. Use of irradiated elapid and viperid venoms for antivenom production in small and large animals. Toxicon. 2018;155:32–7.
- 234. Caproni P, Baptista J, Almeida T de, Passos L, Nascimento N. Study of irradiated bothropstoxin-1 with60Co gamma rays: immune system behavior. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2009;15(2):216–25.
- 235. Varca GHC, Kadlubowski S, Wolszczak M, Lugão AB, Rosiak JM, Ulanski P. Synthesis of papain nanoparticles by electron beam irradiation A pathway for controlled enzyme crosslinking. Int J Biol Macromol. 2016;92:654–9.
- 236. Oliveira CLP, Hoz L de la, Silva JC, Torriani IL, Netto FM. Effects of gamma radiation on β-lactoglobulin: Oligomerization and aggregation. Biopolymers. 2007;85(3):284–94.
- 237. Spencer PJ, Byrne M, Nascimento N, Rogero JR, Smith L. Effects of 60co radiation on bothropstoxin-1 structure [Internet]. Rio de Janeiro; 2000 [Acessado em 3 de fevereiro de 2019]. Disponível em: https://www.ipen.br/biblioteca/2000/cgen/07248
- 238. Casare MS, Spencer P, Campos LA, Nascimento N. Study of gamma-radiation effects on crotamine and crotoxin. J Radioanal Nucl Chem. 2006; 269(3):571–7.
- 239. Qazi O, Brailsford A, Wright A, Faraar J, Campbell J, Fairweather N. Identification and characterization of the surface-layer protein of *Clostridium tetani*. FEMS Microbiol Lett. 2007;274(1):126–31.
- 240. Yanes O, Avilés FX, Wenzel R, Nazabal A, Zenobi R, Calvete JJ. Proteomic profiling of a snake venom using high mass detection MALDI-TOF mass spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom. 2007 Apr 1;18(4):600–6.
- 241. Le Maire M, Thauvette L, de Foresta B, Viel A, Beauregard G, Potier M. Effects of ionizing radiations on proteins. Evidence of non-random fragmentations and a caution in the use of the method for determination of molecular mass. Biochem J. 1990;267(2):431–9.
- 242. Abdou F, Denshary E, Shaaban E, Mohamed M. Assessment of the neutralizing potency of antisera raised against native and γ-irradiated *Naja nigricollis* (black-necked spitting cobra) venom in rabbits, concerning its cardiotoxic effect. Hum Exp Toxicol. 2017;36(12):1335–44.
- 243. Calado T, Fernández-Cruz ML, Cabo Verde S, Venâncio A, Abrunhosa L. Gamma irradiation effects on ochratoxin A: Degradation, cytotoxicity and application in food. Food Chem. 2018;240:463–71.
- 244. Murata Y, Rogero JR. Efeito da radiação gama em veneno de *Crotalus durissus terrificus*: aspectos antigênicos. Inst Pesqui Energéticas e Nucl. 1988;153:1–12.
- 245. Camillo M, Silva J, Yonamine C, Hashizume J, Silva M, Higa O. Biological

- activity and structural alterations in gyroxin induced by gamma radiation. Int Nucl Atl Conf. 2005;1–6.
- 246. Butler J, Land EJ, Swallow AJ. Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems. Radiat Phys Chem. 1984;24(3–4):273–82.
- 247. Kempner ES. Damage to proteins due to the direct action of ionizing radiation. Q Rev Biophys. 1993;26(01):27.
- 248. Li C, He L, Ma S, Wu W, Yang H, Sun X, et al. Effect of irradiation modification on conformation and gelation properties of pork myofibrillar and sarcoplasmic protein. Food Hydrocoll. 2018;84:181–92.
- 249. Reisz JA, Bansal N, Qian J, Zhao W, Furdui CM. Effects of ionizing radiation on biological molecules-mechanisms of damage and emerging methods of detection. Antioxid Redox Signal. 2014;21(2):260–92.
- 250. Nardi DT, Casare MS, Teixeira LGD, Nascimento N, Nakaie CR. Effect of gamma radiation on the structural and biological properties of angiotensin II. Int J Radiat Biol. 2008;84(11):937–44.
- 251. Vieira R de FF, Nardi DT, Nascimento N, Rosa JC, Nakaie CR. Peptide structure modifications: effect of radical species generated by controlled gamma ray irradiation approach. Biol Pharm Bull. 2013;36(4):664–75.
- 252. Davies MJ. Protein oxidation and peroxidation. Biochem J. 2016;473(7):805–25.
- 253. van Baar BLM, Hulst AG, Roberts B, Wils ERJ. Characterization of tetanus toxin, neat and in culture supernatant, by Electrospray Mass Spectrometry. Anal Biochem. 2002;301(2):278–89.
- 254. Meng X, Li X, Wang X, Gao J, Yang H, Chen H. Potential allergenicity response to structural modification of irradiated bovine α-lactalbumin. Food Funct. 2016;7(7):3102–10.
- Do Nascimento N, Seebart CS, Francis B, Rogero JR, Kaiser II. Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. Toxicon. 1996;34(1):123–31.
- 256. da Costa A, Zorgi NE, do Nascimento N, Galisteo AJ, de Andrade HF. Gamma irradiation of *Toxoplasma gondii* protein extract improve immune response and protection in mice models. Biomed Pharmacother. 2018;106:599–604.
- 257. Samy EM, Shaaban EA, Kenawy SA, Abd Elfattah MA, Salama WH. The impact of low doses of gamma radiation on *Echis coloratus* venom and its fractions. Radiat Phys Chem. 2018;150:145–50.
- 258. Boumaiza S, Oussedik-Oumehdi H, Laraba-Djebari F. Pathophysiological effects of *Cerastes cerastes* and *Vipera lebetina* venoms: Immunoneutralization using anti-native and anti-60Co irradiated venoms. Biologicals. 2016;44(1):1–11.
- 259. Audette-Stuart M, Houée-Levin C, Potier M. Radiation-induced protein fragmentation and inactivation in liquid and solid aqueous solutions. Role of OH and electrons. Radiat Phys Chem. 2005;72(2–3):301–6.
- 260. Fratelli F, Siquini TJ, de Abreu ME, Higashi HG, Converti A, de Carvalho JCM. Fed-batch production of tetanus toxin by *Clostridium tetani*. Biotechnol Prog. 2009;26(1):88–92.

- 261. Dalto DB, Matte J-J. Pyridoxine (Vitamin B<sub>6</sub>) and the glutathione peroxidase system; a link between one-carbon metabolism and antioxidation. Nutrients. 2017;9(3):1–13.
- 262. Lukienko PI, Mel'nichenko NG, Zverinskii I V, Zabrodskaya S V. Antioxidant properties of thiamine. Bull Exp Biol Med. 2000;130(9):874–6.
- Portari G V, Marchini JS, Vannucchi H, Jordao AA. Antioxidant effect of thiamine on acutely alcoholized rats and lack of efficacy using thiamine or glucose to reduce blood alcohol content. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2008 Nov;103(5):482–6.
- 264. Ashoori M, Saedisomeolia A. Riboflavin (vitamin B2) and oxidative stress: a review. Br J Nutr. 2014;111(11):1985–91.
- 265. Khalilzadeh M, Abdollahi A, Abdollahi F, Abdolghaffari AH, Dehpour AR, Jazaeri F. Protective effects of magnesium sulfate against doxorubicin induced cardiotoxicity in rats. Life Sci. 2018;207:436–41.
- 266. Abad C, Vargas FR, Zoltan T, Proverbio T, Piñero S, Proverbio F, et al. Magnesium sulfate affords protection against oxidative damage during severe preeclampsia. Placenta. 2015;36(2):179–85.
- 267. Begum RH, Rahman H, Ahmed G. Development and evaluation of gamma irradiated toxoid vaccine of *Salmonella enterica* var Typhimurium. Vet Microbiol. 2011;153(1–2):191–7.

# ANEXO A – Identificação de outros pepitídeos

Descrição	Massa	Nativa	Doses (KGy)							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Vitamin B12-dependent ribonucleotide reductase OS= <i>Clostridium tetani</i> 12124569 OX=1231072 GN=BN906_0 0598 PE=3 SV=1	137036								Х	
Putative cell wall binding repeat 2 OS=Clostridium tetani OX=1513 GN=SAMN02745112_01893 PE=4 SV=1	131147						Х	Х	Х	Х
Putative S-layer protein/N-acetylmuramoyl-L- alanine a midase OS= <i>Clostridium tetani</i> (strain Massachusetts / E 88) OX=212717 GN=CTC_00462 PE=4 SV=1	118694						X	Х	X	Х
Ribonucleoside-diphosphate reductase OS=Clostridium tetani OX=1513 GN=C3B72_06770 PE=4 SV=1	117109								Х	
Vitamin B12-dependent ribonucleotide reductase OS= <i>Clostridium tetani</i> (strain Massachusetts / E88) OX=2127 17 GN=CTC_00574 PE=3 SV=1	117096								Х	
Endonuclease MutS2 OS=Clostridium tetani 12124569 OX=1231072 GN=mutS_2 PE=3 SV=1	89392								Х	
Membrane-associated protein OS= <i>Clostridium tetani</i> 12 124569 OX=1231072 GN=BN906_00799 PE=4 SV=1	73206								Х	
Endopeptidase La OS= <i>Clostridium tetani</i> OX=1513 GN= SAMN02745112_02462 PE=3 SV=1	70540								X	
Endopeptidase La OS=Clostridium tetani (strain Massac husetts / E88) OX=212717 GN=CTC_00113 PE=3 SV= 1	70540								Х	
Endopeptidase La OS= <i>Clostridium tetani</i> 12124569 OX =1231072 GN=BN906_00087 PE=3 SV=1	70505								Х	
AspartatetRNA ligase OS= <i>Clostridium tetani</i> 1212456 9 OX=1231072 GN=aspS PE=3 SV=1	67887								Х	
ArgininetRNA ligase OS= <i>Clostridium tetani</i> OX=1513 GN=argS PE=3 SV=1	65076								Х	
ArgininetRNA ligase OS= <i>Clostridium tetani</i> 12124569 OX=1231072 GN=argS PE=3 SV=1	65058								Х	
Ferrous iron transport protein B-like protein OS=Clostridium tetani (strain Massachusetts / E88) OX=212717 G N=CTC_00534 PE=4 SV=1	50028								Х	
Peptidase M56, BlaR1 OS= <i>Clostridium tetani</i> 12124569 OX=1231072 GN=BN906_01551 PE=4 SV=1	49276								Х	
Methylaspartate ammonia-lyase OS=Clostridium tetani 12124569 OX=1231072 GN=BN906_02814 PE=4 SV=1	45633							Х	Х	Х
7 Methylaspartate ammonia-lyase OS= <i>Clostridium tetani</i> OX=1513 GN=C3B72_05920 PE=4 SV=1	45617						Х	Х	Х	Х

Pili retraction protein pilT OS= <i>Clostridium</i> tetani 12124 569 OX=1231072 GN=pilT_2 PE=4 SV=1	43181			Х	
D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase OS= <i>Clostridium tetani</i> OX=1513 GN=C3B72_02795 PE=3 SV=1	41652			Х	
Peptide chain release factor 1 OS=Clostridium tetani OX =1513 GN=prfA PE=3 SV=1	40841			Х	
Peptide chain release factor 1 OS= <i>Clostridium tetani</i> 12 124569 OX=1231072 GN=prfA PE=3 SV=1	40841			Х	
Cobalamin biosynthesis protein cbiG OS=Clostridium tetani (strain Massachusetts / E88) OX=212717 GN=cbiG PE=4 SV=1	36444			Х	
Cobalamin biosynthesis protein CbiG OS= <i>Clostridium tetani</i> 12124569 OX=1231072 GN=cbiG PE=4 SV=1	36443			Х	
D-alanineD-alanine ligase OS= <i>Clostridium</i> tetani 1212 4569 OX=1231072 GN=ddl_2 PE=3 SV=1	34063			Х	
Elongation subunit of DNA-dependent DNApolymerase OS= <i>Clostridium tetani</i> 12124569 OX=1231072 GN=BN906_01028 PE=4 SV=1	32184			х	
Transcriptional regulatory protein OS=Clostridium tetani 12124569 OX=1231072 GN=BN906_01833 PE=4 SV= 1	18627			Х	